UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

MARTA LOPES LIMA

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE FÁRMACOS EM *LEISHMANIA*:
UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA NÃO DIRIGIDA**

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

São Paulo

2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Lima, Marta Lopes

Estudo do mecanismo de ação de fármacos em Leishmania: uma abordagem
metabolômica não dirigida / Marta Lopes Lima. – São Paulo, 2017.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

Descritores: 1. LEISHMANIA. 2. REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS. 3.
ANTIDEPRESSIVOS. 4. FÁRMACOS. 5. METABOLÔMICA.

USP/IMTSP/BIB-14/2017.

DEDICATÓRIA

*As mulheres da minha vida: **Mercedes Gutierres Lopes** (avó, sempre presente), **Aparecida B. Lopes Lima** (mãe), e **Ruth Domingues Maciel Pagani** (tia), meus pilares de vida, exemplos de força, dedicação e caráter.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, por todos esses anos de orientação dedicados ao desenvolvimento deste projeto desafiador. Sou eternamente grata pela oportunidade e confiança nos quase 2 anos de estágio no exterior. E principalmente me sinto honrada por ter sido parte de sua caminhada profissional e aprendido na gentileza e amabilidade de um líder e pesquisador que segue inspirando gerações, mesmo com todos os desafios da pesquisa científica no Brasil.

Ao grupo do Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas: **Thaís Alves, Juliana Tonini, Daiane Ferreira, Mariana Galuppo, Maiara Romaneli, Maiara Amaral, Samanta Borborema, Viviane Mendes, Érika Pinto, Lígia Ferreira, Tatiana Alexandre**, e nossa querida técnica **Matília Nascimento**, por todo suporte, companheirismo e dedicação nestes 3 anos de trabalho em equipe.

Al **Prof. Dr. Luis Rivas** y a la **Dra. María A. Abengózar** por recibirme con tanto cariño en el laboratorio y enseñarme tanto en tan poco tiempo.

A la **Prof. Dra. Coral Barbas** por abrirme las puertas de su laboratorio y haber puesto a mi disposición los recursos necesarios para la realización de esta tesis.

A la **Prof. Dra. Ángeles López-González**, gracias Nines por dirigirme con tanto cuidado, atención y paciencia. Fuiste gran parte de la experiencia tremenda que he tenido en el grupo CEMBIO, te admiro y te tengo en el corazón como un ejemplo de fuerza, compañerismo y responsabilidad profesional.

A todo el personal y compañeros del grupo CEMBIO, por los momentos compartidos en el ámbito profesional y personal. En especial agradezco a **Vanesa Alonso** y **David Rojo** por las sonrisas y amistades que hicieron mis días aún mejores.

A mis niñas **Amparo Pous, Claudia Balderas, Délia Chaves, Mayela Salas, Mirian Arrabal, Carolina Bueno** y todas las Risueñas, por hacerme un hogar en España y dejarme memorias tan bonitas. Os quiero a todas.

A minhas amigas **Mariana Fonte Boa, Aline Ramos** e **Isabela Sodré** pelos anos de amizade sincera e eterno companheirismo, mesmo quando há um oceano separando-nos fisicamente.

À **minha família**, por acreditarem em mim e me permitirem voar longe. E principalmente minha tia **Ruth Domingues Maciel Pagani** pela acolhida e dedicação nesses anos de doutorado.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em especial **Prof. Dr. Thelma Suely Okay** e a nossa querida **Secretária Eliane Araújo**, por todo auxílio e carinho ao longo do curso de doutorado.

À **EADS-CASA, Airbus Military Spain** e a **Capes** pelo auxílio financeiro deste projeto de pesquisa.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

*“Donde ó meu coração, veio-te tanta alegria?
Só daquele sono benéfico, prolongado que
tanto me refrescou? Ou da palavra Om que
pronunciei? Ou do fato de eu ter logrado
escapar, transformar essa fuga em realidade
definitiva”*

Hermann Hesse

RESUMO

Lima ML. Estudo do mecanismo de ação de fármacos em *Leishmania*: uma abordagem metabolômica não dirigida (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo: 2017.

A quimioterapia disponível para o tratamento das leishmanioses conta com um número reduzido de fármacos, com efeitos adversos severos e progressivo aumento de resistência. O reposicionamento de fármacos oferece uma grande oportunidade para introdução de novas terapias. Antidepressivos orais têm demonstrado eficácia tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra espécies de *Leishmania* spp. Neste estudo, o antidepressivo sertralina (SRT), e o fármaco ciclobenzaprina (CBP), um relaxante muscular de estrutura tricíclica análoga a antidepressivos, foram avaliados quanto a atividade contra *Leishmania (L.) infantum*. Estudos metabolômicos não dirigidos utilizando multiplataforma analítica, foram combinados a análises de parâmetros celulares, essenciais para obtenção de uma ampla descrição dos mecanismos de ação. A CBP mostrou uma atividade leishmanicida *in vitro*, com valor de CE₅₀ de 4,3 µM contra formas promastigotas e 8,6 µM contra formas amastigotas intracelulares. O fármaco apresentou uma citotoxicidade (CC₅₀) de 70,6 µM em células NCTC, e um índice de seletividade similar a miltefosina. Os estudos de mecanismo de ação, sugeriram que a CBP se difunde pela membrana plasmática, causando diminuição do $\Delta\psi_p$ e no interior citoplasmático, parece induzir um estresse do RE com liberação de Ca⁺²; concomitantemente, induz um desacoplamento brando da cadeia respiratória mitocondrial e depleção dos níveis de ATP. Com o efeito prolongado, a liberação de Ca⁺² parece ativar a autofagia, e seu influxo para a mitocôndria potencializar os efeitos deletérios, diminuindo o $\Delta\psi_m$ e aumentando a produção de ROS. A longo prazo, o CBP induz uma extensa alteração metabólica, caracterizada aumento dos níveis da maioria dos metabólitos identificados e atividade desregulada de transportadores de membrana, gerando alto gasto energético associado a condições insuficientes de produção de energia mitocondrial, resultando em morte celular. A sertralina também apresentou atividade leishmanicida *in vitro*, com valor de CE₅₀ de 2 µM contra formas promastigotas e 3,9 µM contra formas amastigotas intracelulares. Sua toxicidade em células NCTC foi de 19,6 µM, resultando em um índice de seletividade similar a miltefosina. Nossos estudos confirmaram a mitocôndria de *Leishmania* como alvo primário e, o efeito de desacoplamento da cadeia respiratória associado ao colapso energético, estresse oxidativo seguido da despolarização do $\Delta\psi_m$ como a possível origem desta disfunção mitocondrial. Estudos metabolômicos evidenciaram que a extensão do desarranjo metabólico, abrange diminuição da capacidade de detoxificação do metabolismo tiol-redox, uma severa depleção do *pool* intracelular de aminoácidos e poliaminas, evidenciando uma completa deterioração do metabolismo energético, por meio de um mecanismo multialvo direcionado a vias metabólicas essenciais do parasita. Finalmente, este estudo descreve a atividade anti-*Leishmania* de dois fármacos orais aprovados, com mecanismos de ação letais e irreversíveis no parasita, encorajando o prosseguimento para futuros estudos pré-clínicos na leishmaniose visceral americana.

Descritores: *Leishmania*. Reposicionamento de fármacos. Antidepressivos. Fármacos. Metabolômica.

ABSTRACT

Lima ML. Study of the mechanism of action of drugs in *Leishmania*: an untargeted metabolomic approach (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo: 2017.

The available chemotherapy for the treatment of leishmaniasis has a reduced number of drugs, with severe adverse effects and progressive increase of resistance. The drug repurposing offers a great opportunity for the introduction of new therapies. Oral antidepressants have been demonstrated efficacy both *in vitro* and *in vivo* against *Leishmania* spp. In this study, the antidepressant sertraline (SRT), and the drug cyclobenzaprine (CBP), a muscle relaxant with tricyclic structure analogous to antidepressants, were evaluated against *Leishmania (L.) infantum*. Untargeted metabolomic studies using multiplatform analysis were combined to cellular parameters to a broad description of the mechanisms of action. Cyclobenzaprine showed an *in vitro* leishmanicidal activity with an EC₅₀ value of 4.3 μM against promastigotes and 8.6 μM against intracellular amastigote forms. The drug showed a cytotoxicity (CC₅₀) of 70.6 μM in NCTC cells, and a selectivity index similar to miltefosine. Mechanism of action studies suggested that CBP diffuses through the plasma membrane, causing a decrease of the $\Delta\psi_p$ and inside the cytoplasm, the drug seems to induce an ER stress, with release of Ca^{+2} ; concomitantly, it induces a mild decoupling of the mitochondrial respiratory chain and depletion of ATP levels. With the prolonged effect, a release of Ca^{+2} appears to activate an autophagy, and its mitochondrial influx results in a potentiation of deleterious effects as decreasing of $\Delta\psi_m$ and increasing ROS production. In long term, CBP induces an extensive metabolic alteration, characterized increased levels of most of the identified metabolites and unregulated activity of membrane transporters. These generates a high energy expenditure associated to limited conditions of mitochondrial energy production, resulting in the cellular death. Sertraline also showed *in vitro* leishmanicidal activity, with an EC₅₀ value of 2 μM against promastigotes and 3.9 μM against intracellular amastigote forms. Its toxicity in NCTC cells was 19.6 μM , resulting in a selectivity index similar to miltefosine. Our studies confirmed the mitochondria of *Leishmania* as the primary target, and the uncoupling of the respiratory chain associated with energy collapse, oxidative stress, and the depolarization of $\Delta\psi_m$ as the possible origin of this mitochondrial dysfunction. Metabolomics evidenced an extended metabolic disarray caused by SRT encompassing a decrease in the scavenging capacity of the thiol-redox metabolism and a severe depletion of the intracellular pool of amino acids and polyamines. The complete deterioration of energetic metabolism was evident through a multi-target mechanism, affecting the main metabolic pathways of the parasite. Finally, this study describes an anti-*Leishmania* activity of two approved oral drugs with lethal and irreversible mechanisms of action in the parasite, encouraging future preclinical studies in American visceral leishmaniasis.

Descriptors: *Leishmania*. Drug Repurposing. Antidepressants. Drugs. Metabolomics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Formas clínicas da leishmaniose: (a) leishmaniose cutânea (LC) caracterizada por úlceras na pele; (b) leishmaniose mucocutânea (LMC) caracterizada por lesões que levam a destruição total ou parcial das mucosas do nariz, boca e garganta e (c) leishmaniose visceral (LV) caracterizada por episódios irregulares de febre, substancial perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia. Fonte da imagem: <http://globalhealthvet.files.wordpress.com/2010/10/leishmania-clin-appearance.jpg> 24
- Figura 2 - Ciclo de transmissão de parasitas *Leishmania (L.) infantum*, agente etiológico da LVA. Adaptado de Kaye e Scott⁷ 27
- Figura 3 - Cadeia respiratória mitocondrial de *Leishmania*. Complexo I: NADH:ubiquinona oxidoreductase (envolvido apenas no transporte de elétrons); complexo II: succinato desidrogenase; complexo III: ubiquinona citocromo c oxidoreductase; complexo IV: citocromo oxidase; complexo V: ATP sintase (ATPase). Linhas em azul representam o fluxo de elétrons enquanto linhas rosas representam a extrusão de prótons. Figura adaptada de Nelson e Cox⁵⁷ 36
- Figura 4 - Vantagens e desvantagens das técnicas mais empregadas em estudos metabolômicos. ^aEI, ionização por elétrons; ^bESI, ionização por eletrospray; ^cAPCI, ionização química a pressão atmosférica^{90,94,98,99} ... 50
- Figura 5 - Fluxo de trabalho simplificado de análises metabolômicas não dirigidas para o estudo de mecanismo de ação de fármacos 52
- Figura 6 - Antidepressivos tricíclicos estruturalmente similares ao fármaco ciclobenzaprina..... 55
- Figura 7 - Mecanismo de a ação central do fármaco CBP. O fármaco CBP promove o efeito de relaxamento muscular via ação central iniciada no tronco cerebral e inibição da via serotoninérgica descendente. 57
- Figura 8 - Estrutura química do antidepressivo SRT 59
- Figura 9 - Mecanismo de ação do fármaco SRT no hospedeiro mamífero humano. Figura adaptada de Lattimore et al.¹⁰³ 59
- Figura 10 - Efeito da ciclobenzaprina em amastigotas intracelulares de *Leishmania pifanoi* no interior de macrófagos peritoneais. (a) Macrófagos infectados e incubados com 25 µM de CBP durante 18 horas. (b) Macrófagos infectados e não tratados. Amastigotas foram corados antes da infecção

com CFSE (0,4 µg/mL) e o núcleo dos macrófagos foram corados com DAPI (5 µg/mL). Barras 15 µm. Objetiva de imersão (100X). 83

Figura 11 - Avaliação dos níveis de ATP_c de promastigotas 3-Luc *Leishmania donovani* incubados com CBP (a). Inibição da luminescência acompanhada até 1 hora na presença de CBP. (b) Inibição da luminescência após 4 horas de tratamento. Legenda das concentrações de CBP: 0 µM (■, controle não tratado); 10 µM (Δ); 30 µM (▼); 40 µM (○); 50 µM (●). Inibição máxima de luminescência foi obtida pelo tratamento com 0,1% de Tx100 (□). Os dados foram normalizados em relação ao controle não tratado. ***p<0.0001 85

Figura 12 - Avaliação dos níveis de Ca⁺² intracelular de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com CBP durante 1 e 4 horas. Intensidades de fluorescência Fura2 foram corrigidas em relação as intensidades basais medidas antes da adição dos fármacos e normalizadas em relação a promastigotas não tratadas e fluorescência máxima (F_{máx}) obtida pela permeabilização dos parasitas pela adição de 0,5% de solução detergente Tx100. Dados representam % média±SE de três experimentos independentes. ***p<0.0001 86

Figura 13 - Avaliação da permeabilidade (Sytox® Green) (a) e do potencial de membrana plasmática (bisoxonol) (b) de *Leishmania (L.) infantum* na presença do fármaco CBP. As porcentagens de fluorescência são relativas a fluorescência máxima adquirida pelo tratamento com 0,1% de Tx100 (a) ou 10 µM de indolicidina (b). Legenda das concentrações de CBP: 0 µM (■, controle não tratado); 20 µM (Δ); 30 µM (▼); 40 µM (○); 50 µM (●). ***p<0.0001 87

Figura 14 - Variação do Δψ_m em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP durante 4 horas indiretamente determinada pela fluorescência Rd123 por citometria de fluxo. (a) Dot-plots exibem variação de fluorescência Rd123 versus variação de fluorescência PI. (b) Gráfico de barras da intensidade de fluorescência Rd123, promastigotas não tratados determinaram a fluorescência máxima, promastigotas despolarizados foram obtidos pelo tratamento com KCN 10 mM. *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001 88

Figura 15 - Determinação da fluorescência da sonda mitocondrial Mitotracker® red por microscopia confocal de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados CBP. Mitocôndria e núcleo foram corados com Mitotracker® Red (0,1 µM) e DAPI (5 µg/mL), respectivamente. Barra: 10 µm. Objetiva de imersão (100X). 89

Figura 16 - Avaliação das taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* permeabilizados com digitonina. (a) Efeito do fármaco CBP sobre a cadeia respiratória mitocondrial. (b) Efeito do desacoplador mitocondrial FCCP. As setas indicam a adição de substratos e inibidores.

Concentrações finais usadas foram: 60 μM digitonina; 100 μM ADP; 12,6 μM oligomicina; 3,3 μM FCCP e 30 μM CBP. As taxas de consumo de oxigênio foram calculadas a partir das correspondentes inclinações da reta mostrada como $\text{nmol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$, cujos valores foram graficamente demonstrados em barras na base inferior esquerda da figura..... 90

Figura 17 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, e antimicina A (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada para máxima produção de ROS; * $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$; ns: não significativo..... 91

Figura 18 - Alterações morfológicas ultraestruturais determinadas por microscopia TEM induzidas pelo fármaco CBP. Promastigotas não tratados (a,b); promastigotes tratados com 30 μM CBP durante 4 horas (c,e); e 12 horas (d,f). Legenda: n: núcleo, k, cinetoplasto, #: autofagossomo, re: retículo endoplasmático (cabeça de seta branca). Seta preta: acúmulo de estruturas de membranas. Barras: 1 μm 93

Figura 19 - Validação analítica dos estudos metabolômicos. Modelos PCA, componente 1 vs componente 2 foram plotados. (a) EC-EM: $R^2=0.775$; $Q^2=0.574$. (b) CG-EM: $R^2=0.609$; $Q^2=0.465$. (c) CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.700$; $Q^2=0.472$. (d) CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.729$; $Q^2=0.625$. R^2 = coeficiente de variação explicada; Q^2 = coeficiente de predição. CQs: controle de qualidade. 94

Figura 20 - Representação do impacto de escalonamento sobre a matriz de dados adquirida pela plataforma CLAE-EM (ESI+). (a) Dados brutos não escalonados. (b) Dados escalonados tipo pareto. (c) Dados escalonados tipo UV..... 96

Figura 21 - Validação biológica dos modelos PLS-DA. Componente 1 vs componente 2. (a) EC-EM: $R^2=0.990$, $Q^2=0.972$. (b) Predição EC-EM: $R^2=0.996$, $Q^2=0.990$. (c) CG-EM: $R^2=0.990$, $Q^2=0.949$. (d) Predição CG-EM: $R^2=0.992$, $Q^2=0.964$. (e) CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.989$, $Q^2=0.947$. (f) Predição CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.997$, $Q^2=0.928$. (g) CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.996$, $Q^2=0.981$. (h) Predição CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.994$, $Q^2=0.976$. R^2 = coeficiente de variância explicada; Q^2 = coeficiente de predição. 97

Figura 22 - Modelos OPLS-DA. Componente 1 vs componente 2. (a) EC-EM: $R^2=0.990$, $Q^2=0.971$. (b) CG-EM: $R^2=0.997$, $Q^2=0.966$. (c) CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.989$, $Q^2=0.949$. (d) CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.996$, $Q^2=0.980$ 98

Figura 23 - (a) Complementariedade entre as três plataformas analíticas EC-EM, CG-EM e CLAE-EM modos positivo e negativo na identificação de 115

metabolitos totais. (b) Distribuição das classes bioquímicas dos 90 diferentes metabólitos alterados pelo fármaco CBP. 100

Figura 24 - *Heatmap* do efeito de regulação positiva do metabolismo de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após 12 horas de incubação com fármaco CBP. A escala na lateral direita representa o nível das variações: vermelho indica aumento enquanto verde indica diminuição, valores respectivos a tabela 3. 113

Figura 25 - Resumo das principais vias metabólicas e seus respectivos metabólitos alteradas após incubação de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* com fármaco CBP. Setas indicam o tipo de variação sofrido por cada via metabólica. 114

Figura 26 - Mecanismo de ação proposto para a atividade leishmanicida da CBP em parasitas *Leishmania*. O fármaco CBP atravessa membrana plasmática causando (1) diminuição do $\Delta\psi_p$; no interior citoplasmático induz um (2) estresse do RE com liberação de Ca^{2+} para o citoplasma; concomitantemente a indução de um desacoplamento brando da cadeia respiratória mitocondrial ($\parallel$) e depleção dos níveis de ATP. Com o efeito prolongado, a liberação de Ca^{+2} parece (3) ativar autofagia e seu influxo para a mitocôndria potencializar efeitos deletérios induzindo (4) diminuição do $\Delta\psi_m$ e o (5) aumento da produção de ROS; a longo prazo, o fármaco CBP induziu uma alteração metabólica caracterizada pelo (6) r aumento dos níveis da maioria dos metabólitos identificados e (7) atividade desregulada de transportadores de membrana gerando alto gasto energético associado a condições insuficientes de produção de energia, resultando em morte celular. Mecanismos representados em cinza são hipotéticos e carecem de comprovação. Espessura da seta indica intensidade de efeito..... 115

Figura 27 - Variação dos níveis de ATP_c de promastigotas 3-Luc incubados com SRT. (a) Redução da luminescência acompanhada até 1 hora na presença de SRT. (b) Redução da luminescência após 4 horas de incubação. Legenda: não tratados (Δ); SRT 10 μ M ($\blacktriangledown$); SRT 20 μ M ($\circ$); SRT 50 μ M ($\bullet$); 0,1% Tx-100 ($\blacksquare$). Dados foram normalizados em relação aos controles; ($p < 0.0001$ ***). 127

Figura 28 - Avaliação da permeabilidade (a, Sytox® Green) e do $\Delta\psi_p$ (b, bisoxonol) de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* na presença do fármaco SRT. As porcentagens de fluorescência são relativas a fluorescência máxima adquirida pelo tratamento com 0,1% de Tx100 (a) ou 10 μ M de indolicidina ($\blacksquare$). Legenda SRT: 0 μ M (Δ); 10 μ M ($\blacktriangledown$); 20 μ M ($\circ$); 50 μ M ($\bullet$); ($p < 0.0001$ ***). 128

Figura 29 - Avaliação do $\Delta\psi_m$ em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT durante 4 horas. Porcentagem de fluorescência relativa a máxima intensidade de fluorescência Rd123 de promastigotas não tratados.

Promastigotas despolarizados foram obtidos pelo tratamento com KCN 10 mM. 129

Figura 30 - Microscopia confocal da fluorescência da sonda Mitotracker® Red em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT. (a) promastigotas marcados não tratados. (b) Promastigotas marcados incubados com SRT 20 µM durante 4 horas. Mitocôndria e núcleo foram corados com Mitotracker® Red (0,1 µM) e DAPI (5 µg/mL), respectivamente. Barra = 5 µm. Objetiva de imersão (100X)..... 130

Figura 31 - Avaliação das taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* permeabilizados com digitonina. (a) Efeito do fármaco SRT. (b) Efeito do desacoplador mitocondrial FCCP. Concentrações empregadas: 60 µM digitonina; 100 µM ADP; 12,6 µM oligomicina; 3,3 µM FCCP; 50 µM SRT. Setas indicam adição dos respectivos reagentes. 131

Figura 32 - Sítio de ação do fármaco SRT na cadeia respiratória em parasitas *Leishmania*. A extrusão de prótons foi indicada por setas cinza. O efeito desacoplador foi indicado pela seta preta mais espessa. Legenda: α-GP, α-glicerofosfato; FAD-GPDH, flavina adenina dinucleotídeo dependente glicerofosfato desidrogenase; UQ, ubiquinona Q; Cyt C, citocromo c; TMPD, N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato. Locais de alimentação de elétrons ou inibição foram indicados por linhas sólidas ou pontilhadas, respectivamente. Figura adaptada Carvalho et al.¹⁶⁵ 132

Figura 33 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT. Antimicina A (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo. Níveis de fluorescência foram normalizados em relação aos controles (p<0.001**; p<0.0001***)..... 133

Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas incubados com SRT. (a) Promastigotas não tratados. (b) Promastigotas tratados com na CE_{50A} de 20 µM durante 4 horas em meio definido HBSS+glicose. Legenda: m, mitocôndria; n, núcleo; k, cinetoplasto. Setas indicam vacúolos multivesiculares. Barra = 1 µm. 134

Figura 35 - Validação analítica por modelos não supervisionados PCA. Modelos foram construídos a partir da matriz de dados filtros (presença ≥50% e %DPR<30% nas amostras CQs). Componente 1 vs componente 2 estão representadas. R² = coeficiente de variação explicada; Q² = coeficiente de predição. CQ: amostras de controle de qualidade 135

Figura 36 - Modelos PLS-DA construídos para controles não tratados vs tratados. R² = coeficiente de variação explicada; Q² = coeficiente de predição..... 136

- Figura 37 - Diagrama de Venn construído a partir dos 111 metabólitos totais identificados ilustrando a complementariedade das técnicas analíticas EC-EM e CLAE-MS, modos positivo e negativo nos estudos das alterações bioquímicas induzidas pelo fármaco SRT em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*..... 138
- Figura 38 - *Heatmap* dos 88 metabólitos com variação significativa após incubação de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* com fármaco SRT. A escala de cinza representa o nível das variações: aumento para cores mais escuras e diminuição para cores mais claras. Os números de identificação dos metabólitos na lateral direita são respectivos a tabela 6, enquanto as classes bioquímicas foram nomeadas na lateral esquerda..... 149
- Figura 39 - Percentual das alterações metabólicas induzidas pelo fármaco SRT por classe bioquímica. 150
- Figura 40 - Metabolismo de aminoácidos e bioenergético alterados em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. Legenda: α -KG, α -cetoglutarato; succ-CoA, succinil-CoA. Metabólitos com ponto de interrogação foram arbitrariamente assignados de acordo com sua massa exata (putativos). Metabólitos com níveis diminuídos após o tratamento foram coloridos em cinza. Figura adaptada de Saunders et al.⁹¹..... 151
- Figura 41 - Alterações da via glicolítica e da via das pentoses fosfato de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. Metabólitos com ponto de interrogação foram arbitrariamente assignados de acordo com sua massa exata (putativos). Metabólitos com níveis diminuídos após incubação foram coloridos em cinza. Legenda: G6P, glucose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; R5P, ribose-5-fosfato; E4P, eritrose-4-fosfato; X5P, xilulose-5-fosfato; GAP, gliceraldeído-3-fosfato; DHAP, diidroxiacetona fosfato. Figura adaptada de Oppendoes; Szikora¹⁸⁸..... 152
- Figura 42 - Biossíntese de poliaminas e metabolismo redox tiol alterados em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. Metabólitos com ponto de interrogação foram arbitrariamente assignados de acordo com a massa exata. Legenda: Adomet, S-adenosilmetionina; dcAdomet, S-adenosilmetionina descarboxilase; F6P, frutose-6-fosfato; G6P, glucose-6-fosfato; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; S7P, sedoheptulose 7 fosfato; T(SH)₂, tripanotona reduzida; T(S)₂, tripanotona oxidada. Metabólitos com níveis diminuídos após o tratamento foram coloridos em cinza, enquanto aqueles que tiveram níveis aumentados foram enquadrados em retângulos cinzas. Figura adaptada de Fairlamb; Cerami.⁷⁶..... 153
- Figura 43 - Metabolismo lipídico alterado em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. (a) Elongação de ácidos graxos. Legenda: Elo, elongase. (b) ácidos graxos poliinsaturados, $x\Delta^y$, onde $x\Delta$ indica o número de insaturações e y a posição da dupla ligação na cadeia hidrocarbônica.

Legenda: DPA, ácido docosapentanóico; DHA, ácido docosaheptaenóico; EPA, ácido eicosapentaenoico. (c) metabolismo de esfingolípídios. Metabólitos com níveis diminuídos após o tratamento foram coloridos em cinza, enquanto aqueles que tiveram níveis aumentados foram enquadrados em retângulos cinzas. Adaptado de Ramakrishnan et al.¹⁸⁹ e Livore et al.¹⁹⁰. 154

Figura 44 - Compilação dos efeitos multi-alvo da SRT em parasitas *Leishmania*. Sertralina atravessa membrana plasmática causando (1) ligeira despolarização do $\Delta\psi_p$ onde se acumula na mitocôndria produzindo (2) desacoplamento da cadeia respiratória, (3) inibição da síntese de ATP, (4) aumento fluxo de elétrons com produção de ROS, e (5) despolarização do $\Delta\psi_m$. A tempos mais longos de incubação, o aumento do estresse oxidativo é amplificado pela (6) diminuição da capacidade do metabolismo tiol-redox, produzindo um desarranjo metabólico generalizado marcado pela severa (7) depleção do pool intracelular de aminoácidos e (8) deterioração do metabolismo energético. Flechas sólidas em preto representam aumento, enquanto flechas tracejadas representam diminuição do parâmetro correspondente. 155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade biológica do fármaco CBP contra parasitas <i>Leishmania (L.) infantum</i> (CE ₅₀) e citotóxica (CC ₅₀) em células de mamífero NCTC	82
Tabela 2 - Número de features detectados e metabólitos confirmados após o tratamento de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> com o fármaco CBP	99
Tabela 3 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> após incubação de 12 horas com o fármaco CBP	101
Tabela 4 - Atividade biológica do fármaco SRT contra parasitas <i>Leishmania (L.) infantum</i> (CE ₅₀) e citotóxica (CC ₅₀) em células de mamífero NCTC ...	125
Tabela 5 - Features detectados e identificados após alterações do metabolismo de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> induzidas pelo fármaco SRT ao longo dos diferentes passos da seleção estatística.....	137
Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> após incubação de 12 horas com o fármaco SRT	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	(<i>adenosine diphosphato</i>) difosfato de adenosina
AGs	ácidos graxos
AmB	anfotericina B
AMP	(<i>adenosine monophosphate</i>) monofosfato de adenosina
APCI	(<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>) Ionização Química a Pressão Atmosférica
ATP	(<i>adenosine triphosphate</i>) trifosfato de adenosina
ATPase	ATP sintase
ATP _c	ATP citoplasmático
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CADs	(<i>cationic amphiphilic drugs</i>) Fármacos Anfifílico Catiônicos
CBP	ciclobenzaprina
CC ₅₀	concentração citotóxica 50%
CE ₅₀	concentração efetiva 50%
CFSE	(<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>) carboxifluoresceína succinimidil éster
CG-EM	(<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>) Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CID	(<i>collision induced dissociation</i>) Dissociação Induzida por Colisão
CLAE-MS	(<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>) Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
CQ	controle de qualidade
CYP51	esterol 14 α -demetilase
DAPI	(<i>4'6 diamidino-2- phenylindole</i>) 4',6-diamidino-2-fenilindol
DL ₅₀	dose letal 50%
DMSO	(<i>dimethyl sulfoxide</i>) dimetilsulfóxido
DNA	(<i>deoxyribonucleic acid</i>) ácido desoxirribonucleico

DRP	desvio padrão relativo
EC-EM	(<i>Capillary Electrophoresis coupled to Mass Spectrometry</i>) Eletroforese Capilar acoplada a Espectrometria de Massas
ELs	esfingolipídios
EM	(<i>mass spectrometry</i>) Espectrometria de Massa
ERAD	(<i>ER-associated degradation</i>), sistema de degradação associado ao RE
ESI	(<i>electrospray ionisation</i>) Ionização por <i>Eletrospray</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
GFLs	glicerofosfolipídios
GLs	glicerolipídios
GSH	glutathione reduzida ou glutathione
GSSG	glutathione oxidada ou glutathione dissulfeto
GTP	(<i>guanosine triphosphate</i>) trifosfato de guanosina
H ⁺	próton
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IE	(<i>electron ionization</i>) ionização por elétrons
IMAOs	Inibidores da Monoamina Oxidase
IS	Índice de Seletividade
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
KCN	(<i>potassium cyanide</i>) cianeto de potássio
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
MFE	<i>Molecular Feature Extraction</i>
MM	massa molar
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

MΦ	Macrófagos peritoneais de BALB/c
MΦ	macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c
NADPH	(<i>dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i>) nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ND	não determinado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPLS-DA	(<i>Orthogonal Partial Least Squares Regression Analysis</i>) Análise Discriminante pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais Ortogonal
PBS	(<i>phosphate buffered saline</i>) Tampão fosfato-salina
PCA	(<i>Principal Component Analysis</i>) Análises de Componentes Principais
PI	(<i>propidium iodide</i>) Iodeto de propídio
PLS-DA	(<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>) Análise de Discriminante Linear com Mínimos Quadrados Parciais
PSP	(<i>purine salvage pathway</i>) Via de Aquisição de Purinas
Rd123	Rodamina 123 [cloreto 2-(6-amino-3-imino-3H-xanten-9-il) ácido benzoico metil éster]
RE	retículo endoplasmático
RMN	(<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) Ressonância Magnética Nuclear
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>) ácido ribonucleico
ROS	(<i>reactive oxygen species</i>) espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	(<i>sodium dodecyl sulfate</i>) dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SRT	sertralina
T[S] ₂	tripanotiona oxidada ou tripanotiona dissulfeto
T[SH] ₂	tripanotionada reduzida ou tripanotiona ditiol
TCA	(<i>tricarboxylic acid cycle</i>) Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
T _M	tempo de migração
TMCS	(<i>trimethylsilyl chloride</i>) trimetilclorosilana

TOF	<i>(time of flight)</i> tempo de voo
T _R	tempo de retenção
TryR	tripanotiona redutase
UPR	<i>(Unfolded Protein Response)</i> Resposta as Proteínas Não Enoveladas
VIP	<i>(variable importance projection)</i>
λ_{ex}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação

*Em muitas abreviaturas usadas, manteve-se a designação anglo-saxónica dado o seu carácter universal; nesses casos, a designação é apresentada em itálico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Leishmanioses: um problema de saúde pública mundial	24
1.2	Ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i>	25
1.3	Quimioterapia disponível para o tratamento das leishmanioses	27
1.4	Descoberta de alternativas quimioterápicas para o tratamento das leishmanioses: estratégias de longo, médio e curto prazo.....	29
1.5	Perspectivas de reposicionamento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses	31
1.6	Reposicionamento de fármacos: alvos terapêuticos e mecanismo de ação	32
1.6.1	Membrana plasmática de <i>Leishmania</i>	33
1.6.2	Metabolismo de purinas de <i>Leishmania</i>	34
1.6.3	Mitocôndria de <i>Leishmania</i>	34
1.6.4	Retículo endoplasmático (RE).....	37
1.6.5	Via biossintética de esteróis	38
1.6.6	Metabolismo de poliaminas e sistema de defesa tiol contra o estresse oxidativo	39
1.6.7	Maquinaria de replicação, transcrição e tradução	40
1.7	Metabolômica versus parasitas <i>Leishmania</i>	42
1.8	Análises metabolômicas não dirigidas: complexidade do metaboloma.....	45
1.9	Plataformas analíticas mais utilizadas.....	45
1.9.1	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN).....	45
1.9.2	Espectrometria de massas (EM)	46
1.10	Fluxo de trabalho de estudos metabolômicos não dirigidos para elucidação de mecanismo de ação.....	51
1.11	Fármacos antidepressivos e seu potencial anti- <i>Leishmania</i>	52
1.11.1	Fármaco ciclobenzaprina.....	55
1.11.2	Fármaco sertralina	58
2	OBJETIVOS.....	61
2.1	Objetivos específicos.....	61

3	MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1	Fármacos e reagentes.	62
3.2	Procedimentos gerais para manutenção das cepas.	62
3.3	Parasitas <i>Leishmania</i> e células de mamífero	63
3.4	Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos fármacos CBP e SRT contra formas promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	63
3.5	Determinação da concentração citotóxica 50% (CC ₅₀) dos fármacos CBP e SRT em células de mamífero NCTC (clone L929).....	64
3.6	Determinação da concentração efetiva (CE ₅₀) dos fármacos CBP e SRT em amastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	64
3.7	Microscopia confocal de macrófagos infectados após o tratamento com fármaco CBP	65
3.8	Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> para desenvolvimento dos ensaios de mecanismo de ação.....	65
3.9	Variação dos níveis de ATP citoplasmático (ATP _c) em promastigotas 3-Luc <i>Leishmania donovani</i>	66
3.10	Avaliação dos níveis intracelulares de Ca ⁺² de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	67
3.11	Avaliação dos efeitos sobre a membrana plasmática de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	67
3.12	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψ _m) de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	68
3.13	Determinação do potencial de membrana mitocondrial por microscopia confocal	69
3.14	Determinação da produção de ROS	69
3.15	Determinação das taxas de consumo de oxigênio mitocondrial	70
3.16	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	70
3.17	Análises estatísticas dos estudos de mecanismo ação	71
3.18	Estudo metabolômico das alterações bioquímicas induzidas pelos fármacos CBP e SRT	71
3.18.1	Tratamento promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	71
3.18.2	Obtenção do extrato metabólico	72
3.18.3	Controle de qualidade (CQ).....	72
3.18.4	Análises CG-EM	72
3.18.5	Análises CLAE-EM.....	74

3.18.6	Análises EC-EM	75
3.18.7	Extração, alinhamento e obtenção da uma matriz de dados	76
3.18.8	Tratamento dos dados metabolômicos	77
3.18.9	Análises estatísticas dos estudos metabolômicos	78
3.18.10	Determinação da identidade metabólica dos features	79
3.18.11	Confirmação da identidade dos metabólitos.....	80
3.18.12	Interpretação biológica dos resultados multiplataforma analítica	81
4	RESULTADOS: FÁRMACO CICLOBENZAPRINA.....	82
4.1	Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotóxica do fármaco CBP	82
4.2	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> para desenvolvimento dos ensaios de mecanismo de ação do fármaco CBP	83
4.3	Avaliação dos níveis de ATP _c de promastigotas 3-Luc de <i>Leishmania donovani</i> após incubação com fármaco CBP	84
4.4	Avaliação dos níveis de Ca ⁺² de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> após incubação com fármaco CBP	85
4.5	Avaliação das alterações da membrana plasmática de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> induzidas pelo fármaco CBP	86
4.6	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas incubados com fármaco CBP determinada por citometria de fluxo.....	87
4.7	Avaliação $\Delta\psi_m$ de promastigotas incubados com fármaco CBP determinada por microscopia confocal.....	88
4.8	Taxas de consumo de oxigênio de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com fármaco CBP	89
4.9	Produção de ROS mitocondrial em promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com CBP	91
4.10	Microscopia eletrônica (TEM) de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com CBP	91
4.11	Estudo metabolômico das alterações metabólicas induzidas pelo fármaco CBP	92
4.12	Estudo metabolômico do fármaco CBP: validação analítica	94
4.13	Estudo metabolômico do fármaco CBP: filtragem, escalonamento dos dados e validação quimométrica	95
4.14	Estudo metabolômico do fármaco CBP: análises estatísticas e confirmação dos metabólitos	98

4.15	Estudo metabolômico do fármaco CBP: resultados multiplataforma	99
4.16	Metabolômica: interpretação biológica	113
4.17	Discussão	115
5	RESULTADOS: FÁRMACO SERTRALINA	125
5.1	Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotóxica do fármaco SRT	125
5.2	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> para desenvolvimento dos ensaios de mecanismo de ação do fármaco SRT	126
5.3	Variação dos níveis de ATP _c de promastigotas 3-Luc <i>Leishmania donovani</i> após incubação com fármaco SRT	126
5.4	Avaliação das alterações da membrana plasmática de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> induzidas pelo fármaco SRT	127
5.5	Avaliação do potencial de $\Delta\psi_m$ de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com fármaco SRT	128
5.6	Taxas de consumo de oxigênio de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com fármaco SRT	130
5.7	Produção de ROS mitocondrial em promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com SRT	132
5.8	Microscopia eletrônica (TEM) de promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> incubados com o fármaco SRT	133
5.9	Estudo metabolômico das alterações bioquímicas induzidas pelo fármaco SRT em promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i> : validação, seleção e confirmação de metabólitos alterados.	134
5.10	Resultados multiplataforma das alterações metabólicas induzidas pelo fármaco SRT.....	137
5.11	Interpretação biológica dos resultados multiplataforma do estudo metabolômico do fármaco SRT.....	148
5.12	Discussão.....	156
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	162
7	CONCLUSÕES.....	164
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
	APÊNDICE A – EC-EM.....	183
	APÊNDICE B – CLAE-EM/EM	190
	APÊNDICE C – APROVAÇÃO CEUA	196

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses: um problema de saúde pública mundial

Leishmanioses incluem um complexo grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de parasitas protozoários do gênero *Leishmania* (família Tripanosomatidae, ordem Kinetoplastida). A patologia humana associada a estas doenças depende principalmente da espécie infectante e do estado imunológico do hospedeiro, resultando em diferentes graus de morbidade e mortalidade que variam desde a forma cutânea (LC) até a forma visceral (LV), fatal em 100% dos casos não tratados (Figura 1). Dados epidemiológicos são mandatórios em apenas 34% dos países endêmicos, e mesmo subestimada, as leishmanioses contam com 10-12 milhões de pessoas infectadas, até 50.000 óbitos por ano, e cerca de 350 milhões de pessoas com risco de adquirir a infecção nos 98 países endêmicos^{1,2}.

Figura 1 - Formas clínicas da leishmaniose: (a) leishmaniose cutânea (LC) caracterizada por úlceras na pele; (b) leishmaniose mucocutânea (LMC) caracterizada por lesões que levam a destruição total ou parcial das mucosas do nariz, boca e garganta e (c) leishmaniose visceral (LV) caracterizada por episódios irregulares de febre, substancial perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia. Fonte da imagem: <http://globalhealthvet.files.wordpress.com/2010/10/leishmania-clin-appearance.jpg>

O Brasil concentra 90% dos casos descritos de LV Americana (LVA) e está entre os seis países com maior incidência de LV no mundo^{2,3}. O aumento exponencial da distribuição das leishmanioses é uma tendência global, bem ilustrada pelos dados epidemiológicos nacionais: entre os anos de 2000 a 2015, houve um aumento de 69,2% do número de casos de LVA, enquanto a letalidade dobrou apesar da disponibilidade de tratamento terapêutico no sistema público de saúde⁴. O número de casos de coinfeção com HIV saltou de 2,5% (2005) para 6,6% (2011)². A expansão também tem sido geográfica, as leishmanioses perderam o caráter rural e tradicionalmente endêmico de estados do nordeste brasileiro, para uma vertiginosa expansão em áreas urbanas mais ao sul, como estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul³. Mudanças climáticas e outras alterações ambientais, potencialmente têm gerado preocupação quanto a expansão do hábitat geográfico de insetos vetores e quanto aos índices de transmissão das leishmanioses no futuro^{3,5}.

Apesar do impacto patológico e socioeconômico humano, as leishmanioses permanecem como uma das doenças mais negligenciadas do mundo⁶ e, portanto, representam um grave problema de saúde pública mundial, e principalmente nacional.

1.2 Ciclo de transmissão da *Leishmania*

O parasitismo intracelular é um processo em que um parasita invade e prolifera dentro de uma célula hospedeira. No caso de parasitas *Leishmania*, o sucesso do parasitismo se sustenta pela diferenciação entre duas formas morfológicas altamente adaptadas aos microambientes encontradas ao longo do ciclo de transmissão. A forma promastigota extracelular flagelada é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, enquanto a forma amastigota aflagelada, intracelular obrigatória, é encontrada em células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero, principalmente em macrófagos³.

A transmissão da LVA inicia-se através da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos infectados, e inoculação de promastigotas *Leishmania (L.) infantum*. No Brasil duas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* estão relacionadas com

a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, insetos conhecidos popularmente, como mosquito palha, birigui, entre outros³. Dentro do inseto vetor, formas promastigotas se diferenciam em formas infectantes metacíclicas no intestino anterior do inseto, prontas para transmissão. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita estes promastigotas que são então fagocitados por macrófagos do hospedeiro, e uma vez dentro do vacúolo parasitóforo, os promastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas aflagelados. Por sua vez, formas amastigotas sofrem replicação, rompem a célula do hospedeiro permitindo a reinfecção do local de inoculação e disseminação de parasitas através do sistema vascular e linfático, eventualmente infiltrando medula óssea, fígado e baço. Esse ciclo de transmissão é completo quando macrófagos infectados são adquiridos por um novo inseto vetor durante o repasto sanguíneo, e amastigotas são convertidos para promastigotas procíclicos, dentro do intestino médio do inseto, onde o ciclo recomeça⁷ (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo de transmissão de parasitas *Leishmania (L.) infantum*, agente etiológico da LVA. Adaptado de Kaye e Scott⁷.

1.3 Quimioterapia disponível para o tratamento das leishmanioses

Atualmente, nenhuma vacina humana para leishmanioses encontra-se comercialmente disponível⁸. Isto torna a quimioterapia, constituída por um número restrito de fármacos, única no tratamento destas enfermidades.

Antimônios pentavalentes (estibogluconato de sódio e antiomoniato de meglumina) correspondem em muitos países, a primeira linha de tratamento das leishmanioses. Apesar do uso clínico por mais de 70 anos, alternativas há muito tempo vem sendo buscadas devido ao longo período de administração parenteral (>28 dias), eficácia variável contra LV e LC, severos efeitos adversos e significativa emergência de resistência em áreas endêmicas⁹.

Pentamidina foi introduzida como fármaco para o tratamento das leishmanioses em 1952 e desde então seu uso clínico tem sido limitado a segunda linha de tratamento devido à sua alta toxicidade e restrita aos casos de comprovada ineficácia do tratamento antimonial¹⁰.

Anfotericina B (AmB), um fármaco antifúngico foi descoberta como leishmanicida em 1960 por pesquisadores brasileiros¹¹. Desde então tem sido altamente efetiva em casos resistência ao tratamento antimonial e, especialmente em infecções mucocutâneas. Contudo AmB é um fármaco restrito devido a toxicidade, sendo infundido de forma parenteral lenta (>4 horas)¹⁰. Na década de 90, formulações lipídicas puderam contornar os inconvenientes da AmB melhorando a penetração tecidual e a efetividade de doses menores, com consequente redução da toxicidade¹². Porém, alto custo e requerimento de controle de temperatura durante o transporte, restringem o seu uso generalizado, principalmente a locais altamente endêmicos e de difícil acesso¹³. Países europeus e os EUA tornaram AmB lipossomal o tratamento padrão⁹, contudo esta é uma realidade distante do uso em larga escala na maioria dos países endêmicos.

Miltefosina, uma hexadecilfosfocolina, corresponde ao único fármaco oral disponível na clínica para o tratamento das leishmanioses, e apenas pouco mais de uma década após sua introdução em 2002, estima-se uma falha terapêutica de aproximadamente 20% na Índia^{14,15}. Resistência contra miltefosina em parasitas *Leishmania* tem sido facilmente induzida *in vitro*^{16,17} indicando que casos de resistência em pacientes possam ser uma questão de tempo. Não existem dados da eficácia da miltefosina no tratamento de LVA causada pela espécie *Leishmania (L.) infantum* encontrada no Brasil¹⁸. Outras limitações da miltefosina são alto custo, necessidade de monitoramento de efeitos adversos e teratogenicidade¹⁸.

Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol, foi introduzida na clínica em 2006 para tratamento de LV e LC na Índia, contudo sua eficácia tem sido bastante variável, com baixos índices em países como Sudão (14%), Quênia (80%) e Etiópia (75-96%), de maneira que o uso terapêutico da paromomicina tem sido explorado principalmente em regimes de combinação terapêutica¹⁸. Similar a miltefosina, parasitas resistentes a paromomicina tem sido facilmente obtidos *in vitro*^{13,19}. Novamente, não existem dados da eficácia da paromomicina em infecções por *Leishmania (L.) infantum*¹⁸.

Em resumo, a eficácia da quimioterapia disponível para tratamento de leishmanioses é dependente da espécie infectante e bastante variável ao redor do mundo. Limitações como toxicidade, alto custo, larga duração, internações hospitalares e acompanhamento dos severos efeitos adversos amplamente contribuem para baixa adesão dos tratamentos disponíveis. O risco de desenvolvimento de resistência é uma preocupação constante em vista da ausência de fármacos alternativos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), pesquisas endereçadas à descoberta de novos fármacos orais, mais seguros e eficazes com curto regime de tratamento são de alta prioridade. Isto é especialmente importante para o Brasil uma vez que espécies endêmicas nem sempre são contempladas pela quimioterapia disponível, tornando a pesquisa nacional de suma relevância.

1.4 Descoberta de alternativas quimioterápicas para o tratamento das leishmanioses: estratégias de longo, médio e curto prazo

Apesar da menor experiência no processo de desenvolvimento de novos fármacos comparado as indústrias farmacêuticas, universidades e institutos públicos de pesquisa têm liderado a produção de patentes de novos compostos e alternativas quimioterápicas para leishmanioses entre 1994 e 2014²⁰. Uma circunstância intimamente relacionada ao desinteresse da indústria deve-se a perspectiva de um mercado pouco lucrativo associado a enfermidades relacionadas a pobreza como as leishmanioses.

Alternativas quimioterápicas para o tratamento das leishmanioses podem ser favorecidas por diferentes estratégias como: (i) descoberta de novos fármacos, (ii) reposicionamento de fármacos aprovados²¹ ou (iii) combinação terapêutica^{22,23}, estratégias de longo, médio e curto prazo, respectivamente.

Novos fármacos podem ser encontrados por duas abordagens: triagens direcionadas a alvos moleculares específicos do parasita ou triagens fenotípicas. A estratégia baseada em alvos moleculares é extensivamente usada nas indústrias farmacêuticas. Nessas triagens, um composto ativo (*hit compound*) é selecionado frente a inibição ou antagonismo de um único alvo molecular validado. Este composto pode então ser quimicamente otimizado quanto as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), assim como outras propriedades físico-químicas, resultando em um *lead compound* com eficácia e um mecanismo de ação definido, capaz de migrar para estudos pré-clínicos, toxicológicos e finalmente clínicos²⁴. Infelizmente, poucos alvos terapêuticos foram rigorosamente validados em parasitas *Leishmania*¹⁰ restringindo enormemente esta abordagem. Logo, a triagem fenotípica tem recebido mais ênfase na descoberta de fármacos para leishmanioses.

Na triagem fenotípica, compostos são selecionados contra o parasita e não apenas um alvo molecular. Em infecções com parasitas *Leishmania*, como padrão, as triagens fenotípicas são realizadas contra a forma amastigota intracelular, a forma morfológica relevante a doença humana. Esta triagem não apenas permite a seleção dos compostos ativos como também a rápida eliminação de compostos citotóxicos para as células do hospedeiro²⁵. Considerando a variedade de múltiplos alvos moleculares e vias de sinalização disponíveis nesse cenário, o viés desta abordagem é o esforço subsequente na identificação de um alvo molecular ou mecanismo de ação, uma tarefa comumente complexa e demorada²⁶.

Em contraste com o longo e dispendioso processo de descoberta de moléculas inéditas, a combinação terapêutica tem sido uma resposta rápida principalmente em regiões de alta resistência. O sinergismo entre fármacos com diferentes alvos terapêuticos pode produzir resultados importantes como aumento da eficácia, redução

dos efeitos adversos associados a monoterapia, duração e custo do tratamento, assim como a diminuição do risco de indução de resistência^{22,27}.

A estratégia de reposicionar um fármaco aprovado, independentemente de seu escopo clínico de indicação, para o tratamento das leishmanioses, proporciona a diminuição de tempo e custos requeridos comparado ao desenvolvimento de um novo fármaco²⁸. Propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas como perfis de toxicidade, biodisponibilidade e estabilidade do fármaco, já foram intensamente examinadas dentro de margens de segurança bem definidas. O desafio de uma nova indicação frequentemente está na dosagem e capacidade de liberação para o novo alvo terapêutico²⁹.

A relevância da estratégia de reposicionamento de fármacos para o tratamento das leishmanioses é evidente quando 100% da quimioterapia disponível emergiu do reposicionamento: antimônio, AmB, miltefosina, ou paromomicina, por exemplo, foram primeiramente desenvolvidas como fármacos eméticos²⁵, antifúngico³⁰, anticâncer³¹ ou bactericida³², respectivamente.

1.5 Perspectivas de reposicionamento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses

Apesar da possibilidade de uma triagem de reposicionamento racional, a partir de similaridades moleculares com fármacos conhecidamente ativos, triagem *in silico* em alvos moleculares validados, ou a partir de atividades descritas em organismos relacionados, a triagem empírica de todos os fármacos disponíveis no mercado é factível.

Um número muito variável de 3936 até 1357 fármacos aprovados para uso humano pode ser encontrado na literatura^{33,34}. Essa variação decorre basicamente da definição adotada por autores e agências reguladoras ao redor do mundo para descrever o termo fármaco³³. Tomando como exemplo uma revisão publicada em 2006, que considerou apenas fármacos aprovados pelo FDA nos EUA, cerca de 1204 fármacos de estrutura molecular única, conhecida e menor de 900 Da, estavam disponíveis

quando diferentes formulações para um mesmo fármaco, sais, vitaminas, agentes de imagens entre outros foram excluídos de um total de 21 mil produtos farmacológicos aprovados. Dentre estes fármacos com massa molecular pequena, 803 eram de administração oral e, portanto, de especial interesse no reposicionamento para o tratamento das leishmanioses, como recomendado pela OMS. Ainda, cerca de 421 eram fármacos de administração parenteral, 275 de administração tópica e cerca de 16% pró-fármacos³⁴.

Vale a menção de que as perspectivas de reposicionamento vão muito além destes números. Muitos fármacos em potencial nunca alcançaram testes clínicos e menos de 15% dos que entram para os estudos de desenvolvimento clínico recebem aprovação, apesar da maioria deles serem considerados seguros³⁵. Portanto, a abertura e acessibilidade das bibliotecas de compostos de indústrias farmacêuticas certamente iniciará uma nova era no reposicionamento de fármacos.

1.6 Reposicionamento de fármacos: alvos terapêuticos e mecanismo de ação

O reposicionamento de fármacos está intrinsicamente relacionado a um certo nível de promiscuidade molecular que permita interações secundárias fora do alvo terapêutico para qual o fármaco foi desenvolvido e portanto novo mecanismo de ação³⁶.

Acredita-se que aproximadamente 324 alvos moleculares sejam explorados farmacologicamente por todas as classes de fármacos aprovados. A maioria deles (60%) é localizada na superfície celular, enquanto 22%, são proteínas intracelulares³⁴. Parasitas *Leishmania* apresentam considerável diferença na organização celular comparado a célula do hospedeiro mamífero; contudo poucos alvos terapêuticos foram validados até o momento. Enzimas, metabólitos, proteínas ou organelas inteiras do parasita, ausentes ou estritamente diferentes de sua contraparte no hospedeiro mamífero, são considerados alvos terapêuticos ideais³⁷.

Todos os fármacos registrados para leishmanioses foram selecionados empiricamente, e não por meio de um extensivo estudo das características metabólicas

do parasita *versus* atividade farmacológica letal dos mesmos. Consequentemente, o mecanismo de ação destes fármacos é pouco conhecido, e geralmente limitado a uma suposição de alvo, ou descrito por uma série de interações intracelulares^{10,38}, como é o caso do fármaco miltefosina. A base molecular do mecanismo leishmanicida da miltefosina é considerada multialvo e descrita a partir da (i) inibição da biossíntese de fosfatidilcolina (PC), transporte de colina³⁹, inversão da proporção de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (PE)⁴⁰, (ii) disfunção mitocondrial como inibição da citocromo oxidase⁴¹, (iii) inibição do metabolismo de poliaminas e tripanotona¹⁷, (iv) indução de morte celular por mecanismo apoptose-like⁴² e imunomodulação⁴³.

A seguir, uma breve descrição dos principais alvos terapêuticos descritos para a seleção de fármacos em *Leishmania* incluindo aqueles explorados pela quimioterapia atualmente disponível.

1.6.1 Membrana plasmática de *Leishmania*

A membrana plasmática de parasitas *Leishmania* difere do hospedeiro mamífero em composição lipídica e funcionalidades. Nesses parasitas, o ergosterol substitui o colesterol das células do hospedeiro como principal esteroide da bicamada lipídica^{40,44}. A criação e manutenção de um forte gradiente eletroquímico na membrana plasmática nestes parasitas é restrita a bombas H⁺-ATPases tipo P semelhantes às aquelas encontradas em leveduras e fungos⁴⁵. De fato, foi a similaridade da membrana plasmática de *Leishmania* à de fungos e leveduras que permitiu o reposicionamento do antifúngico AmB para o tratamento das leishmanioses. A interação da AmB com o ergosterol da membrana de *Leishmania*, leva a formação de poros transmembrana estimados em até 4Å de raio, que alteram a permeabilidade de cátions, água e, solutos maiores como glicose, levando a morte do parasita pela destruição da integridade da membrana plasmática⁴⁶. Mesmo alterações funcionais, como a inibição do gradiente eletroquímico de prótons, são deletérias, visto que tal gradiente é responsável pela do transporte ativo de muitos metabólitos através da membrana plasmática, principalmente aqueles que não são sintetizados endogenamente pelo parasita⁴⁷.

1.6.2 Metabolismo de purinas de *Leishmania*

Leishmania não pode sintetizar purina *de novo* e, portanto, é absolutamente dependente da via de aquisição de purinas (PSP) formada tanto por transportadores de membrana como por enzimas envolvidas em reações de interconversão e incorporação de uma variedade de purinas adquiridas. Purinas são de importância vital para todos os organismos vivos: nucleotídeos purínicos funcionam como precursores de ácidos nucléicos (DNA e RNA), moduladores da atividade de enzimas, constituintes de co-substratos (exemplo, ATP, GTP, NADH e coenzima A) e mensageiros secundários (exemplo, AMP cíclico)⁴⁸.

A importância da via PSP em parasitas *Leishmania* foi destacada pela tentativa de reposicionamento do fármaco alopurinol oficialmente registrado para o tratamento de excesso de ácido úrico nas articulações (“gota”). Este fármaco entrou para estudos clínicos de LV e LC na década de 80 devido a sua analogia estrutural com a hipoxantina como substrato da enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) do parasita. O alopurinol é metabolizado para seu correspondente nucleotídeo de alopurinol e incorporado no DNA do parasita levando a interrupção da síntese de RNA e proteínas⁴⁸. Devido a restrições nas propriedades farmacocinéticas, estudos clínicos foram descontinuados⁴⁹ e, atualmente o alopurinol é usado no tratamento de leishmaniose canina⁵⁰.

A versatilidade da via PSP com múltiplos transportadores simultaneamente ativos e diversidade de enzimas de interconversão, sugerem a inibição de múltiplas enzimas por uma combinação terapêutica uma estratégia mais efetiva⁴⁸.

1.6.3 Mitocôndria de *Leishmania*

Enquanto milhares de mitocôndrias podem ser detectadas em células de mamífero, uma única organela ramificada é observada em parasitas *Leishmania*.

A mitocôndria é o principal local de produção de energia neste parasita, independente das adaptações metabólicas que ocorrem ao longo do ciclo digenético.

Formas amastigotas são adaptadas a baixa tensão de oxigênio do hospedeiro⁵¹ e utilizam vias metabólicas mitocondriais como β -oxidação⁵², enquanto formas promastigotas dependem essencialmente da cadeia respiratória mitocondrial para produção de energia⁵³.

Localizada na membrana mitocondrial interna, a cadeia respiratória é responsável pela criação e manutenção do gradiente eletroquímico de prótons mitocondrial utilizado na síntese de ATP. Funcionalmente, reações de oxidação de substratos fornecidos pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) provêm elétrons que são transportados entre os complexos II-IV da cadeia respiratória fornecendo a energia necessária para exportar prótons para fora da matriz mitocondrial contra seu gradiente de concentração. Diferente de eucariotos superiores, a contribuição do complexo I em *Leishmania* é limitada ao transporte de elétrons devido à ausência das subunidades desse complexo envolvidas na extrusão de prótons⁵⁴. Portanto sua contribuição para a fosforilação oxidativa é negligenciável.

O processo de extrusão de prótons leva ao acúmulo no espaço intermembrana e a formação do gradiente eletroquímico ou força próton motriz composta pelo gradiente elétrico ($\Delta\psi_m$) criado pelo fluxo de elétrons e gradiente químico (ΔpH) criado pelo fluxo de prótons. A membrana mitocondrial interna é comumente impermeável a prótons, os quais retornam para a matriz mitocondrial apenas por canais específicos (F_0 da ATP sintase). É a força próton motriz que dirige os prótons de volta para a matriz, a favor do gradiente de concentração, liberando energia que é utilizada para síntese de ATP⁵⁵ (Figura 3). Em mitocôndrias energizadas, as reações de oxidação de substratos são acopladas a fosforilação de ADP no complexo V ou ATP sintase (ATPase), em outras palavras, pouca oxidação ocorre na ausência de síntese de ATP em função do controle respiratório⁵⁶.

Figura 3 - Cadeia respiratória mitocondrial de *Leishmania*. Complexo I: NADH:ubiquinona oxidoreductase (envolvido apenas no transporte de elétrons); complexo II: succinato desidrogenase; complexo III: ubiquinona citocromo c oxidoreductase; complexo IV: citocromo oxidase; complexo V: ATP sintase (ATPase). Linhas em azul representam o fluxo de elétrons enquanto linhas rosas representam a extrusão de prótons. Figura adaptada de Nelson e Cox⁵⁷.

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) corresponde a componente elétrica da força próton motriz criada na cadeia respiratória e, portanto, é essencial para a sobrevivência celular do parasita uma vez que mantém a fosforilação oxidativa, dirige a síntese de ATP, controla os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e homeostase de Ca^{+2} intracelular. Mesmo em condições fisiológicas normais, os complexos da cadeia respiratória mitocondrial correspondem ao principal local de produção ROS cuja produção excessiva induz estresse oxidativo culminando em morte celular, quando não controlada⁵⁸.

Mitocôndria também executa função central no processo de apoptose-like de *Leishmania*. Diferente do processo apoptótico descrito em eucariotos superiores, onde a clivagem de caspases representam um passo chave no processo, as metacaspases mitocondriais de *Leishmania* não sofrem proteólise sobre estresse oxidativo e alterações tais como inchaço mitocondrial, despolarização $\Delta\psi_m$ e liberação de citocromo c, correspondem aos sinais mais recorrentes do processo de apoptose-like destes parasitas⁵⁸⁻⁶⁰.

Em consequência da importância funcional e características únicas, a mitocôndria representa o alvo mais recorrente entre compostos leishmanicidas. Contudo é importante manter em mente que, alterações mitocondriais induzidas, podem ser decorrentes tanto de um efeito primário direto ou de lesões secundárias causadas pela perda da viabilidade celular, engatilhada por outro componente celular ou via metabólica⁵⁸. Por exemplo, estresse de retículo endoplasmático (RE) foi demonstrado aumentar os níveis de Ca^{+2} citoplasmático causando despolarização $\Delta\psi_m$ e redução dos níveis de ATP⁶¹, típicos efeitos descritos em disfunções mitocondriais primárias.

1.6.4 Retículo endoplasmático (RE)

O RE em parasitas *Leishmania* compreende o envoltório nuclear e um sistema de cisternas ou membranas tubulares que estendem ao longo do corpo celular frequentemente próximos a membrana plasmática⁶². Como em outros eucariotos, o RE de *Leishmania* é uma organela multifuncional onde o importante passo de enovelamento, modificação e transporte de proteínas para outros compartimentos da via secretória ocorre. Suas funções ainda incluem regulação da sinalização de Ca^{+2} e síntese de lipídios. Parasitas *Leishmania*, assim como parasitas *Trypanosomas* e outros eucariotos, mantém baixas concentrações intracelulares de Ca^{+2} livre no citoplasma e alterações desta concentração tem sido mostrado induzir morte celular, senão regulado⁶³.

Recentemente, a capacidade limitada de resposta adaptativa ao estresse de RE de parasitas *Leishmania* e *Trypanosoma brucei* foi destacada como um emergente alvo terapêutico⁶⁴.

No hospedeiro mamífero, a ação de xenobióticos que afetam a performance do RE, iniciam três complexas vias de sinalização transmembrana, Ire1, PERK e Atf6, conhecidas coletivamente como resposta as proteínas não enoveladas (UPR). Tais vias são responsáveis pela ativação de programas de expressão gênica que levam a manutenção da homeostase do RE⁶⁵. Por sua vez, análises *in silico* em parasitas protozoários, incluindo parasitas *Leishmania*, revelaram a ausência de IRE1 e ATF6,

principais fatores regulatórios da resposta transcricional de UPR em eucariotos superiores. Em contraste, o único sensor UPR presente em tripanossomatídeos foi relacionado a via de sinalização PERK⁶⁴. Contudo, nesses parasitas a enzima PERK parece assumir uma função diferenciada daquela do hospedeiro.

Em eucariotos superiores, a PERK quinase, uma enzima transmembrana residente no RE, quando ativada após detecção do estresse de RE, fosforila o fator de iniciação de tradução eIF2 α , levando a inibição de tradução de RNAm e, consequentemente reduz a síntese global de proteínas e seu fluxo de entrada no RE para aliviar o estresse⁶⁵. Recentemente, um homólogo PERK quinase foi caracterizado em *Leishmania (L.) infantum* como uma proteína transmembrana de RE, capaz de sentir o estresse de RE através do domínio N-terminal. Contudo, promastigotas mutantes PERK^{-/-} foram prejudicados na fosforilação de eIF2 α em resposta ao estresse de RE, e deficientes no processo de diferenciação para amastigotas, sugerindo a importância da enzima PERK quinase/fosforilação eIF2 α no desenvolvimento de *Leishmania*⁶⁶. Entretanto sua direta função na inibição traducional durante a resposta UPR ainda não foi testada.

O homólogo PERK encontrado em *Trypanosoma brucei*, TbeIF2K2, foi mostrado fosforilar eIF2 α *in vitro*, entretanto sua localização foi estabelecida na bolsa flagelar e compartimento endossomal, sugerindo relevância funcional na detecção de proteínas ou transporte de nutrientes⁶⁷, mas possivelmente é incapaz de detectar estresse de RE. Estudos sobre estresse de RE endoplasmático e resposta UPR em tripanossomatídeos são limitados, contudo há um emergente conceito da letalidade e irreversibilidade desta rota de morte nesses parasitas e seu potencial como alvo quimioterápico.

1.6.5 Via biossintética de esteróis

A enzima estero 14 α -demetilase (CYP51, LdBPK_111100.1) da via biossintética de esteróis tem sido foco de considerável interesse como um novo alvo terapêutico em parasitas *Leishmania*.

Estudos de nocaute genético⁶⁸, inibição de crescimento por meio de inibidores azólicos específicos para CYP51⁶⁹ e a ausência de similaridade desta enzima em *Leishmania* com a contraparte do hospedeiro⁶⁸, têm demonstrado a importância da enzima CYP51 para sobrevivência de parasitas *Leishmania* e seu potencial como alvo terapêutico. Embora azóis antifúngicos demonstrem resultados conflitivos *in vitro* contra formas promastigotas e uma ampla variação de eficácia clínica em estudos de pequeno porte focados em LC^{69,70}, outros inibidores de CYP51 não-azólicos de esqueleto químico 4-aminopiridil têm demonstrado potência superior aos azóis contra parasitas *L. donovani*, renovando a perspectiva de terapias baseadas nesta classe de inibidores para tratamento de LV⁷⁰.

Inibidores CYP51 correspondem apenas um exemplo do potencial inibitório da via biossintética de esteróis em *Leishmania*. Outras muitas enzimas da via como HMG CoA reductase, escaleno-2,3-epoxidase (SEO), S-adenosil-L-metionina: $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferase (SMT) têm sido descritas como importantes alvos farmacológicos de interesse⁶⁹.

1.6.6 Metabolismo de poliaminas e sistema de defesa tiol contra o estresse oxidativo

Níveis de poliaminas (putrescina e espermidina) são garantidos pelo parasita tanto pela síntese *de novo* quanto pelo transporte ativo através da membrana. A versalidade desta via torna difícil a inibição completa dos níveis de poliaminas a partir de um único alvo terapêutico⁷¹, porém distúrbios nesta via têm demonstrado potencial letalidade para o parasita devido sua direta implicação no metabolismo tiol, sustentando o potencial da via das poliaminas como alvo terapêutico. Por exemplo, promastigotas mutantes para ornitina descarboxilase (ODC)⁷², a enzima que catalisa a conversão de ornitina para putrescina; ou promastigotas incubados com DFMO (difluorometilornitina) um inibidor específico da enzima ODC⁷³, têm a taxa de crescimento inibida *in vitro*, devido a diminuição dos níveis de putrescina e tripanotiona.

Desde a descoberta⁷⁴, a tripanotiona representa a possibilidade de desenvolvimento de um fármaco altamente seletivo contra parasitas *Leishmania*, não apenas devido sua ausência no hospedeiro mamífero, mas porque é essencial para regulação do potencial redox intracelular e porque o parasita não apresenta mecanismos alternativos eficientes de proteção contra o estresse oxidativo⁷⁵.

Em *Leishmania*, tripanotiona reduzida (T(SH)₂) é convertida à forma oxidada (T(S)₂) sob ação da enzima tripanotiona redutase (TryR) e cofator NADPH, sendo a forma reduzida responsável na detoxificação de ROS produzido no processo de estresse oxidativo. No hospedeiro mamífero a detoxificação é substituída pelo sistema glutathiona (GSH/GSSG) sob ação da enzima glutathiona redutase. Glutathiona (GSH) também está presente em parasitas *Leishmania*, contudo as reações de intercâmbio entre a forma reduzida e oxidada não ocorrem enzimaticamente, tornando GSH pouco mais que um precursor da tripanotiona^{75,76}. A enzima TryR é outro alvo sob recorrente investigação, apesar da similaridade em sequência aminoácidos e estrutura com sua contraparte humana, glutathiona redutase, a TryR apresenta elevada afinidade por seu substrato tripanotiona o que permite o *design* de inibidores específicos⁷⁶. Análogos de poliaminas, acridinas, e antidepressivos tricíclicos (ADTs) têm demonstrado interessante atividade como inibidores competitivos da TryR⁷¹.

Outras enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação de *Leishmania*, únicas ou distantes daquelas encontradas no hospedeiro, podem ser destacadas como potenciais alvos terapêuticos, contudo a ausência de informações como estrutura química limitam o desenvolvimento de inibidores específicos^{75,76}.

1.6.7 Maquinaria de replicação, transcrição e tradução

O genoma de parasitas *Leishmania* é encontrado (i) no cinetoplasto mitocondrial, organizado em um DNA (kDNA) de topologia única circular composto por dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos interligados⁷⁷, e (ii) no núcleo organizado em DNA cromossomal⁷⁸. Uma vez que o cinetoplasto é único em tripanossomatídeos tem sido apontado como um importante alvo terapêutico.

DNA topoisomerasas são enzimas encontradas tanto no núcleo quanto na mitocôndria de *Leishmania* e são responsáveis pelas alterações como relaxamento e quebras da fita do DNA, essenciais para processos de biossíntese, reparo e divisão celular. Topoisomerasas I e II de *Leishmania* representam potenciais alvos quimioterápicos devido a diferenças bioquímicas e estruturais em relação a topoisomerasas do hospedeiro, além de serem funcionalmente indispensáveis na organização do kDNA, único nesses parasitas⁷⁹.

Antimônios pentavalentes não têm o mecanismo de ação completamente elucidado. Dentre os múltiplos efeitos descritos, antimônios pentavalentes parecem ser inibidores da topoisomerase I purificada *in vitro* de *L. donovani*⁸⁰ e estabilizadores de complexos DNA-proteína⁸¹. Este efeito de estabilização é comumente descrito em uma variedade de células após tratamento com camptotecina, um conhecido inibidor de topoisomerase I. Parasitas resistentes ao antimônio isolados de pacientes ou produzidos *in vitro* demonstraram a perda da capacidade de estabilização destes complexos DNA-proteína, reforçando a inibição de topoisomerasas como um dos mecanismos de ação de antimônios pentavalentes⁸¹.

Recentemente, a pentamidina também foi descrita como inibidor da topoisomerase I de *L. donovani* em experimentos *in vitro*⁸². Após acumular-se seletivamente na mitocôndria do parasita, a pentamidina se liga ao kDNA linearizando minicírculos e inibição dos processos de replicação e transcrição. Esta propriedade de ligação ao kDNA interfere com funções de proteínas associadas com a maquinaria de replicação tais como topoisomerase I, resultando na inibição de crescimento do parasita⁸².

Outro fármaco da quimioterapia das leishmanioses que explora debilidades da maquinaria de tradução de *Leishmania* é o antibiótico paromomicina. Ao ligar-se seletivamente ao sítio de decodificação ribossomal do parasita, e não do hospedeiro, altera o processo de reconhecimento códon-anticódon causando alta frequência de erros de leitura do código do RNA mensageiro (RNAm) e finalmente inibe a síntese de proteínas⁸³.

Experimentos de nocaute gênico por muito tempo foram utilizados como único critério na validação de alvos terapêuticos, limitando a busca de alvos a ideia simplista de que um gene essencial é igual a um alvo terapeuticamente válido³⁷. Sem embargo, esta ideia ignora processos de maturação enzimática, cascata biológicas, e debilidades funcionais como aquelas descritas acima para o fármaco paromomicina, por exemplo.

Dos fármacos aprovados pelo FDA, estima-se que 7% não tem alvo primário descrito e 18% carecem de um mecanismo de ação definido. Como ilustrado por estes percentuais, a identificação de um alvo molecular não exatamente demonstra mecanismo de ação, isto porque muitos fármacos exercem seu efeito através de uma modulação de vários alvos, e a identificação de um único alvo, abandona outros importantes para compreensão definitiva do mecanismo de ação⁸⁴.

Quanto maior o conhecimento sobre a dinâmica com que fármacos interferem com o metabolismo celular, maior é a precisão para estabelecer doses, desenhar as próximas gerações de moléculas com efeitos adversos reduzidos, e inspirar combinações terapêuticas racionais⁸⁴. Por este motivo, tecnologias baseadas em metabolômica cada vez mais são incorporadas ao processo de descoberta de fármacos nos estudos de mecanismo de ação⁸⁵.

1.7 Metabolômica *versus* parasitas *Leishmania*

O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, que diferem principalmente quanto ao local de desenvolvimento do parasita dentro do inseto vetor. Acredita-se que a espécie infectante seja o principal fator no desenvolvimento do tipo de infecção, por exemplo, *Leishmania (L.) major* causa a LC, *Leishmania (V.) braziliensis* causa a LMC, e a *Leishmania (L.) infantum* representa uma das poucas espécies visceralizantes de *Leishmania*. Pouco se sabe sobre a natureza e identidade das diferenças moleculares intra- e interespecies subjacentes ao polimorfismo clínico das leishmanioses⁸⁶.

Apesar de 20-100 milhões de anos de separação entre as espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, a conclusão do sequenciamento do genoma mostrou

conservação de mais de 99% tanto em arquitetura quanto repertório gênico entre os três genomas: *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*⁸⁷. Além disso, mais de 60% dos genes que codificam proteínas não têm função biológica descrita⁷⁸.

Mesmo com o uso de técnicas transcriptômicas e proteômicas para detecção dos níveis basais de RNAm e proteínas, respectivamente, os avanços na compressão dos processos biológicos de parasitas *Leishmania* são extremamente lentos comparado a outros patógenos. Isto porque *Leishmania* faz uso da transcrição policistrônica constitutiva. Em outras palavras, longos transcritos de RNAm, contendo vários genes funcionalmente não relacionados, são transcritos constantemente e a regulação parece ocorrer ao nível pós-transcricional⁸⁸. Assim, a transcriptômica tem produzido uma modesta contribuição, e estudos proteômicos frequentemente resultam em uma lista de proteínas expressas diferencialmente, porém com ausência de função biológica descrita, frequentemente deixando muitas questões em aberto⁸⁹.

Sabe-se que mudanças nos níveis de transcritos e proteínas, funcionam como passos intermediários que levam a variações relevantes ao nível metabólico. Assim, o estudo do metaboloma de parasitas *Leishmania* passou a ser mais atrativo, em vista que metabólitos correspondem aos produtos finais de todos os processos celulares ativos. Esta maior proximidade ao fenótipo celular garante rápidas observações das perturbações do sistema biológico no metaboloma, e, portanto, uma importante vantagem sobre as demais estratégias “-ômicas” acima citadas⁹⁰.

Após início dos estudos metabolômicos em meados da década de 80, houve uma revolução na compreensão do perfil metabólico desses parasitas. Paulatinamente, a lacuna acerca do metabolismo central de *Leishmania*, anteriormente limitada pela falta de informações sobre as diferenças estágio-específicas, vem sendo preenchida pelas técnicas metabolômicas. Formas promastigotas exibem alta atividade metabólica com excessivas taxas de consumo de glicose, aminoácidos e secreção de produtos parcialmente metabolizados comparada a forma amastigota intracelular⁹¹. Enquanto amastigotas apresentam em um estado metabólico rigoroso marcado pela (i) redução da taxa de consumo de glicose e aminoácidos, (ii) alta eficiência metabólica com baixa da secreção de ácidos orgânicos parcialmente metabolizados para o meio extracelular, (iii) aumento do consumo de ácidos graxos como fonte de carbono via β -oxidação na

mitocôndria⁵² e (iv) diminuição de processos de alto gasto energético como síntese de proteínas e lipídios⁹².

Atualmente não existem métodos adequados para obtenção de amastigotas intracelulares puros e em quantidade suficiente para estudos metabolômicos, e mesmo o cultivo axênico é limitado pela dificuldade do crescimento encontrado na maioria das espécies de *Leishmania*^{85,93}. O estudo de Saunders e colaboradores⁵² acima citado corresponde a um dos poucos descritos na literatura. Uma engenhosa saída para o estudo de formas amastigotas verdadeiras *in vivo* foi a marcação de modelo animal BALB/c de infecção por *Leishmania mexicana* pela administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ e acompanhamento do enriquecimento de deutério em moléculas de RNA, proteínas e lipídios por técnicas metabolômicas. Novamente, formas amastigotas mostram um estado metabólico semi-quiescente marcado por taxas muito baixas de síntese de RNAs, proteínas e lipídios. A lenta taxa de replicação *in vivo* de aproximadamente 12 dias foi mantida constante ao longo desenvolvimento da lesão, aparentemente como uma estratégia para minimizar a ativação de macrófagos e fornecer um ambiente adequado a expansão da carga parasitária⁹².

Análises metabolômicas não dirigidas (*untargeted*) têm sido utilizadas para o estudo do metabolismo de diferentes espécies de *Leishmania*, na tentativa de rastrear diferenças fundamentais da patologia específica e capacidade de modulação da resposta imune do hospedeiro nas diferentes células das quais parasitam⁹³, assim como, estudos de mecanismo de ação e resistência de fármacos novos ou de longo histórico clínico⁸⁵. Tais análises não dirigidas, primam pela identificação do maior número possível de metabólitos e têm revelado numerosos metabólitos desconhecidos até então em parasitas *Leishmania*⁸⁵.

Muito do processo de identificação e descrição de metabólitos se esbarra na complexidade biológica e capacidade analítica disponível como abordado a seguir.

1.8 Análises metabolômicas não dirigidas: complexidade do metaboloma

O metaboloma tem sido definido como o conjunto qualitativo e quantitativo de moléculas de baixa massa molecular (metabólitos <1500 Da) presentes em todas as células que participam de reações metabólicas e são requeridos para a manutenção, crescimento e funções normais da célula. Geralmente essas moléculas incluem espécies orgânicas como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e lipídios, cada qual com diferentes propriedades químicas (massa molecular, polaridade, solubilidade) e físicas (volatilidade). Portanto, metabólitos apresentam uma diversidade muito maior de arranjos atômicos comparado a proteínas (arranjo de 20 aminoácidos) e transcritos (quatro diferentes bases nitrogenadas ligadas a um açúcar e um fosfato), além de uma ampla variação de concentrações estimadas no intervalo de picomolar a milimolar⁹⁴.

Estudos metabolômicos têm sido desenvolvidos usando diferentes plataformas analíticas, dentre as quais, técnicas de separação cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (EM) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) são mais amplamente utilizadas. Diferentes técnicas oferecem vantagens e desvantagens em sua aplicação⁹⁰. Comumente, as limitações individuais de cada técnica são potencialmente superadas pelo uso de múltiplas plataformas analíticas em conjunto com sofisticadas ferramentas estatísticas quimométricas, necessárias para interpretação do grande volume de dados gerados nos estudos metabolômicos. A seguir, uma breve descrição das vantagens e desvantagens de cada técnica⁸⁵.

1.9 Plataformas analíticas mais utilizadas

1.9.1 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

A técnica de RMN baseia-se no fato de que núcleos tais como do ^1H , ^{13}C e ^{31}P podem existir em diferentes níveis de energia em um forte campo magnético, uma vez que eles possuem propriedades de *spin* nuclear capazes de gerar uma valiosa

informação estrutural. Como a maioria dos metabólitos contém átomos de hidrogênio e carbono, esta técnica é capaz de identificar e simultaneamente quantificar a grande maioria de metabólitos de uma amostra biológica, desde que suas concentrações estejam dentro do limite de detecção da técnica, estimada no intervalo de concentração de micromolar⁹⁴.

Uma das grandes vantagens da técnica é o caráter não-destrutivo da amostra, que permitir a preservação e continuidade de estudos que fazem uso de amostras raras, por exemplo. A principal limitação é a baixa sensibilidade comparada a técnica de EM, o que a torna inapropriada para análises de metabólitos com baixa abundância ou potenciais biomarcadores que podem estar abaixo de limite de detecção. As vantagens de RMN sobre EM incluem a resolução de metabólitos de difícil ionização, ou metabólitos que apresentam comportamento idiossincrático nas diferentes plataformas cromatográficas acopladas a EM⁹⁵.

1.9.2 Espectrometria de massas (EM)

Espectrometria de massas depende da formação de íons (positivos ou negativos) que podem ser carregados eletricamente (ou magneticamente) com base na sua relação massa/carga (m/z). Em um espectro de massas, a coordenada x representa m/z , enquanto a coordenada y indica a abundância relativa dos íons⁹⁶. A técnica EM combina alta sensibilidade devido à detecção de metabólitos no intervalo de concentração de picomoles a femtomoles, e alta seletividade, fornecendo informações tais como massa exata, padrão de distribuição isotópica, fórmula química e fragmentos de íons característicos que auxiliam na elucidação e identificação do metabólito⁹⁷.

O acoplamento de técnicas cromatográficas a EM, ampliou extensivamente a capacidade de resolução de misturas biológicas complexas. Atualmente, três técnicas de separação têm sido predominantemente incorporadas a estudos metabolômicos usando EM: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC).

1.9.2.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

CG-EM é uma plataforma analítica onde metabólitos voláteis e termicamente estáveis são primeiro separados por CG e então detectados tradicionalmente por espectrômetros de massas com método de ionização por elétrons (IE). A técnica fornece alta resolução cromatográfica e tempos de retenção reprodutíveis de metabólitos de massa molecular no intervalo de 18 a 350 Da de natureza relativamente polares como aminoácidos, ácidos orgânicos, aminas, amidas, mono- e dissacarídeos, ácidos graxos, esteróis, entre outros.

A principal limitação da técnica é a capacidade de analisar apenas metabólitos voláteis e termicamente estáveis excluindo metabólitos de alta massa molecular e termossensíveis. O processo químico de derivatização é necessário para aumentar a cobertura de metabólitos da técnica uma vez que este aumenta a volatilidade dos metabólitos⁹⁰. Diferentes reagentes químicos podem ser usados na derivatização, embora dois processos sejam frequentemente aplicados: uma reação de oximação é seguida de reação de sililação. Esse processo fornece alteração química de diferentes grupos funcionais incluindo hidroxilas, cetonas, ácidos carboxílicos, tióis e aminas, portanto, fornece uma boa cobertura de metabólitos. A oximação resultada na conversão de grupos químicos para oximas que são passíveis de rápida sililação, que por sua vez substitui hidrogênios ativos para grupos trimetilsilil, por exemplo. Senão mascarados pela sililação, esses hidrogênios ativos permitem ligações inter- e intramoleculares que aumentam o ponto de ebulição dos metabólitos, tornando-os inadequados para análises CG-EM. A desvantagem é a possibilidade de uma ampla formação de artefatos durante o processo de derivatização⁹⁰.

Durante as análises, um pequeno volume amostral (<2 µL) é injetado em colunas CG que podem apresentar diferentes polaridades (DB-5 ou DB-50, colunas capilares são mais comumente utilizadas). Após a separação cromatográfica, o mecanismo de ionização por elétrons (IE) que ocorre no espectrômetro de massa, tem mínima variabilidade de instrumento para instrumento e fornece uma ampla reprodutibilidade e padrões característicos de fragmentação que fornecem um espectro de massa altamente informativo utilizado para determinação da estrutura química. Essa

característica permite a criação de bibliotecas de espectros de massas universais (exemplo Fiehn RTL Library (FiehnLib) e National Institute of Standards and Technology – NIST) para identificação segura dos metabólitos⁹⁴.

1.9.2.2 Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

A separação dos metabólitos por CLAE é tradicionalmente seguida pelo processo de ionização por *eletrospray* (ESI) ou menos tipicamente pela ionização por pressão química atmosférica (APCI).

As colunas mais empregadas são colunas C18 ou C8 de fase-reversa. Os metabólitos polares injetados nessas colunas são retidos minimamente e geralmente eluem nos primeiros minutos de análise, enquanto colunas HILIC são mais comumente utilizadas para análise dos metabólitos polares⁹⁴. O uso de colunas de fase-reversa fornece uma eficiente retenção e separação de metabólitos relativamente apolares dentre de amplo intervalo de massa molecular de 50 a >1500 Da e incluem diversas espécies lipídicas e aminoácidos apolares como triptofano e fenilalanina, por exemplo⁹⁰.

No espectrômetro de massa, a instrumentação ESI opera em modos positivo e negativo e detecta aqueles metabólitos que podem ser ionizados pela adição ou remoção de um próton ou adição de outras espécies iônicas. A ionização ESI é considerada um método de ionização branda, que diferente do alto perfil de fragmentação como o método IE da plataforma CG-EM, não permite a direta identificação pela comparação entre espectros de massa ESI, e bibliotecas espectrais não estão disponíveis. A identificação deve ser feita por análises adicionais em tandem (EM/EM) com medidas precisas de massa e obtenção de espectros de massa mais informativos quanto ao perfil de fragmentação molecular para fins de identificação metabólica⁹⁴.

CG-EM e CLAE-EM com coluna de fase-reversa são plataforma analíticas altamente complementares, cada uma fornece a detecção de um conjunto de

metabólitos com um número reduzido deles detectados em ambas as plataformas. CG-EM fornece a detecção de metabólitos de baixa massa molecular relativamente polares incluindo aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, metabólitos fosforilados (exemplo glicose-6-fosfato) e colesterol, enquanto CLAE-EM com coluna de fase-reversa fornece detecção complementar dos metabólitos de alta massa molecular de média a alta lipofilicidade, incluindo diferentes classes lipídicas como glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos, ácidos biliares e esteróis⁹⁰.

1.9.2.3 Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (EC-EM)

A plataforma de EC-MS usando ESI como método de ionização é particularmente adequada para análise de metabólitos altamente polares e carregados. Por este motivo, EC-MS tem ganhado cada vez mais aplicação em estudos metabolômicos com uma plataforma altamente complementar a CLAE-EM com coluna de fase reversa e CG-EM. Análises EC-MS têm incluído a detecção de metabólitos como íons inorgânicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos e nucleotídeos, vitaminas, tióis, carboidratos e peptídeos^{98,99}.

O mecanismo de separação é baseado nas diferenças nas taxas de migração das moléculas em função da razão carga/tamanho dentro de um campo elétrico. Separações por EC são altamente eficientes, requerem um pequeno volume de amostra (1-20 nL), de reagentes e solventes e é uma técnica relativamente barata quando comparado o investimento em capilares de sílica fundida *versus* colunas de cromatografia líquida⁹⁹. As desvantagens da técnica envolvem pobre sensibilidade e reprodutibilidade dos tempos de migração comparados as técnicas CG-EM e CLAE-EM^{98,99}.

A Figura 4 resume as vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de separação comumente acopladas à espectrometria de massas.

CG-EM

- **Características:** separação baseada na diferença de volatilidade
- **Vantagens**
 - alta resolução e reprodutibilidade
 - identificação precisa baseada em T_R e espectro de massa por EI^a altamente reprodutíveis
 - excelentes softwares deconvolução e identificação de metabólitos
 - requer pequeno volume amostral (<2 μ L)
- **Desvantagens**
 - limitada a compostos voláteis e termicamente estáveis
 - complexo processamento amostral
 - reações de derivatização produzem variabilidade e artefatos
 - inadequada para metabólitos grandes e altamente polares devido à pobre volatilidade

CLAE-EM

- **Características:** diferentes mecanismos de separação baseada em interações químicas com a fase estacionária da coluna cromatográfica
- **Vantagens**
 - alta robustez e sensibilidade
 - preparo amostral simples
 - diferentes colunas cromatográficas permitem a detecção de uma diversidade de metabólitos
 - permite utilização de diferentes fontes de ionização como ESI^b e APCI^c
- **Desvantagens**
 - requer grandes volumes de solvente em comparação a outras técnicas
 - longos períodos de condicionamento das colunas cromatográficas
 - para análises altamente quantitativas devem incluir padrões comerciais para cada metabólito
 - grande complexidade de dados

EC-EM

- **Características:** separação baseada na razão carga/tamanho e diferentes taxas de migração em um campo elétrico
- **Vantagens**
 - adequada para análises de metabólitos altamente polares e iônicos
 - relativamente barata e altamente eficiente na separação
 - preparo amostral simples e curto período de análise
 - requer pequeno volume (nL) de amostra
- **Desvantagens**
 - menor sensibilidade e reprodutibilidade comparada as técnicas CG- e CLAE-EM
 - ampla variação do tempo de migração
 - podem ocorrer reações eletroquímicas com os metabólitos

Figura 4 - Vantagens e desvantagens das técnicas mais empregadas em estudos metabolômicos. ^aEI, ionização por elétrons; ^bESI, ionização por *eletrospray*; ^cAPCI, ionização química a pressão atmosférica^{90,94,98,99}

1.10 Fluxo de trabalho de estudos metabolômicos não dirigidos para elucidação de mecanismo de ação

O fluxo de trabalho de análises metabolômicos não dirigidas para estudo de mecanismo de ação é relativamente simples (Figura 5). Primeiro, a questão biológica a ser respondida deve definir o tipo de amostra e o planejamento experimental adequado. Em estudos de mecanismo de ação de fármacos em *Leishmania*, parasitas são cultivados em meio de cultura e incubados com o fármaco de interesse; aqui animais são raramente utilizados devido aos altos níveis de variação biológica dificultando a reprodutibilidade da técnica. O metabolismo celular é então interrompido e os extratos metabólicos obtidos.

Na segunda etapa, o preparo da amostra é definido de acordo com a abordagem metabolômica e técnica analítica selecionadas. Abordagens dirigidas (*targeted*) concentram-se em um conjunto de metabólitos de interesse, enquanto abordagens não dirigidas (*untargeted*) buscam a detecção do maior número possível de metabólitos. Protocolos para extrações seletivas de metabólitos devem ser empregados em abordagens dirigidas, bem como protocolos de derivatização devem ser empregados na técnica CG-EM. Técnicas CLAE-EM e EC-MS não exigem sofisticados protocolos no preparo da amostra.

A terceira etapa se resume ao processamento da enorme quantidade de dados metabolômicos gerados principalmente em abordagens não dirigidas. Esta tarefa é, de longe, mais desafiadora que a coleta dos dados⁸⁵.

Este processamento de dados inclui obtenção de uma matriz de dados utilizando ferramentas de detecção de sinais, alinhamento, normalizações, filtrações, validações e análises estatísticas (uni e multivariada) para seleção dos metabólitos alterados e implicados nas perturbações induzidas pelo fármaco.

Na quarta e última etapa, os metabólitos são identificados utilizando bases de dados *online* (como HMDB, KEGG, Metlin, Lipidmaps) ou comerciais (como NIST) e confirmados por análises MS/MS e injeção de padrões comerciais. Finalmente, cada metabólito é correlacionado a uma via metabólica e o conjunto de alterações

biologicamente interpretado. O principal propósito e resultado de qualquer estudo metabolômico não dirigido é gerar hipóteses que possam ser posteriormente testadas⁹³.

Figura 5 - Fluxo de trabalho simplificado de análises metabolômicas não dirigidas para o estudo de mecanismo de ação de fármacos

1.11 Fármacos antidepressivos e seu potencial anti-*Leishmania*

Entre os fármacos orais disponíveis no mercado, antidepressivos são amplamente comercializados, chegando a alcançar em 2011 a posição de classe farmacêutica mais prescrita, com 264 milhões de prescrições, contabilizando um total de U\$11 bilhões de dólares em vendas nos EUA¹⁰⁰.

Representando um dos poucos relatos de serendipidade farmacológica da indústria farmacêutica, a descoberta dos antidepressivos foi um acaso durante uma triagem de novos fármacos para o tratamento de tuberculose na década de 50. Desde

então, os antidepressivos vêm sendo racionalmente melhorados a cada nova geração pelo aumento da especificidade farmacológica quanto a um alvo molecular, com ganhos significativos na redução de efeitos adversos^{101,102}.

Apesar das diferentes estruturas químicas e especificidades individuais, o mecanismo de ação final dos antidepressivos corresponde ao aumento da disponibilidade de neurotransmissores livres no sistema nervoso central. Por exemplo, a inibição da enzima monaminoxidase por antidepressivos de primeira geração IMAOs (Inibidores da Monoamina Oxidase) bloqueia a oxidação de neurotransmissores monoaminas resultando em aumento de disponibilidade¹⁰¹. Por sua vez, Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs), antidepressivos de segunda geração, inibem a recaptação de serotonina (5-HT) nos terminais de neurônios pré-sinápticos, também aumentando a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica. Os antidepressivos ISRSs foram desenvolvidos para inibir seletivamente o transportador de serotonina 5-HTT, sem afetar outros neuroreceptores, tais como histamina, acetilcolina e receptores adrenérgicos. E esta é a maior vantagem sobre os antidepressivos tricíclicos (primeira geração), graças ao aumento da tolerância e menores efeitos adversos¹⁰³.

Foi a partir na década de 80 que a atividade anti-*Leishmania* dos antidepressivos de primeira e segunda geração começa a ser descrita, majoritariamente restrita à atividade *in vitro*, com poucos avanços para estudos *in vivo*.

A imipramina, um antidepressivo tricíclico de primeira geração, demonstrou um potencial anti-*Leishmania* bastante importante, tanto *in vitro*^{104,105} quanto *in vivo*, com destaque para a susceptibilidade de parasitas resistentes ao antimônio, isolados de pacientes da zona hiperendêmica na Índia. Em modelo animal de infecção experimental de LV resistente ao antimônio, a eficácia *in vivo* da imipramina superou a do fármaco padrão miltefosina¹⁰⁶.

In vitro, a atividade entre os tricíclicos dibenzazepinos, imipramina e clomipramina, tem sido seletivamente maior contra a forma amastigota^{104,105} comparado aos tricíclicos dibenzocicloheptadienos (amitriptilina e ciclobenzaprina) cuja seletividade é maior contra formas promastigotas de *Leishmania*^{104,107}. Nestes fármacos, a estrutura molecular tricíclica parece importante para atividade anti-

Leishmania, visto que o antidepressivo tetracíclico mianserina demonstrou atividade contra formas amastigotas intracelulares até 6 vezes menor que os antidepressivos de estrutura tricíclica¹⁰⁸.

Por outro lado, antidepressivos de segunda geração, exemplo sertralina (SRT) e paroxetina, têm sido muito menos explorados apesar da potente atividade anti-*Leishmania in vitro* descrita para estes dois fármacos^{109,110}. De maneira geral, antidepressivos têm mostrado uma valiosa atividade anti-*Leishmania* que foi explorada de forma incipiente. Por exemplo, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação envolvidos no processo de morte induzida por antidepressivos em parasitas *Leishmania*. Duas perspectivas têm sido assinaladas: (i) antidepressivos apresentam efeitos antiparasitários não específicos típicos do grande grupo de fármacos anfifílicos catiônicos (CADs) do qual estão inseridos^{104,107}, ou (ii) atuam como fármacos seletivos com atividade letal intrínseca no parasita e/ou efeitos imunomodulatórios na célula do hospedeiro mamífero^{106,108,109}.

A resolução de infecções em modelo animal experimental de LV demonstram a capacidade de distribuição farmacológica dos antidepressivos para o novo alvo terapêutico proposto, apesar dos níveis terapêuticos plasmáticos descritos tipicamente no intervalo nanomolar¹¹¹. Argumenta-se que a extensa metabolização no fígado promova concentrações hepáticas superiores as concentrações leishmanicidas necessária¹¹² a resolução da infecção *in vivo*.

Por exemplo, o fármaco SRT foi descrito acumular-se no fígado humano em altas concentrações¹¹³, sugerindo uma adequada biodisponibilidade do fármaco para tratamento da LVA. E de fato, em modelo animal de infecção experimental com *Leishmania donovani*, a SRT reduziu em aproximadamente 70% a carga parasitária do fígado e baço de camundongos BALB/c tratados com uma dose terapêutica 55 vezes menor que o valor de dose letal 50% (DL₅₀ de 548 mg/kg) neste modelo animal¹⁰⁹.

Recentemente, o fármaco ciclobenzaprina (CBP), um relaxante muscular, de estrutura tricíclica análoga ao antidepressivo amitriptilina, demonstrou uma redução de 66% e 89% a carga parasitária de fígado e baço, respectivamente, em camundongos infectados com *Leishmania (L.) infantum*, após curto período de tratamento oral de 5 dias¹¹⁴. Nesse último caso, a estrutura tricíclica, aliada a extensa metabolização

hepática, podem ser propriedades fundamentais para a atividade anti-*Leishmania* recentemente descrita para a molécula CBP.

Desde a descoberta da atividade anti-*Leishmania in vivo* dos fármacos SRT e CBP, seus mecanismos de ação em parasitas *Leishmania* permanecem pouco compreendidos¹⁰⁹.

1.11.1 Fármaco ciclobenzaprina

Ciclobenzaprina (CBP) é um fármaco estruturalmente similar aos antidepressivos tricíclicos amitriptilina e imipramina (Figura 6).

Figura 6 - Antidepressivos tricíclicos estruturalmente similares ao fármaco ciclobenzaprina

O fármaco CBP foi sintetizado e patenteado em 1961 pela companhia farmacêutica Hoffmann-LaRoche & Co, sendo primeiramente testado em estudos clínicos para atividade antidepressiva (doses de 75-250 mg/dia). Contudo, devido aos efeitos adversos e menor atividade comparado a seu análogo tricíclico amitriptilina, o fármaco CBP foi descontinuado para o tratamento da depressão. Posteriormente, o sal hidrocloreto de CBP foi desenvolvido pela companhia farmacêutica Merck Sharp & Dohme Research Laboratories como um novo relaxante muscular de ação central em doses mais baixas que aquelas testadas para atividade antidepressiva. Em 1977, a CBP foi aprovada como relaxante muscular oral pelo FDA¹¹⁵.

A classe farmacológica de relaxantes musculares compreende um grupo de fármacos bastante heterogêneo, não quimicamente relacionados, prescritos para o tratamento de dois diferentes distúrbios de dor como espasticidade e distúrbios musculoesqueléticos¹¹⁶. O fármaco CBP é um dos relaxantes musculares mais utilizados e bem estudados para desordens musculoesqueléticas, principalmente no alívio de dores agudas como torcicolos, dor lombar e diminuição nos espasmos musculares¹¹⁷, e utilizado em quadros de dor crônica como fibromialgia¹¹⁸. Atualmente a CBP é livre de patente e registra bons índices de prescrição; em 2006, esteve entre os 200 fármacos mais vendidos nos EUA^{119,120}.

Ciclobenzaprina é um fármaco de intensa metabolização no fígado, principalmente pelas isoenzimas P450 3A4 e 1A2 após absorção intestinal¹²¹. Sua extensa distribuição tecidual¹²², impede que níveis plasmáticos máximos ($C_{máx}$) ultrapassem o valor de 35 ng/mL. Apesar do prolongado tempo de meia vida plasmática ($T_{1/2}$) de 18 horas, o efeito farmacológico da CBP varia de 4-6 horas. Desta forma, o regime terapêutico adotado para o efeito de relaxamento em quadros agudos, é realizado por 3 administrações ao dia de 5-10 mg por um período de 7 dias^{123,124}. Moderada sonolência e boca seca são comumente descritas como efeitos adversos para dose de 10 mg. Na dose de 5 mg, o fármaco produz efeito farmacológico comparável a dose mais elevada, com efeitos adversos menos intensos, porém, à custa de efeito analgésico mais lento¹¹⁷.

A experiência pós-mercado, acumulada ao longo dos anos, demonstra que a CBP é um fármaco seguro e muito bem tolerado com baixas taxas de descontinuidade de tratamento¹¹⁷. Poucos são os relatos de overdose envolvendo CBP e, nenhum deles marcado por efeitos neurológicos e cardiovasculares potencialmente fatais, comumente observados em quadros de overdose com antidepressivos tricíclicos¹²⁵. Uma preocupação quase constante para este fármaco devido a sua semelhança estrutural com a amitriptilina.

Diferindo do fármaco amitriptilina em apenas uma ligação covalente no anel central (Figura 6), o fármaco CBP compartilha inúmeras propriedades farmacológicas com antidepressivos tricíclicos¹¹⁸, incluindo potencialização da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica no sistema nervoso. Portanto, o fármaco CBP é

normalmente discutido como um antidepressivo tricíclico^{118,126}, apesar de sua classificação como relaxante muscular.

De fato, o mecanismo de ação do fármaco CBP tem sido atribuído a efeitos no sistema nervoso, através de mecanismos pouco entendidos, e não propriamente um efeito muscular local¹²⁷ (Figura 7). Presume-se que a CBP exerça efeitos iniciais no *locus coeruleus* do tronco cerebral, que são secundariamente traduzidos para o interneurônio da medula espinhal ligado aos reflexos musculares, produzindo a ação mitigante sobre o espasmo muscular. Além disso, a CBP tem efeito inibitório dos potenciais de reflexo mono- e poli-sinápticos, visto que inibe a via serotoninérgica descendente através da inibição de receptores 5-HT₂, os quais o fármaco CBP se liga com alta afinidade ($K_i = 62 \text{ nM}$)¹²⁸.

Figura 7 - Mecanismo de a ação central do fármaco CBP. O fármaco CBP promove o efeito de relaxamento muscular via ação central iniciada no tronco cerebral e inibição da via serotoninérgica descendente.

Em *Leishmania*, nossos estudos preliminares de mecanismo de ação, demonstraram que a CBP inibe a atividade da TryR de *Leishmania (L.) infantum* com alto valor de K_i de $89 \mu\text{M}$ ¹¹⁴, embora cálculos teóricos sugiram valores de $K_i \leq 10 \text{ nM}$

sejam necessários para sustentar uma inibição enzimática maior que 90%, e produzir um real acúmulo do substrato tripanotona¹²⁹. De maneira geral, tricíclicos dibenzocicloheptadienos, amitriptilina¹³⁰ e CBP¹¹⁴, têm sido descritos como inibidores competitivos de TryR menos eficientes quando comparados aos tricíclicos dibenzazepinos, imipramina e clomipramina¹²⁹⁻¹³¹. Portanto, outros alvos são esperados para esta classe de fármacos em *Leishmania*¹²⁹. Foi observado ainda, que o aumento da produção de ROS em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, foi consistente com o grau de inibição da TryR induzida pela CBP; onde apenas concentrações superiores à CE₅₀ induziram moderado estresse oxidativo em 6 horas de incubação¹¹⁴, sugerindo um papel também coadjuvante para o estresse oxidativo no mecanismo de ação anti-*Leishmania* da CBP.

Apesar do importante efeito imunomodulatório da CBP em macrófagos infectados com parasitas *Leishmania (L.) infantum*, como o aumento da produção de óxido nítrico e redução dos níveis de citocina IL-6, efeitos correlacionados a resolução dos processos de infecção *in vivo*; tais mecanismos envolvendo vias metabólicas da célula do hospedeiro parecem ter pouca influência na atividade anti-*Leishmania in vitro* da CBP. Esta observação é sugerida pelos valores de CE₅₀ similares entre as formas extra (CE₅₀ = 14,5 µM) e intracelulares (CE₅₀ = 12,6 µM)¹¹⁴. Portanto, apesar de nossos esforços prévios, o mecanismo de ação da CBP em parasitas *Leishmania* permanece uma questão em aberto.

A disponibilidade comercial imediata de formulações orais e tópicas de CBP¹³² convida esforços adicionais para ampliação do conhecimento desta atividade anti-*Leishmania*, ultimamente visando a possibilidade de reposicionamento não apenas para LVA, mas também na LC.

1.11.2 Fármaco sertralina

Sertralina (Figura 8) é um antidepressivo da classe ISRSs, amplamente utilizado em quadros clínicos de depressão ou distúrbios de ansiedade, com efeitos adversos e perfis de tolerabilidade bastante aceitáveis^{113,133}.

Figura 8 - Estrutura química do antidepressivo SRT

Como candidato a reposicionamento, o fármaco SRT tem demonstrado um amplo espectro microbica¹³⁴⁻¹³⁷, incluindo atividade anti-*Leishmania*¹⁰⁹ e atividade antiviral contra o vírus ebola¹³⁸.

Em humanos, o fármaco SRT inibe de maneira potente e seletiva o transportador 5-HTT, responsável pela recaptação de serotonina (5-HT), resultando do aumento do neurotransmissor na fenda sináptica e potencialização da neurotransmissão serotoninérgica¹⁰³ (Figura 9).

Figura 9 - Mecanismo de ação do fármaco SRT no hospedeiro mamífero humano.

Figura adaptada de Lattimore et al.¹⁰³

Buscas na plataforma BLAST não resultaram na identificação de uma proteína homóloga em *Leishmania*, tanto para o transportador humano 5-HTT/hSERT/SLC6A4, quanto para o transportador LeuT de bactérias descrito como alvo para antidepressivos ISRSs e tricíclicos^{139,140}.

A missão de definir o alvo terapêutico do fármaco SRT em parasitas *Leishmania* é bastante intrigante considerando seu largo espectro microbicida. A enorme diferença biológica entre os microrganismos susceptíveis, sugere mecanismos muito além da inibição de bombas de efluxo, o mecanismo comumente descrito para a molécula SRT, em uma variedade de células e microrganismos^{134,141}. E de fato, o mecanismo preliminar descrito para a atividade leishmanicida da SRT aponta a mitocôndria como alvo terapêutico¹⁰⁹.

O seguimento da possibilidade de reposicionamento do fármaco CBP e SRT para o tratamento de Leishmanioses deve ser amparado tanto pela construção de um minucioso conhecimento sobre a potência e eficácia do fármaco, quanto pela descrição dos mecanismos de ação envolvidos na nova atividade anti-*Leishmania*, também por questões de propriedade intelectual ao longo do processo legal de reposicionamento²⁹. Portanto, o mecanismo de ação da CBP e SRT foram objetos de estudo nesse projeto de pesquisa.

2 OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa teve como propósito fundamental investigar os mecanismos de ação envolvidos na ação anti-*Leishmania* dos fármacos CBP e SRT. Para este propósito, estudos metabolômicos não dirigidos baseados em EC-EM, CLAE-EM/EM e CG-EM foram somados a estudos funcionais, bioenergéticos e ultraestruturais a fim de averiguar alterações bioquímicas bem como alterações ao nível de organelas citoplasmáticas.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar *in vitro* a concentração efetiva 50% (CE₅₀) em diferentes períodos de incubação com os fármacos CBP e SRT, utilizando formas promastigotas e amastigotas *Leishmania (L.) infantum*;
2. Avaliar *in vitro* a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) dos fármacos CBP e SRT em células de mamíferos NCTC clone 929;
3. Comparar o índice de seletividade dos fármacos em estudo com o fármaco padrão miltefosina;
4. Avaliar *in vitro* o efeito dos fármacos CBP e SRT sobre funções e parâmetros celulares essenciais como:
 - i. Potencial de membrana plasmática ($\Delta\psi_p$);
 - ii. Integridade da membrana plasmática;
 - iii. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$);
 - iv. Produção de ROS;
 - v. Velocidades de consumo de oxigênio mitocondrial;
5. Comparar o perfil metabólico de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* tratados vs não tratados com CBP ou SRT, utilizando três técnicas analíticas CLAE-EM/EM, EC-EM e CG-EM;
6. Definir um cenário hipotético dos mecanismos de ação dos fármacos CBP e SRT em parasitas *Leishmania*, a partir dos estudos acima enumerados;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fármacos e reagentes.

Fármacos ciclobenzaprina ($C_{20}H_{21}N.HCl$; MW=311.85 g/mol; CAS 6202-23-9) e sertralina ($C_{17}H_{17}NCl_2.HCl$; MW=342,69 g/mol; CAS 79559-97-0) foram comprados da Sigma-Madri, Espanha. Para os estudos de mecanismos de ação, MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio] foi comprado da Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Iodeto de propídio (PI), Sytox® Green, Rodamina 123 [cloreto 2-(6-amino-3-imino-3H-xanten-9-il) ácido benzoico metil éster], e DMNPE-luciferina [D-luciferina 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil) etil éster], bisoxonol [bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol] e MitoSOX™ foram comprados da Thermo Fisher-Invitrogen™ (Barcelona, Espanha). Para os estudos metabolômicos, metanol (grau de pureza CLAE-EM), heptano (grau de pureza CG-EM), acetonitrila (grau de pureza CLAE-EM), isopropanol (grau de pureza CLAE-EM), ácido fórmico (grau de pureza EM), piridina (grau de pureza sililação), C18:0 metil éster, L-metionina sulfona e cloridrato de *O*-metoxiamina foram comprados da Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemanha); *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA)-1 % trimetilclorosilana (TMCS) foram comprados da Pierce Chemical Co (Rockford, IL, USA) e massas de referência purina e hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi)fosfazina (HP) da Agilent (API-TOF kit solução de massas de referência). Milli-Q plus 185 foi fornecido pela Millipore (Billerica, MA, USA). Outros reagentes não mencionados foram comprados da Sigma-Espanha (Madri, Espanha).

3.2 Procedimentos gerais para manutenção das cepas.

Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP). Os animais foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Hamsters dourados foram infectados a cada mês com amastigotas

provenientes de baço para manutenção da cepa. Camundongos BALB/c (fêmeas) foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEUA IAL/Pasteur 05/2011).

3.3 Parasitas *Leishmania* e células de mamífero

Promastigotas *Leishmania (L.) infantum* (cepa JPC) cresceram em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 25 mM HEPES, 24 mM NaHCO₃, 2 mM D-glutamina, 100 units/mL penicilina, 48 µg/mL de gentamicina em pH 7,2 e 26 °C. *Leishmania donovani* 3-Luc cresceu a 26 °C em mesmo meio RPMI-1640 descrito acima exceto pela suplementação com 30 µg/mL de gentamicina (G-418; Gibco) em pH 7,2 e 26 °C. Amastigotas axênicos *Leishmania pifanoi* cepa MHOM/VE/60/Ltrod cresceram em meio M199 suplementado com 20% SFB, 2,5% (w/v) tripticasa, 13,2 mM D-glicose, 76 µM hemina e 48 µg/mL gentamicina em pH 7,2 a 32 °C¹⁴². Macrófagos peritoneais (MΦ) residentes de camundongos BALB/c fêmeas foram coletados por meio de lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB.

3.4 Determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos fármacos CBP e SRT contra formas promastigotas *Leishmania (L.) infantum*

O ensaio de redução de MTT foi utilizado para determinar a concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos fármacos CBP e SRT contra formas promastigotas *Leishmania (L.) infantum*¹⁴². Os fármacos foram dissolvidos em DMSO e serialmente diluídos com fator de diluição base 2 em meio de cultura. A quantidade de DMSO/poço nunca excedeu 0,5% (v/v). Promastigotas em fase exponencial tardia (2×10⁶ células/mL) foram incubados em placas de 96 poços com os fármacos CBP ou SRT durante 72 horas a 26 °C em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Após o período

de incubação, 0,5 mg/mL de MTT (concentração final) foi adicionado a cada poço por 2 horas e finalmente o precipitado de formazan foi solubilizado em SDS (dodecil sulfato de sódio) (5% m/v, concentração final) durante 24 horas. Absorbâncias foram lidas a 590 nm no espectrofluorímetro Bio-Rad leitor de microplacas de ELISA.

3.5 Determinação da concentração citotóxica 50% (CC₅₀) dos fármacos CBP e SRT em células de mamífero NCTC (clone L929)

Células NCTC foram plaqueadas a 6×10^4 células/poço em microplacas de 96 poços e, incubados com os fármacos CBP ou SRT serialmente diluídos com fator de diluição base 2, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB durante 72 horas a 37 °C, 5% CO₂. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com MTT descrito acima.

3.6 Determinação da concentração efetiva (CE₅₀) dos fármacos CBP e SRT em amastigotas *Leishmania (L.) infantum*

Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c (MΦ) foram plaqueados (1×10^5 MΦ/poço) em microplacas NUNC® de 16 poços e incubados *overnight* a 37 °C a 5% CO₂ para aderência na placa. A infecção foi realizada por um período de 24 horas, 37 °C, a uma razão de 10:1 (*Leishmania*: MΦ) utilizando amastigotas *Leishmania (L.) infantum* isolados por centrifugação diferencial de baço de hamsters previamente infectados. Após o período de infecção, amastigotas livres foram removidos por lavagem com PBS e os MΦ infectados tratados com os fármacos CBP ou SRT durante 72 horas, sob mesmas condições. Ao final do tratamento MΦs foram fixados com metanol e corados com Giemsa. Sob microscopia óptica, pelo menos 200 células foram contadas por concentração testada e o índice de infecção calculado pela seguinte equação:

$$\text{Índice de infecção} = \frac{\text{M}\Phi \text{ infectados} \times \text{n}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{M}\Phi \text{ totais}}$$

3.7 Microscopia confocal de macrófagos infectados após o tratamento com fármaco CBP

Macrófagos peritoneais foram plaqueados (4×10^5 MΦ /poço) em microplacas de 24 poços e incubados *overnight* a 37 °C a 5% CO₂ para aderência na placa. A infecção foi realizada durante 4 horas, 37 °C, a uma razão de 4:1 (*Leishmania*:MΦ) utilizando amastigotas axênicos *Leishmania (L.) pifanoi* previamente corados com CFSE (0,4 µg/mL). O tratamento com o fármaco CBP foi realizado utilizando uma única concentração de 25 µM durante 18 horas. Finalmente, MΦs tratados foram corados com DAPI 5 µg/mL por 10 minutos a 37 °C e imagens foram obtidas utilizando Microscópio Confocal Laser Scanning (CLSM) LEICA TCS SP5.

3.8 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* para desenvolvimento dos ensaios de mecanismo de ação

Para avaliar os mecanismos de ação envolvidas na atividade anti-*Leishmania* dos fármacos CBP e SRT, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^7 células/mL) foram incubados durante 4 horas contínuas em meio HBSS suplementado com 10 mM D-glicose (HBSS+glicose: 137mM NaCl, 5,3mM KCl, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 0,4 mM Na₂HPO₄, 10 mM D-glucose, pH 7.2) com os fármacos CBP ou SRT a 26 °C para determinação da CE_{50A}. Essas condições foram consideradas como padrão para todos os ensaios de mecanismo de ação realizados neste estudo. Em um experimento alternativo, uma alíquota de 20 µL desta suspensão de promastigotas tratada durante 4 horas foi transferida para uma nova placa de 96 poços contendo 100 µL de meio completo RPMI suplementado com 10% SFB, na ausência dos fármacos e incubada durante 72 horas contínuas a 26 °C para determinação da CE_{50B}. Neste experimento, o crescimento pós-tratamento, na ausência

do fármaco, sugere processos de recuperação. Após os períodos de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com MTT.

3.9 Variação dos níveis de ATP citoplasmático (ATP_c) em promastigotas 3-Luc *Leishmania donovani*

A cepa modificada 3-Luc de *Leishmania donovani* expressa uma luciferase citoplasmática de *Photinus pyralis* que catalisa a conversão do substrato D-luciferina para D-oxoluciferina na presença de O₂ com consumo de uma molécula de ATP e a emissão de um fóton. Nesse organismo, medidas de luminescência são diretamente dependentes dos níveis de ATP_c destes promastigotas¹⁴³.

Nos ensaios cinéticos da primeira hora de incubação, promastigotas 3-Luc (2×10^7 células/mL) foram ressuspensos em HBSS+glicose em presença do substrato DMNPE-luciferina (25 µM). Esta suspensão foi distribuída em placas pretas de poliestireno de 96 poços (100 µL/poço) e a luminescência medida. Uma vez que a luminescência se estabilizou, diferentes concentrações dos fármacos CBP ou SRT foram adicionadas às células, a luminescência medida durante 1 hora. O nível de luminescência no tempo=0 (adição dos fármacos) foi considerado como nível máximo (100%) de luminescência, enquanto níveis mínimos foram obtidos pela adição de solução detergente 0,1% de Triton x-100 (Tx-100).

Nos ensaios desenvolvidos após 4 horas de incubação, promastigotas 3-Luc foram primeiro incubados com os fármacos CBP ou SRT e então o substrato DMNPE-luciferina (25 µM) foi adicionado para as medidas de luminescência. Leituras estáveis foram usadas nos cálculos. Todas as leituras de luminescência foram realizadas no leitor de microplaca Polarstar Galaxy (BMG Labortechnologies, Offenburg, Alemanha).

3.10 Avaliação dos níveis intracelulares de Ca^{+2} de promastigotas *Leishmania (L.) infantum*

Para avaliar o efeito da CBP sobre os níveis de Ca^{+2} intracelular, parasitas foram monitorados usando a sonda Fura2-AM (Molecular Probes) e protocolo modificado de Sen et al¹⁴⁴. Sobre condições estabelecidas como padrão, exceto pelo uso do meio HBSS livre de Ca^{+2} (0,8 mM MgSO_4 , 5,3 mM KCl , 0,4 mM KH_2PO_4 , 4,2 mM NaHCO_3 , 137 mM NaCl , 0,4 mM Na_2HPO_4 , 10 mM D-glicose, pH 7,2), promastigotas foram pré-tratados por 40 minutos a 24 °C no escuro com solução de marcação contendo Fura2AM a 5 μM , ácido plurônico a 1 μM , F-127 para facilitar a dispersão do éster apolar AM, e sulfipirazona a 0,25 mM para evitar a perda de Fura2 citosólico para o meio extracelular⁶⁰. Após duas lavagens, promastigotas foram ressuspensos em HBSS livre de Ca^{+2} e foram incubados com CBP 30, 40 e 50 μM durante 1 hora ou 4 horas e a fluorescência monitorada. Valores mínimos e máximos de fluorescência Fura2 foram obtidos em promastigotas não tratados ou pela adição de solução detergente Tx100 a 0,5%, respectivamente. Intensidades de fluorescência foram expressas como o aumento de fluorescência em relação a intensidade de fluorescência basal medida antes da adição de fármacos. Medidas de fluorescência foram realizadas com excitação 360/35 nm (342 – 377) e emissão 500/25 (487 – 512) em usando espectrofluorímetro FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices (USA).

3.11 Avaliação dos efeitos sobre a membrana plasmática de promastigotas *Leishmania (L.) infantum*

Alterações da integridade ou funcionalidade da membrana plasmática foram avaliadas pelo aumento da fluorescência das sondas Sytox® Green ou bisoxonol, respectivamente¹⁴². Nos ensaios, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^7 células/mL) foram incubados com Sytox® Green (1 μM) ou bisoxonol (0,2 μM) em placa preta de poliestireno de 96 poços (100 μL /poço) a 26 °C, em meio HBSS+glicose e a fluorescência foi medida. Uma vez que leituras estáveis

foram obtidas, os fármacos CBP ou SRT foram adicionados em diferentes concentrações e o aumento da fluorescência foi monitorado durante 1 hora no leitor de microplaca Polarstar Galaxy, nos comprimentos de onda de λ_{ex} 485 e λ_{em} 520 para a sonda Sytox® Green e, λ_{ex} 544 e λ_{em} 584 nm para a sonda bisoxonol. Controles para máxima fluorescência foram obtidos pela adição de solução detergente 0,1% Tx-100 ou 10 μM de indolicidina no ensaio com Sytox® Green e bisoxonol, respectivamente. A integridade da membrana plasmática também foi avaliada após 4 horas de incubação com os fármacos pela adição da sonda Sytox® Green ao final do período de incubação.

3.12 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas *Leishmania (L.) infantum*

A variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi determinada pela fluorescência da sonda mitocondrial Rodamina 123 (Rd123)⁵⁵. No ensaio, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^7 células/mL) foram incubados com os fármacos CBP ou SRT durante 4 horas em meio HBSS+glicose a 26 °C. Ao final do período de incubação, promastigotas foram corados com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de Rd123 durante 10 minutos, 37 °C e, 5 $\mu\text{g/mL}$ iodeto de propídio (PI) imediatamente antes da aquisição. Promastigotas não tratados utilizados para obtenção de fluorescência máxima de Rd123, enquanto tratamento com 10 mM de KCN por 1 hora foi utilizado como controle positivo para redução da fluorescência de Rd123. Promastigotas com fluorescência positiva para PI foram considerados inviáveis e excluídos da análise. Promastigotas não corados foram usados para monitorar a fluorescência basal. Fluorescências foram medidas por citometria de fluxo no citometro FC500 Coulter (Becton-Dickinson, San Jose, CA) operando em λ_{ex} 488 e λ_{em} 520 nm para fluorescência Rd123 e, λ_{ex} 488 e λ_{em} 620 nm para fluorescência PI. Software Cell Quest foi usado para quantificação.

3.13 Determinação do potencial de membrana mitocondrial por microscopia confocal

A técnica de microscopia confocal foi utilizada para visualizar o efeito dos fármacos CBP e SRT sobre o $\Delta\psi_m$ agora utilizando outra sonda mitocondrial. MitoTracker® Red, lipofílica catiônica, cujo acúmulo também é dependente do $\Delta\psi_m$. Para o fármaco CBP, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^7 células/mL) foram incubados durante 4 horas a 26 °C em meio HBSS+glicose e posteriormente corados com 0,1 μ M MitoTracker® Red durante 10 minutos e, co-corados com DAPI 5 μ g/mL durante 15 minutos, no escuro, e então lavados com PBS antes da microscopia. Para o fármaco SRT, o ensaio foi realizado sob mesmas condições descritas acima, exceto que os promastigotes foram primeiramente corados e só então incubados durante 4 horas com SRT. Imagens foram obtidas usando Microscópio Confocal Laser Scanning (CLSM) LEICA TCS SP5 a λ_{ex} 358 e λ_{em} 461 nm para DAPI e, λ_{ex} 578 e λ_{em} 599 nm para MitoTracker® Red.

3.14 Determinação da produção de ROS

A sonda MitoSOX™ Red foi usada para detectar os níveis de radical superóxido (O_2^-) mitocondriais, uma vez que se dirige seletivamente a mitocôndria onde é oxidada pelo radical O_2^- e o produto oxidado é altamente fluorescente quando ligado a ácidos nucleicos¹⁴⁵. Resumidamente, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^7 células/mL) foram pré-incubados com 5 μ M MitoSOX™ Red por 30 minutos em HBSS+glicose a 26 °C e, então incubados com fármacos CBP ou SRT durante 30 minutos ou 4 horas. Antimicina A (0,3 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo para máxima produção de ROS, aqui representado pelo radical superóxido. Fluorescência foi medida por citometria de fluxo no citômetro FC500 Coulter (Becton-Dickinson, San Jose, CA) operando em λ_{ex} 488 e λ_{em} 520 nm e software Cell Quest foi usado para quantificação.

3.15 Determinação das taxas de consumo de oxigênio mitocondrial

O efeito dos fármacos CBP e SRT sobre a cadeia respiratória mitocondrial foi avaliado por meio de medidas das taxas de consumo de oxigênio, utilizando eletrodo Clark-oxygen (Hansatech, KingsLynn, United Kingdom), e o software Oxygraph Plus 1.01 para os cálculos das taxas de consumo de oxigênio. A 25 °C, suspensões de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (10^8 células/mL) em tampão de respiração (10 mM Tris-HCl, 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM NaH₂PO₄, 0,3 mM EGTA, pH 7,2) suplementado com 5 mM de succinato foram testadas como descrito abaixo.

A membrana plasmática dos parasitas foi permeabilizada com digitonina (60 µM). Este tratamento não danifica a membrana mitocondrial interna¹⁴⁶ onde localiza-se a cadeia respiratória mitocondrial. Na sequência, ADP (100 µM) foi adicionado para restaurar a respiração. Em seguida, os fármacos CBP ou SRT, substratos e inibidores específicos da cadeia respiratória foram adicionados a fim de mapear o complexo mitocondrial afetado dentro da cadeia respiratória. Concentrações finais: 60 µM digitonina, 100 µM ADP, 12,6 µM oligomicina, 3,3 µM FCCP, 30 µM CBP e 50 µM SRT

3.16 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Promastigotas *Leishmania (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^7 células/mL) foram incubados em meio definido HBSS+glicose durante 4 horas ou meio completo RMPI suplementado com 10% SFB durante 12 horas com os fármacos CBP ou SRT. Após o período de incubação, parasitas foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS e fixados em 5 % (m/v) de solução de glutaraldeído. Em seguida, parasitas foram incluídos em uma solução de tetróxido de ósmio 2,5 % (m/v) (OsO₄) por 1 hora. Gradualmente as amostras foram desidratadas em álcool etílico (30, 50, 70, 90, e 100% v/v; por 30 min cada), incluídas em óxido de etileno (1 h) e finalmente

embebidas em resina Epon 812¹⁴². As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL-1230, (Jeol Ltd. Akishima, Japão).

3.17 Análises estatísticas dos estudos de mecanismo ação

Valores de CE_{50} e CC_{50} foram calculados a partir de curva sigmoideal dose-resposta, enquanto análises de variância One-way ANOVA com teste Tukey's Multiple Comparison foram aplicadas para os testes de significância (p valor < 0.05) usando o software GraphPad Prism 5.0. As amostras foram testadas em duplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. Para ensaios de mecanismo de ação um ensaio representativo de pelo menos dois experimentos foi mostrado.

3.18 Estudo metabolômico das alterações bioquímicas induzidas pelos fármacos CBP e SRT

3.18.1 Tratamento promastigotas *Leishmania (L.) infantum*

Um inóculo de 4×10^5 promastigotas/mL (cepa JPC) foi crescido em meio completo RPMI 1640 a 26 °C em garrafas de vidro de 1L sob constante movimento em *roller Apparatus* (Gibco, Cell Culture) até alcançar metade da fase exponencial (8×10^6 promastigotas/mL). Em seguida, estes promastigotas foram tratados por 12 horas com CBP ($CE_{50} = 40 \mu M$) ou SRT ($CE_{70} = 35 \mu M$). Após o tratamento, estes parasitas foram lavados três vezes com HBSS sem glicose a 4 °C, aliquotados a 4×10^7 promastigotas/mL, imediatamente congelados em N₂ líquido e mantidos a -80 °C até análise. Seis réplicas de cada grupo foram usadas para os estudos metabolômicos nas três técnicas analíticas desenvolvidas EC-EM, CLAE-EM e CG-EM.

3.18.2 Obtenção do extrato metabólico

Alíquotas de 4×10^7 promastigotas/mL previamente tratados com os fármacos foram lisadas pela adição de 350 μ L metanol/água 4:1 (v/v) a 4 °C, agitação vigorosa no TissueLyser LT (Qiagen, Germany) na presença de 25 mg de pérolas de vidro lavadas em ácido de 426-660 μ m durante 10 minutos a 50 Hz. Posteriormente quatro ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido foram realizados. Partes sólidas foram removidas por centrifugação ($15700 \times g$, 10 minutos, 4 °C) na centrífuga 5415 R Eppendorf. Os extratos de metabólitos foram então recuperados para novos eppendorfs e adequadamente tratados de acordo com cada técnica analítica.

3.18.3 Controle de qualidade (CQ)

Qualquer técnica analítica está a mercê da introdução de variabilidade nas amostras biológicas pelos processos de preparo da amostra e analítico. Para as três técnicas utilizadas, amostras de controle de qualidade (CQs) foram preparadas pela mistura de volumes iguais (100 μ L) do extrato metabólicos de todas as amostras de todos os grupos. A sequência de injeção obedeceu a seguinte ordem: um mínimo de 5 amostras CQs no início da corrida; uma amostra CQ injetada a cada bloco de seis amostras randomicamente dispersas, e ao final da lista de injeção amostral. Uma vez que as amostras CQs foram preparadas a partir do *pool* de todas as amostras analisadas, nenhuma variação biológica é esperada entre elas e, portanto, qualquer distribuição anormal nos modelos de projeção reflete perturbação analítica¹⁴⁷.

3.18.4 Análises CG-EM

Três tipos de amostras foram analisados: grupo controle não tratado (n=6), grupo tratado com CBP (n=6) e amostras CQ. Cerca de 200 μ L destas amostras foram derivatizados. Para isso, os extratos metabólicos foram secos a 35 °C em SpeedVac

SPD121P (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os extratos secos foram ressuspensos em 10 µL de hidrócloro de *O*-metoxiamina em piridina (15 mg/mL) e agitados em vortex por 2 minutos. A reação de metoximação foi realizada durante 16 horas sob proteção da luz. Em seguida, 10 µL de BSTFA com 1 % TMCS (v/v) foram adicionados às amostras, então agitados em vortex por 5 minutos e incubados a 70 °C durante 60 minutos, protegidos da luz para as reações de silição. Finalmente, 100 µL de solução de C18:0 metil éster em heptano (10 mg/mL) (usada como padrão interno) foram adicionados, as amostras agitados em vortex por 2 minutos e, analisadas por CG-EM.

3.18.4.1 Instrumentação CG-EM

Sistema CG (Agilent Technologies 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas equipado com analisador quadropolo (5975 inert MSD, Agilent) e *autosampler* (7693, Agilent) controlado pelo software ChemStation (G1701EA E.02.00.493, Agilent) foi usado para as análises. Resumidamente, 2 µL de amostra derivatizada foi injetada na coluna capilar CG DB5-MS (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno quimicamente ligado a fase estacionária composta por filme de 95% dimetil/5% polidifenilsiloxano) (J&W Scientific, Folsom, CA). A velocidade de fluxo do gás de arraste hélio foi de 1,0 mL/min e a temperatura do injetor de 250 °C. A razão de *split* foi 1:10. O gradiente de temperatura foi programado da seguinte maneira: temperatura inicial de forno foi configurada para 60 °C (mantida por 1 minuto), aumento para 325 °C a uma velocidade de 10 °C/min; permitiu-se resfriamento do sistema por 10 minutos antes da próxima injeção, o tempo de corrido foi de 37,5 minutos. As temperaturas da linha de transferência, fonte do filamento e quadropolo foram configuradas em 290 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente. A ionização por elétrons foi o método de ionização utilizado a 70 eV. O espectrômetro de massa foi operado em modo *scan* sobre o intervalo de 50–600 *m/z* a uma velocidade de 2,0 scan/s.

3.18.5 Análises CLAE-EM

Três tipos de amostras foram analisadas: grupo controle não tratado (n=6), grupo tratado (n=6) e amostras CQ. Cerca de 200 µL de extrato metabólico foram filtrados por meio de filtros de seringa de 0,22 µm MS® nylon e transferidos a frascos Chromacol™ (inserção de vidro de 300 µL, fundida dentro de frasco de 2 mL com tampa para injeção) para as análises.

3.18.5.1 Instrumentação CLAE-EM

Sistema LC (Agilent 1200 Series HPLC) equipado com desgaseificador, duas bombas binárias e *autosampler* acoplado a espectrômetro de massa equipado com analisador Q-TOF (*quadrupole-time-of-flight*) (6520, Agilent), controlado pelo software Mass Hunter Workstation Data Acquisition (B.04.00, Agilent).

Resumidamente, 10 µL de amostra foram injetados na coluna de fase reversa (Supelco Discovery HS, C18, 150 × 2.1 mm i.d., 3.0 µm, Bellefonte, PA, EUA) mantida a 40 °C com pré-coluna (Supelco Discovery HS, C18, 2.0 cm x 2.1 mm i.d., 3.0 µm, Bellefonte, PA, USA). O sistema foi operado a uma taxa de vazão de 0,6 mL/min com solvente A (0,1 % (v/v) de ácido fórmico em água MilliQ) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). O gradiente foi de 25% a 95% B em 35 minutos seguidos de 5 minutos de 95% de B, retornando a condições iniciais em 1 minuto e reequilíbrio a 25% de B por 9 minutos. O tempo total da análise foi de 50 minutos.

O sistema QTOF foi operado em ionização *dual electrospray* polaridade positiva (ESI+) e negativa (ESI-) a fim de ampliar aumentar o número de íons detectados. Modo *full scan* de *m/z* 50 a 1000 foi realizado na taxa de 1,0 espectro por segundo. As condições do *electrospray* foram: voltagem do capilar 3000 V, temperatura do gás de secagem a 330 °C, taxa de fluxo de 10,5 mL/min, e pressão do nebulizador 52 psi. As condições para MS-TOF (*time-of-flight*) foram: fragmentador 175 V, skimmer 65 V e voltagem de radiofrequência octopolar de 750 V. Durante as análises duas massas de referência foram usadas para permitir correção constante de massa: 121.0509 – purina

(C₅H₄N₄) e 922.0098 – HP-0921 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄). As amostras foram analisadas randomicamente e mantidas a 4 °C dentro do *autosampler* durante todo o período de análise.

3.18.6 Análises EC-EM

Três tipos de amostras foram analisadas: grupo controle não tratado (n=6), grupo tratado (n=6) e amostras CQ. Cerca de 120 µL do extrato metabólico foram secos a 35 °C em SpeedVac SPD121P (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e ressuspendidos em 120 µL de solução de 0,2 mM de L-metionina sulfona (padrão interno) + 0,1% ácido fórmico em água em frascos Chromacol™ para as análises. As amostras foram centrifugadas a $15.700 \times g$ por 10 minutos (4 °C) e então analisadas por EC-EM.

3.18.6.1 Instrumentação EC-WM

Sistema EC (7100 Agilent) acoplado a espectrômetro de massa com analisador tipo TOF (6224 Agilent) foi usado. O sistema EC foi controlado pelo software ChemStation (B.04.03, Agilent) e o MS pelo Mass Hunter Workstation Data Analysis (B.02.01, Agilent). A separação eletroforética foi realizada por meio de um capilar de sílica fundida (Agilent) (comprimento total de 100 cm; 50 µm de diâmetro interno). Separações ocorreram em polaridade positiva em solução eletrolítica contendo 0,8 M de ácido fórmico em 10% metanol (v/v) a 20 °C. Novos capilares foram pré-tratados com fluxo de 1,0 M de NaOH por 30 minutos seguido de água MiliQ por 30 minutos e solução eletrolítica por 30 minutos. Antes das análises os capilares foram condicionados na solução eletrolítica por 5 minutos (pressão 950 mbars). O líquido auxiliar (*sheath liquid*) (6 µL/min) foi metanol/água (1/1, v/v) contendo 1,0 mM de ácido fórmico com duas massas de referências: 121.0509 (C₅H₄N₄) e 922.0098 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄) para correção e alta precisão de massa no MS.

As amostras foram hidrodinamicamente injetadas a 50 mbar por 50 segundos. Efeito de empilhamento (*stacking*) foi realizado aplicando a solução eletrolítica a 10 mbar por 10 segundos. A voltagem de separação foi de 30 kV com 25 mbar de pressão interna. As análises foram realizadas em 30 minutos. As condições para MS: fragmentador 100 V, skimmer 65 V, octopolo 750 V, pressão do nebulizador 20 psi, temperatura do gás de secagem a 200 °C e taxa de fluxo de 12,0 mL/min. A voltagem do capilar foi de 3500 V. Dados foram adquiridos em *Dual-ESI* apenas no modo positivo *full scan* de m/z 80 a 1000 a uma taxa de 1,02 scan/s.

3.18.7 Extração, alinhamento e obtenção da uma matriz de dados

Após coleta dos dados brutos, os mesmos foram processados para correção da linha de base, exclusão do ruído de fundo e artefatos gerados pelo instrumento e extração dos *features*. As ferramentas *Molecular Feature Extraction* (MFE) do software Mass Hunter Qualitative Analysis (B.06.00, Agilent) e *DA Reprocessor Offline Utilities* B.05.00 (Agilent) foram utilizados.

O método de extração de *features* foi desenhado para usar informações como massa exata, distribuição isotópica (^{13}C ; ^{15}N , ^{37}Cl), presença de adutos ($+\text{Na}^+$, $+\text{K}^+$, $+\text{HCOO}^-$), dímeros ($[\text{2M}+\text{H}]^+$, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$), íons com múltiplas cargas ($[\text{M}+\text{nH}]^+$) e perdas de moléculas neutras (H_2O , NH_3) para separar íons co-eluentes e assignar um valor único definido como *feature*. A abundância de um *feature* foi obtida pela soma do volume de cada íon/pico relacionado derivado dos diferentes produtos de ionização ou formação de adutos. Para uma definição simplificada, entenda *feature* como uma entidade molecular pura com m/z e T_R únicos¹⁴⁸.

A seguir, os *features* foram alinhados usando o programa Mass Profiler Professional - 12.6.1, Agilent¹⁴⁸ e algoritmo MFE. Neste processo os picos presentes em todas as amostras em um mesmo m/z e T_R foram assignados para uma mesmo *feature*. O alinhamento foi realizado sem prévia correção de T_R .

Para CLAE-EM, alinhamento foi realizado dentro do intervalo de 0,3 to 36,0 minutos no modo positivo (ESI+) e, 0,3 to 32,0 minutos no modo negativo (ESI-), aplicando-se 1% no parâmetro janela T_R (*RT window*) e 20 ppm no parâmetro

tolerância de massa (*mass tolerance*). Para EC-EM, o alinhamento foi realizado dentro do intervalo de 1,26 a 34,0 minutos aplicando-se 2% no parâmetro janela T_R (*RT window*) e 10 ppm no parâmetro tolerância de massa (*mass tolerance*).

Para CG-EM, a deconvolução dos dados foi realizada no software *Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS 2.71) para separação dos metabólitos coeluentes. Os dados foram alinhados no MPP e normalizados com base no *total signal chromatogram* (TSC).

Para todas as técnicas analíticas, ao final do processo de alinhamento obteve-se matrizes de dados contendo informações das entidades moleculares puras (*features*) com massa exata, T_R únicos, e abundância.

3.18.8 Tratamento dos dados metabolômicos

Devido a sensibilidade e quantidade de dados obtidas por técnicas MS, frequentemente, a matriz de dados gerada após o processamento contém *features* irreprodutíveis e *missing values* (*features* identificado, exceto para uma amostra cuja abundância é desconhecida). Para reduzir o impacto dessas deformações da matriz ao longo do processo de seleção estatística, as matrizes de dados foram filtradas no software Excel (Microsoft® Office, 2010) e *missing values* tratados no software Matlab (R2010a, version 7.10.0.499) como descrito a seguir.

Apenas *features* presentes em pelo menos 50% dos CQs, com um desvio padrão relativo (%DPR) menor que 30% foram mantidos. Aqui, análises de componentes principais (PCA) foram realizadas usando software SIMCA-P+ (12.0.1.0, Umetrics) para verificar a reprodutibilidade e estabilidade analítica de cada técnica.

Em seguida, as matrizes de dados foram novamente filtradas mantendo apenas *features* presentes em pelo menos 66,66% das amostras em um determinado grupo (não tratado ou tratado). *Missing values* (ausência de abundância) foram tratados pelo seguinte critério: substituídos pela média se o *feature* estava presente em mais de 50% das amostras do grupo, ou substituídos por zero, se o *feature* estava presente em menos de 50% das amostras do grupo.

3.18.9 Análises estatísticas dos estudos metabolômicos

3.18.9.1 Análise estatística multivariada

Análises multivariadas baseiam-se no fato de que amostras biológicas semelhantes variam com alto grau de correlação entre si. Assim algoritmos são capazes de encontrar e resumir tais correlações em modelos de projeção de fácil interpretação a partir de parâmetros como coeficientes de variação (R^2) e predição (Q^2). Coeficiente R^2 representa a proporção da variância que pode ser explicada pelo modelo, enquanto coeficiente Q^2 representa a capacidade de predição do mesmo¹⁴⁹.

Modelos de projeção não supervisionado PCA, e supervisionados Análise de Discriminante Linear com Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), e Análise Discriminante pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais Ortogonal (OPLS-DA) foram construídos usando programa Simca-P+ (12.0.1, Umetrics, Umea, Sweden para comparações entre amostras tratadas e amostras não tratadas. Duas estratégias de escalonamento da matriz de dados foram testadas para amenizar a distorções produzidas na construção dos modelos de projeção: (i) escalonamento por unidade de variância (UV) que utilizada desvio padrão como fator de escalonamento e, (ii) escalonamento tipo Pareto que utilizada raiz quadrada do desvio padrão, como fator de escalonamento¹⁴⁸.

Intervalos de confiança *jackknife* (refletem a estabilidade e incerteza de cada *features* dentro do modelo e parâmetros de projeção como VIP (*Variable Importance Projection*) que resumem a importância de cada *feature* em valores (>1 são considerados “importantes” e <0.5 são considerados “não importantes”)¹⁵⁰ foram obtidos a partir dos modelos OPLS-DA para seleção dos *features* estatisticamente significantes dentro do modelo de projeção multivariado.

3.18.9.2 Análise estatística univariada

Somada as análises multivariadas, um teste de significância univariada ($p < 0.05$) foi aplicado individualmente para cada *feature* identificado usando o teste Mann-Whitney U (Matlab R2010a, versão 7.10.0.499).

Outros cálculos pertinentes as análises metabolômicas foram descritos a seguir.

Erro de identificação (tabelas 3 e 6) foi calculado como:

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{MM experimental} - \text{MM banco de dados})}{\text{MM banco de dados}} \times 10^6$$

Porcentagem de desvio padrão relativo (%DPR) foi calculada como:

$$\% \text{DPR} = \frac{\text{abundância média amostras CQs}}{\text{desvio padrão}} \times 100$$

Porcentagem de variação dos níveis de abundância média de um metabólito identificado em promastigotas tratados em relação aos níveis do mesmo metabólito em promastigotas não tratados (tabelas 3 e 6) foi calculada como:

$$\% \text{ Variação} = \frac{(\text{abundância média tratados} - \text{abundância média não tratados})}{\text{abundância média não tratados}} \times 100$$

3.18.10 Determinação da identidade metabólica dos *features*

Massas exatas foram usadas na identificação dos *features* estatisticamente significativos a partir de bancos de dados *online* como METLIN

(<http://metlin.scripps.edu>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/genome.html>), e LIPIDMAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) usando CEU *mass mediator* (<http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator>; erro 10 ppm) desenvolvido *in-house* pela Universidade CEU-San Pablo, Madri, Espanha. Informações da base LeishCyc (<http://biocyc.org/LEISH/organisms-summary?object=LEISH>) também foram consideradas.

3.18.11 Confirmação da identidade dos metabólitos

Uma única massa exata pode corresponder a múltiplos metabólitos conhecidos e, portanto, fornece uma identificação apenas putativa. Portanto a designação putativa descrita neste estudo é limitada a % de probabilidade e significa que o metabólito não foi confirmado por nenhuma das metodologias adicionais descritas e seguir.

Na plataforma CG-EM, a identificação dos metabólitos foi realizada pela comparação dos padrões de fragmentação da amostra aos padrões de fragmentação das bibliotecas comerciais Fiehn RTL Library (FiehnLib) e NIST (MS, 2.0 g) utilizando software *ChemStation PBM algorithm* (G1701EA E.02.00.493, Agilent). Padrão de fragmentação produzida na ionização tipo IE apresenta mínima variabilidade de instrumento para instrumento que somada à confirmação dos T_R altamente reprodutível de CG-EM, permitem a identificação confiável dos metabólitos⁹⁰.

Na plataforma CLAE-EM, a técnica CLAE-EM/EM foi utilizada para confirmar a identidades putativas com probabilidade superior a 70%. Nestas análises, sistema QTOF (modelo 6520, Agilent) foi utilizado sob mesmas condições cromatográficas anteriormente descritas. Aqui, uma nova análise cromatográfica foi realizada para correção dos T_{RS} . Após esse passo, íons foram selecionados para fragmentação por Dissociação Induzida por Colisão (CID) com base na massa monoisotópica exata e T_R corrigidos. O perfil de fragmentação de cada metabólito foi confirmado em banco de dados online ou injeção de padrões comerciais disponíveis na biblioteca CEMBio-CEU-Madri.

A fim de confirmar a identidade dos metabólitos identificados por EC-EM, as amostras foram reanalisadas com as mesmas condições eletroforéticas iniciais, na

presença de padrões comerciais disponíveis na biblioteca CEMBio para comparação da área total e confirmação do tempo de migração (T_M) do metabólito.

3.18.12 Interpretação biológica dos resultados multiplataforma analítica

A co-identificação de metabólitos pelas diferentes técnicas analíticas empregadas foi verificada pela aplicação de Diagramas de Venn¹⁵¹.

Para visualizar a tendência de variação metabólica encontrada após incubação com os fármacos, figuras *heatmap* foram construídas utilizando ferramenta *online* específica para análise de dados metabolômicos (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Para comparação entre as diferentes técnicas, os dados foram normalizados pela razão entre média centrada da abundância dos metabólitos e desvio padrão de cada metabólito¹⁵². Nas figuras de *heatmap*, linhas representam a abundância normalizada e colunas correspondem as diferentes amostras de cada grupo de estudo.

4 RESULTADOS: FÁRMACO CICLOBENZAPRINA

4.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* e citotóxica do fármaco CBP

A concentração efetiva 50% contra parasitas *Leishmania (L.) infantum* (CE₅₀) e concentração citotóxica 50% (CC₅₀) em células de mamífero NCTC (clone 929) foram determinadas pelo ensaio MTT e cálculo do índice de infecção. Após 72 horas de incubação, CBP mostrou um valor de CE_{50C} de 4,3 µM contra formas promastigotas e CE_{50C} 8,6 µM contra formas amastigotas intracelulares. O valor de concentração citotóxica CC₅₀ foi de 70,6 µM, resultando em um índice de seletividade (IS) de 8,2. O fármaco padrão miltefosina foi apenas 1,5 vezes mais seletivo que o fármaco CBP (Tabela 1), nas condições *in vitro* testadas.

Tabela 1 - Atividade biológica do fármaco CBP contra parasitas *Leishmania (L.) infantum* (CE₅₀) e citotóxica (CC₅₀) em células de mamífero NCTC

Fármacos	CE ₅₀ (μM)±SEM					IS
	promastigotas		amastigotas		NCTC	
	CE _{50A}	CE _{50B}	CE _{50C}	CE _{50C}	CC ₅₀	
CBP	31,8±0,7	24,6±2,3	4,3±0,2	8,6±0,6	70,6±11,4	8,2
Miltefosina	nd	nd	16,7±3,5	10,5±3,5	125±3,0	11,9

CE_{50A} determinada após 4 horas contínuas; CE_{50B} determinada após 72 horas, posterior ao contato inicial de 4 horas com CBP; CE_{50C} determinada após 72 horas contínuas na presença de CBP; CC₅₀ determinada após 72 horas. nd: não determinado. Índice de seletividade: CC₅₀/CE_{50C} ama.

Para demonstrar o efeito da CBP sobre amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c foram infectados com amastigotas axênicos de *Leishmania pifanoi*, corados com CFSE (0,4 µg/mL) e incubados com 25 µM de CBP durante 18 horas. Nessas condições houve uma redução de 42% do número de macrófagos infectados. Imagens de microscopia confocal mostraram clara dispersão da sonda CFSE de amastigotas tratados (Figura 10a) em contraste com a forma bem definida de amastigotas não tratados (Figura 10b). Esses resultados sugeriram que a incubação com CBP promove lise seletiva dos amastigotas intracelulares.

Figura 10 - Efeito da ciclobenzaprina em amastigotas intracelulares de *Leishmania pifanoi* no interior de macrófagos peritoneais. (a) Macrófagos infectados e incubados com 25 μ M de CBP durante 18 horas. (b) Macrófagos infectados e não tratados. Amastigotas foram corados antes da infecção com CFSE (0,4 μ g/mL) e o núcleo dos macrófagos foram corados com DAPI (5 μ g/mL). Barras 15 μ m. Objetiva de imersão (100X).

4.2 Determinação da atividade anti-*Leishmania* para desenvolvimento dos ensaios de mecanismo de ação do fármaco CBP

As primeiras alterações causadas por fármacos são as mais prováveis relacionadas ao alvo primário. Por este motivo, a atividade anti-*Leishmania* para o desenvolvimento dos estudos de mecanismo de ação, foi determinada em 4 horas de incubação contínua com o fármaco CBP em meio definido (HBSS+glicose), resultando em um valor de CE_{50A} de 31,8 μ M (Tabela 1).

Um estudo alternativo foi realizado para demonstrar a capacidade de recuperação do parasita. Uma alíquota de 20 μ L da suspensão de parasitas incubados por 4 horas contínuas com o fármaco, foi removida para uma nova microplaca. Desta forma, permitiu-se a proliferação destes promastigotas por mais 72 horas, utilizando o

meio completo (RPMI + 10% SFB), livre da pressão constante do fármaco CBP. Nesse experimento, o valor de CE_{50B} foi de 24,6 μM . Este resultado sugeriu que, promastigotas foram incapazes de se recuperarem dos danos iniciais desencadeados pelo fármaco CBP, visto que o valor de CE_{50} continua diminuindo.

4.3 Avaliação dos níveis de ATP_c de promastigotas 3-Luc de *Leishmania donovani* após incubação com fármaco CBP

Promastigotas 3-Luc na presença do substrato DMNPE-luciferina, foram desafiados com diferentes concentrações de CBP; os dados demonstraram uma rápida redução (48%) nos níveis de luminescência a 30 μM ($\blacktriangledown$) ($\sim CE_{50A}$) em relação aos promastigotas não tratados ($\blacksquare$). Concentrações correspondentes a $\sim CE_{60A}$ (40 μM , $\circ$) e $\sim CE_{70A}$ (50 μM , $\bullet$) demonstraram uma redução ainda maior de 54,5% e 61,4%, respectivamente (Figura 11a). Após 4 horas de incubação, o nível de luminescência medido na CE_{50A} foi de 25% comparado aos promastigotas não tratados, enquanto concentrações maiores, mostraram níveis de luminescência similares ao tratamento com solução detergente de 0,1% de Tx100 ($\square$) (Figura 11b).

Estes resultados sugeriram que CBP induz uma rápida diminuição dos níveis de ATP_c em promastigotas *Leishmania*.

Figura 11 - Avaliação dos níveis de ATP_c de promastigotas 3-Luc *Leishmania donovani* incubados com CBP (a). Inibição da luminescência acompanhada até 1 hora na presença de CBP. (b) Inibição da luminescência após 4 horas de tratamento. Legenda das concentrações de CBP: 0 μM (■, controle não tratado); 10 μM (Δ); 30 μM ($\blacktriangledown$); 40 μM ($\circ$); 50 μM ($\bullet$). Inibição máxima de luminescência foi obtida pelo tratamento com 0,1% de Tx100 ($\square$). Os dados foram normalizados em relação ao controle não tratado. *** $p < 0.0001$

4.4 Avaliação dos níveis de Ca^{+2} de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com fármaco CBP

Alterações nos níveis intracelulares de Ca^{+2} após incubação de promastigotes com CBP durante 1 e 4 horas foram monitoradas através da fluorescência da sonda Fura2AM em meio definido HBSS livre de Ca^{+2} . Durante a primeira hora de incubação, o fármaco CBP induziu um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} citosólico de maneira concentração-dependente intensificado em 4 horas de incubação, onde houve aumento significativo de 45%, 60% e 70% induzido pelas concentrações de 30, 40 e 50 μM , respectivamente. Sob mesmas condições, 1 mM ditiotreitol (DTT), um composto comumente utilizado para induzir estresse de RE e distúrbios na homeostase de Ca^{+2} , produziu um aumento de 39% da fluorescência fura2 em 4 horas de incubação (Figura 12).

Estes resultados sugeriram que CBP induz um aumento dos níveis de Ca^{+2} citoplasmático em promastigotas *Leishmania*.

Figura 12 - Avaliação dos níveis de Ca^{+2} intracelular de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com CBP durante 1 e 4 horas. Intensidades de fluorescência Fura2 foram corrigidas em relação as intensidades basais medidas antes da adição dos fármacos e normalizadas em relação a promastigotas não tratadas e fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$) obtida pela permeabilização dos parasitas pela adição de 0,5% de solução detergente Tx100. Dados representam % média $\pm$ SE de três experimentos independentes. *** $p < 0.0001$

4.5 Avaliação das alterações da membrana plasmática de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* induzidas pelo fármaco CBP

A permeabilidade e o $\Delta\psi_p$ da membrana plasmática de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP foram monitorados a partir dos níveis de fluorescência das sondas Sytox® Green e bisoxonol, respectivamente. Após 4 horas de incubação, nenhuma fluorescência do Sytox® Green pôde ser medida em promastigotas tratados com CBP nas concentrações testadas (Figura 13a). Promastigotas pré-corados com bisoxonol e incubados com CBP (adição CBP no tempo=0) apresentaram rápido aumento da fluorescência bisoxonol (Figura 13b). Na CE_{50A} (30 μM), a fluorescência do bisoxonol medida foi de 59% em relação a fluorescência máxima produzida pelo tratamento com 10 μM de indolicidina, um peptídeo membrana ativo usado como controle positivo, enquanto concentrações de

40 μM e 50 μM produziram aumento da fluorescência do bisoxonol de 87% e 110%, respectivamente. Estes resultados sugeriram que a CBP altera a funcionalidade da membrana plasmática através de alterações do $\Delta\psi_p$, sem induzir danos severos de integridade, como por exemplo, poros de membrana suficientemente grandes para a entrada da sonda Sytox® Green.

Figura 13 - Avaliação da permeabilidade (Sytox® Green) (a) e do potencial de membrana plasmática (bisoxonol) (b) de *Leishmania (L.) infantum* na presença do fármaco CBP. As porcentagens de fluorescência são relativas a fluorescência máxima adquirida pelo tratamento com 0,1% de Tx100 (a) ou 10 μM de indolicidina (b). Legenda das concentrações de CBP: 0 μM (■, controle não tratado); 20 μM (Δ); 30 μM (∇); 40 μM ($\circ$); 50 μM ($\bullet$). *** $p < 0.0001$.

4.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotas incubados com fármaco CBP determinada por citometria de fluxo

A variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP foi avaliada pela fluorescência da sonda mitocondrial Rd123. Após 4 horas de incubação, promastigotas incubados a 30 μM ($\text{CE}_{50\text{A}}$) mostraram redução de 29% de fluorescência Rd123 em relação a fluorescência máxima medida em promastigotas não tratados. Esta redução foi similar a de 28% induzida pelo inibidor do complexo IV da cadeia respiratória, KCN (10 mM) (Figura 14). Concentrações de 40 e 50 μM de CBP induziram uma redução de 52% e 76% em relação a fluorescência máxima. Estes resultados sugeriram que o fármaco altera o

$\Delta\psi_m$. A adição de PI ao final do período de incubação foi usada exclusivamente para fins de exclusão de células inviáveis, nas medidas de fluorescência Rd123.

Figura 14 - Variação do $\Delta\psi_m$ em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP durante 4 horas indiretamente determinada pela fluorescência Rd123 por citometria de fluxo. (a) Dot-plots exibem variação de fluorescência Rd123 *versus* variação de fluorescência PI. (b) Gráfico de barras da intensidade de fluorescência Rd123, promastigotas não tratados determinaram a fluorescência máxima, promastigotas despolarizados foram obtidos pelo tratamento com KCN 10 mM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

4.7 Avaliação $\Delta\psi_m$ de promastigotas incubados com fármaco CBP determinada por microscopia confocal

A fim de confirmar a despolarização do $\Delta\psi_m$ causado pelo fármaco CBP, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* foram incubados durante 4 horas com 50 μM CBP e em seguida corados com 0,1 μM de MitoTracker® Red. Similarmente a sonda Rd123, MitoTracker® Red cora seletivamente mitocôndrias e seu acúmulo é dependente do $\Delta\psi_m$. Imagens de microscopia confocal demonstraram intensa redução do acúmulo de MitoTracker® Red em promastigotas tratados com CBP comparado a promastigotas não tratados, evidentemente marcados pela fluorescência vermelha MitoTracker® Red (Figura 15).

Figura 15 - Determinação da fluorescência da sonda mitocondrial Mitotracker® red por microscopia confocal de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados CBP. Mitocôndria e núcleo foram corados com Mitotracker® Red (0,1 μ M) e DAPI (5 μ g/mL), respectivamente. Barra: 10 μ m. Objetiva de imersão (100X).

4.8 Taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com fármaco CBP

Processos de respiração mitocondrial e síntese de ATP são acoplados, localizados na cadeia respiratória mitocondrial e dependentes da manutenção do $\Delta\psi_m$. Na tentativa de identificar uma inibição específica dentro da cadeia respiratória, as taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* foi medida na presença de diferentes inibidores e substratos específicos da cadeia respiratória.

Inicialmente verificou-se que a adição de 30 μ M CBP a promastigotas *Leishmania (L.) infantum* promovia aceleração da taxa de respiração de 18,42 ($\text{min}^{-1} \times 10^8 \text{ células}$) para 20,09 ($\text{min}^{-1} \times 10^8 \text{ células}$) (gráficos não mostrados). Em seguida, este efeito foi confirmado em promastigotas permeabilizados com digitonina (60 μ M); nesses experimentos, o succinato foi utilizado como único substrato para alimentar a cadeia respiratória no complexo II, enquanto a digitonina foi utilizada para permeabilizar a membrana plasmática e mitocondrial externa e permitir livre acesso dos inibidores e substratos à cadeia respiratória. Os resultados foram descritos a seguir.

A respiração de promastigotas tratados com digitonina foi acelerada em 44% pela adição de ADP (100 μ M). Neste estágio, o ADP deixa de ser um substrato limitante para a fosforilação oxidativa em decorrência de sua dispersão para o meio extracelular após o tratamento com digitonina. Mais importante, esse resultado assegura a integridade da membrana mitocondrial interna sob estudo. O próximo passo foi a inibição do complexo V (ATPase) usando oligomicina (12,6 μ M). Essa inibição promoveu uma redução de 25% na respiração. A adição do fármaco CBP (30 μ M) a esses promastigotas restaurou a taxa de consumo de oxigênio em 11% (Figura 16a).

Sob mesmas condições, a respiração de promastigotas tratados com digitonina foi recuperada em 41% pela adição de ADP, inibida em 29% pela adição de oligomicina e, nesse caso, a respiração foi recuperada em 25% usando o clássico desacoplador mitocondrial FCCP (3,3 μ M) (Figura 16b).

Estes resultados indicaram que o fármaco CBP atua na cadeia respiratória como desacoplador mitocondrial fraco quando comparado ao FCCP.

Figura 16 - Avaliação das taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* permeabilizados com digitonina. (a) Efeito do fármaco CBP sobre a cadeia respiratória mitocondrial. (b) Efeito do desacoplador mitocondrial FCCP. As setas indicam a adição de substratos e inibidores. Concentrações finais usadas foram: 60 μ M digitonina; 100 μ M ADP; 12,6 μ M oligomicina; 3,3 μ M FCCP e 30 μ M CBP. As taxas de consumo de oxigênio foram calculadas a partir das correspondentes inclinações da reta mostrada como nmol O₂.min⁻¹, cujos valores foram graficamente demonstrados em barras na base inferior esquerda da figura.

4.9 Produção de ROS mitocondrial em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP

O aumento da produção de ROS mitocondrial induzido pela CBP foi determinado pela fluorescência da sonda MitoSOX™ Red. O fármaco CBP produziu aumento significativo da fluorescência MitoSOX™ Red comparado promastigotas não tratados, apenas em altas concentrações, e após 4 horas de incubação. Na concentração de 40 μM e 50 μM observou-se um aumento significativo de 26% e 50%, respectivamente (Figura 17). A antimicina A (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo, atuando como inibidor do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial.

Figura 17 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, e antimicina A (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada para máxima produção de ROS; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; ns: não significativo.

4.10 Microscopia eletrônica (TEM) de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com CBP

Promastigotas *Leishmania (L.) infantum* foram incubados com CBP (30 μM) durante 4 horas em meio definido (HBSS+glicose) ou 12 horas em meio completo (RPMI+10%SFB) para avaliação das alterações ultraestruturais por microscopia

eletrônica de transmissão (TEM). As principais alterações observadas após os períodos de incubação foram: (i) espessamento e acúmulo de material biológico em estreitas membranas tubulares com características de RE, (ii) presença vacúolos com conteúdo organelar similares a autofagossomos, e (iii) presença anormal de estruturas lipídicas no interior citoplasmático após 12 horas de incubação (Figura 18). Membrana plasmática não foi alterada, corroborando os resultados da sonda Sytox® Green. Promastigotas incubados com CBP não apresentaram intenso processo de inchaço mitocondrial.

4.11 Estudo metabolômico das alterações metabólicas induzidas pelo fármaco CBP

Diferentemente dos ensaios de mecanismo de ação acima descritos, os quais focaram em alterações ocorridas até 4 horas de incubação, as análises metabolômicas focaram em alterações bioquímicas durante 12 horas de incubação. Neste ensaio, o meio definido HSBB + glicose foi substituído por meio completo RPMI, a fim de evitar que a ausência de nutrientes interferisse no efeito do fármaco. Sob estas condições, uma nova CE_{50} de $39 \pm 3 \mu M$ foi determinada pelo ensaio do MTT para o desenvolvimento dos estudos metabolômicos. Resumidamente, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* foram incubados durante 12 horas com $40 \mu M$ (CE_{50}) de CBP, lavados, aliquotados, e tiveram o metabolismo paralisado por congelamento. Extratos metabólicos foram analisados EC-EM, CG-EM e CLAE-EM a fim de comparar as alterações metabólicas entre promastigotas não tratados vs promastigotas tratados.

Figura 18 - Alterações morfológicas ultraestruturais determinadas por microscopia TEM induzidas pelo fármaco CBP. Promastigotas não tratados (a,b); promastigotes tratados com 30 μ M CBP durante 4 horas (c,e); e 12 horas (d,f). Legenda: n: núcleo, k, cinetoplasto, #: autofagossomo, re: retículo endoplasmático (cabeça de seta branca). Seta preta: acúmulo de estruturas de membranas. Barras: 1 μ m.

4.12 Estudo metabolômico do fármaco CBP: validação analítica

Após aquisição dos dados nas três plataformas analíticas, os cromatogramas e eletroferogramas (EC) foram reprocessados, alinhados e as matriz de dados foram filtradas a partir das amostras CQs, a fim de eliminar falso-positivos e *features* com baixa reprodutibilidade. Apenas *features* que cumpriam o critério de presença $\geq 50\%$ e $\%DPR < 30\%$ das amostras CQs foram mantidos. Para validação analítica, modelos PCA foram construídos. Em todas as plataformas analíticas, o agrupamento das amostras CQs (■) em uma área bem definida do gráfico demonstrou que as técnicas e métodos possuíram estabilidade e reprodutibilidade aceitáveis (Figura 19). Mesmo em análises não supervisionadas como PCA, onde o algoritmo aplicado não tem conhecimento sobre a identidade de cada amostra, houve a separação das amostras em grupos definidos, sugerindo uma real variabilidade biológica entre promastigotas tratados com o fármaco CBP e promastigotas não tratados.

Figura 19 - Validação analítica dos estudos metabolômicos. Modelos PCA, componente 1 vs componente 2 foram plotados. (a) EC-EM: $R^2=0.775$; $Q^2=0.574$. (b) CG-EM: $R^2=0.609$; $Q^2=0.465$. (c) CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.700$; $Q^2=0.472$. (d) CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.729$; $Q^2=0.625$. R^2 = coeficiente de variação explicada; Q^2 = coeficiente de predição. CQs: controle de qualidade.

4.13 Estudo metabolômico do fármaco CBP: filtragem, escalonamento dos dados e validação quimométrica

Uma vez que a metodologia e instrumentação analítica foram consideradas válidas, a matriz de dados foi novamente filtrada mantendo apenas *features* presentes em pelo menos 66% das amostras de um grupo, e *missing values* foram tratados como descrito em materiais e métodos.

Em seguida, modelos PLS-DA foram usados para investigar o impacto de escalonamento tipo UV e ou tipo pareto sobre a matriz de dados; e validar a diferença biológica entre os grupos amostrais (não tratados vs CBP tratados).

Escalaonamento tipo UV ou tipo pareto foram testados para ajustar a importância atribuída aos *features* dentro de um modelo de projeção, evitando que *features* de intensidade mais altas dominem a análise e mascarem *features* de menor intensidade. Gráficamente, ambos os tipos de escalaonamento produziram modelos PLS-DA com parâmetros de variabilidade (R^2) e predictabilidade (Q^2) muito similares e clara separação entre os grupos amostrais. Entretanto, quando a matriz pós escalaonamento foi graficamente expressa em função do sinal escalaonado de cada *feature*, calculado pela soma das abundâncias de um mesmo *feature* detectado de nos dois grupos amostrais, um grande impacto sobre os dados pôde ser determinado (Figura 20). O escalaonamento tipo UV (Figura 18c) afetou com maior intensidade a dimensionalidade da matriz enquanto o escalaonamento tipo pareto (Figura 20b) permanece mais próximo do dado original (Figura 20a), assegurando um impacto mais suave. Portanto, o escalaonamento tipo pareto foi selecionado em todas as análises posteriores descritas neste estudo.

Figura 20 - Representação do impacto de escalonamento sobre a matriz de dados adquirida pela plataforma CLAE-EM (ESI+). (a) Dados brutos não escalonados. (b) Dados escalonados tipo pareto. (c) Dados escalonados tipo UV.

A real variabilidade biológica entre promastigotas tratados e não tratados foi confirmada pela validação quimométrica dos modelos PLS-DA. Na abordagem de validação cruzada, os dados foram randomicamente divididos em três partes e 1/3 das amostras foram excluídas para construção de modelos contendo os 2/3 de amostras remanescentes. As amostras excluídas foram então preditas para novos modelos (Figura 21) e o procedimento repetido até que todas as amostras tenham sido preditas pelo menos uma vez. O modelo matemático deve ser capaz de alocar corretamente todas as amostras excluídas em seus respectivos grupos segundo suas características biológicas. Em 100% dos testes, as amostras foram corretamente preditas validando

fundamentalmente a diferença biológica entre amostras de promastigotas tratados com CBP e promastigotas não tratados.

Figura 21 - Validação biológica dos modelos PLS-DA. Componente 1 vs componente 2. (a) EC-EM: $R^2=0.990$, $Q^2=0.972$. (b) Predição EC-EM: $R^2=0.996$, $Q^2=0.990$. (c) CG-EM: $R^2=0.990$, $Q^2=0.949$. (d) Predição CG-EM: $R^2=0.992$, $Q^2=0.964$. (e) CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.989$, $Q^2=0.947$. (f) Predição CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.997$, $Q^2=0.928$. (g) CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.996$, $Q^2=0.981$. (h) Predição CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.994$, $Q^2=0.976$. R^2 = coeficiente de variância explicada; Q^2 = coeficiente de predição.

4.14 Estudo metabolômico do fármaco CBP: análises estatísticas e confirmação dos metabólitos

Para discriminar quais *features* foram responsáveis pelas diferenças significativas entre tratados e não tratados, métodos supervisionados como OPLS-DA (Figura 22) foram construídos para projeção. Intervalos de confiança *jackknife* e gráficos de importância de variáveis (*VIP plots*) (gráficos não mostrados) foram obtidos para seleção de *features* com diferenças significantes ($p < 0.05$). Em paralelo, teste Mann-Whitney U (não-paramétrico) foi aplicado em análises univariadas para obtenção do valor de significância $p < 0.05$ para cada *feature* separadamente.

Figura 22 - Modelos OPLS-DA. Componente 1 vs componente 2. (a) EC-EM: $R^2=0.990$, $Q^2=0.971$. (b) CG-EM: $R^2=0.997$, $Q^2=0.966$. (c) CLAE-EM (ESI+): $R^2=0.989$, $Q^2=0.949$. (d) CLAE-EM (ESI-): $R^2=0.996$, $Q^2=0.980$.

Após a seleção dos *features* significativamente variantes, identidades metabólicas foram determinadas por meio da massa exata obtida com auxílio banco de dados *online* seguida da confirmação analítica pela adição de padrão comercial na

plataforma EC-EM (APÊNDICE A) e estudo do padrão de fragmentação após análises CLAE-EM/EM (APÊNDICE B).

4.15 Estudo metabolômico do fármaco CBP: resultados multiplataforma

Um total de 15.545 *features* foram detectados e alinhados. Após procedimentos de filtragens e análises estatísticas, um total de 1.124 *features* cumpriram o critério estatístico de seleção (p valor <0.05), onde 115 foram identificados e confirmados como metabólitos. A tabela 2 resume todos os processos de seleção empregados ao longo deste estudo.

Tabela 2 - Número de *features* detectados e metabólitos confirmados após o tratamento de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* com o fármaco CBP

Plataforma analítica	após alinhamento	após filtragem	estatisticamente significantes	identificado/confirmado
EC-EM	1462	97	72	22
CG-EM	75	36	17	17
CLAE-EM (ESI-)	5016	694	542	39
CLAE-EM (ESI+)	8992	922	493	37
Total	15545	1749	1124	115

As três plataformas analíticas foram complementares (Figura 23a) e alguns metabólitos, identificados por mais de uma técnica analítica. Finalmente, resultados multiplataforma indicaram que um total de 90 diferentes metabólitos, pertencentes a diferentes classes bioquímicas (Figura 23b), foram alterados pelo tratamento com o fármaco CBP. Lipídios, foi a classe bioquímica majoritariamente afetada, particularmente glicerofosfolipídios (GFLs) (38%) e ácidos graxos (AGs) (17%). Aminoácidos corresponderam a segunda classe bioquímica afetada (20%), seguidos de carboidratos (6%).

Figura 23 - (a) Complementariedade entre as três plataformas analíticas EC-EM, CG-EM e CLAE-EM modos positivo e negativo na identificação de 115 metabolitos totais. (b) Distribuição das classes bioquímicas dos 90 diferentes metabólitos alterados pelo fármaco CBP.

Tabela 3 compila os resultados para os 90 diferentes metabólitos com valores estatísticos (erro, %DPR, *p* valor e VIP), % de variação do metabólito, classe bioquímica e técnica de identificação.

Tabela 3 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Aminas										
1	colina ^{padrão}	C5H13NO	103.0997	1.86	7.83	753.48	0.002	1.2	confirmado	EC-EM
2	fosfocolina ^{padrão}	C5H14NO4P	183.0660	1.42	20.55	105.13	0.002	0.9	confirmado	EC-EM
	fosfocolina ^{metlin}	C5H14NO4P	183.0660	-2.19	16.16	237.77	0.002	0.7	60.081/71.0798/86.0959/98.9823/ 124.9998/166.062/184.0723	CLAE-EM(+)
3	putrescina ^{padrão}	C4H12N2	88.1000	4.56	6.19	99.74	0.002	1.0	confirmado	EC-EM
Aminoácidos (AAs)										
4	alanina/sarcosina/ β -alanina	C3H7NO2	89.0477	5.63	7.40	118.46	0.002	2.8	Putativo 98.95%	EC-EM
5	serina ^{padrão}	C3H7NO3	105.0426	1.88	7.86	140.49	0.002	1.6	confirmado	EC-EM
6	prolina ^{padrão}	C5H9NO2	115.0633	0.86	8.47	190.28	0.002	2.2	confirmado	EC-EM
	prolina ^{NIST}	C5H9NO2	115.0633	0.00	21.23	64.06	0.002	1.4	confirmado	CG-EM
7	valina ^{padrão}	C5H11NO2	117.0790	-0.02	7.14	117.14	0.002	1.8	confirmado	EC-EM
8	pirrolina-hidroxi-carboxilato ^{padrão}	C5H7NO3	129.0426	3.08	14.80	102.70	0.002	0.5	confirmado	EC-EM
9	4-hidroxi-prolina ^{NIST}	C5H9NO3	131.0582	0.00	14.11	67.70	0.002	2.1	confirmado	CG-EM
10	leucina/isoleucina ^{padrão}	C6H13NO2	131.0946	0.73	7.87	116.01	0.002	3.1	confirmado	EC-EM
11	asparagina ^{padrão}	C4H8N2O3	132.0535	2.29	9.52	687.60	0.002	1.5	confirmado	EC-EM
	asparagina ^{NIST}	C4H8N2O3	132.0535	0.00	15.81	109.24	0.002	0.9	confirmado	CG-EM
12	aspartato ^{padrão}	C4H7NO4	133.0375	0.71	8.90	1184.72	0.002	1.1	confirmado	EC-EM

continua

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Aminoácidos (AAs)										
13	lisina ^{padrão}	C6H14N2O2	146.1055	0.69	8.86	192.02	0.002	1.4	confirmado	EC-EM
14	glutamato ^{padrão}	C5H9NO4	147.0532	2.67	8.33	121.24	0.002	2.0	confirmado	EC-EM
	glutamato	C5H9NO4	147.0532	1.31	7.33	413.41	0.002	0.7	Putativo 91.43%	CLAE-EM (-)
15	metionina ^{padrão}	C5H11NO2S	149.0510	2.05	3.43	172.28	0.002	1.2	confirmado	EC-EM
16	histidina ^{padrão}	C6H9N3O2	155.0695	0.62	8.23	112.55	0.002	0.6	confirmado	EC-EM
17	fenilalanina ^{padrão}	C9H11NO2	165.0790	2.45	9.18	176.17	0.002	1.3	confirmado	EC-EM
18	arginina ^{padrão}	C6H14N4O2	174.1117	1.18	7.10	29.37	0.002	0.9	confirmado	EC-EM
19	tirosina ^{NIST}	C9H11NO3	181.0739	0.00	17.50	36.45	0.004	0.5	confirmado	CG-EM
20	cistationina ^{padrão}	C7H14N2O4S	222.0674	2.26	7.86	61.97	0.002	0.8	confirmado	EC-EM
21	glutathiona dissulfeto (GSSG) ^{padrão}	C20H32N6O12S2	612.1520	3.10	15.40	171.94	0.002	0.9	confirmado	EC-EM
	glutathiona dissulfeto (GSSG)	C20H32N6O12S2	612.1520	-1.11	7.64	175.65	0.002	0.9	Putativo 95.39%	CLAE-EM (-)
Carboidratos (Carbs)										
22	mio-inositol ^{NIST}	C6H12O6	180.0634	0.00	6.77	43.86	0.002	2.3	confirmado	CG-EM
23	furanose (sorbitol/manitol) ^{NIST}	C6H14O6	182.0790	0.00	9.67	93.55	0.002	1.5	confirmado	CG-EM
24	Monossacarídeo C5 fosfato ^{metlin}	C5H11O8P	230.0192	-4.20	4.12	272.37	0.002	0.6	71.0138/78.9587/96.9691/138.9352	CLAE-EM (-)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Ácidos graxos (AGs)										
25	Monossacarídeo C6 fosfato ^{metlin}	C6H13O9P	260.0297	-1.13	2.41	218.27	0.002	0.6	78.9614/96.9588/259.0283*	CLAE-EM (-)
26	piranose (lactose/lactulose) ^{NIST}	C12H22O11	342.1162	0.00	21.33	366.93	0.002	0.4	confirmado	CG-EM
27	Ácido málico ^{metlin}	C4H6O5	134.0215	5.97	20.21	258.00	0.002	0.6	43.0166/59.0112/71.0134/72.9993/89.0193/115.0028/133.0149*	CLAE-EM (-)
28	Ácido mirístico ^{metlin}	C14H28O2	228.2089	0.44	21.05	54.28	0.026	0.5	57.0714/71.0869/89.0601/103.0745/124.0869/117.0906/131.1042/148.0912/229.2159*	CLAE-EM(+)
29	Octadecadienal ^{padrão}	C18H32O	264.2453	1.89	16.59	-13.88	0.002	1.1	55.0547/57.0703/69.0697/83.0853/95.0855/109.101/123.1155/135.1169/149.1304/163.1483/177.1622/191.1714/205.1912/247.2398/265.2514	CLAE-EM(+)
30	Ácido heptadecanóico ^{NIST}	C17H34O2	270.2558	0.00	10.39	77.40	0.002	0.5	confirmado	CG-EM
31	Ácido estearidônico ^{metlin}	C18H28O2	276.2089	-3.59	12.35	57.60	0.002	0.4	59.0123/109.1797/135.4556/149.9887/163.0896/177.1572/203.7510/231.2065/275.2014*	CLAE-EM (-)
32	Ácido α -linolênico ^{metlin}	C18H30O2	278.2246	0.44	11.19	343.78	0.002	5.4	59.0132/259.2094/277.2180*	CLAE-EM (-)

Continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Ácidos graxos (AGs)										
32	Ácido α -linolênico ^{metlin}	C18H30O2	278.2246	2.16	13.98	185.40	0.002	2.7	55.0547/57.0704/67.0547/69.0695/81.0698/83.0853/95.0856/97.1009/109.1009/123.1156/135.1161/137.1297/149.1313/163.1455/175.1452/189.1626/209.1512/223.1706/245.2246/263.2358/279.2296*	CLAE-EM(+)
33	Ácido linoleico ^{NIST}	C18H32O2	280.2402	0.00	10.69	108.51	0.009	1.1	confirmado	CG-EM
	Ácido linoleico ^{metlin}	C18H32O2	280.2402	0.34	12.84	262.57	0.002	3.2	59.0134/261.2013/279.2236*	CLAE-EM (-)
34	Ácido oleico ^{NIST}	C18H34O2	282.2559	0.00	14.30	198.19	0.004	0.5	confirmado	CG-EM
	Ácido oleico ^{metlin}	C18H34O2	282.2559	-3.54	13.44	292.68	0.002	2.0	281.2479*	CLAE-EM (-)
35	Ácido linolênico metil ester ^{metlin}	C19H32O2	292.2402	1.03	21.35	104.14	0.002	0.9	55.0539/67.0541/81.0707/95.0857/109.1008/123.1154/137.1292/149.136/173.1343/187.1437/243.2049/261.219/293.2469	CLAE-EM(+)
36	Ácido aracdônico ^{lipidmaps}	C20H32O2	304.2402	-5.93	9.46	206.21	0.002	0.5	59.0107/177.0947/231.2039/259.2617/285.2231/303.2334*	CLAE-EM (-)
37	Ácido eicosatrienóico ^{metlin}	C20H34O2	306.2559	-3.13	11.33	425.65	0.002	1.0	59.0082/83.0516/113.0517/186.0517/305.2497*	CLAE-EM (-)
38	Ácido eicosadienóico ^{metlin}	C20H36O2	308.2715	-4.69	19.18	460.05	0.002	0.6	307.2652*	CLAE-EM (-)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Ácidos graxos (AGs)										
39	Ácido 4,7,10,13,16,19, docosahexaenóico ^{metlin}	C22H32O2	328.2402	-2.85	10.22	350.63	0.002	3.5	41.0401/59.0140/67.0563/83.0494/107.0840/121.0998/135.1172/147.1179/149.1274/161.1305/175.1495/229.1973/249.1789/255.2107/283.2423/327.2316*	CLAE-EM (-)
	Ácido 4,7,10,13,16,19, docosahexaenóico ^{metlin}	C22H32O2	328.2402	1.52	11.32	322.32	0.002	1.2	55.0525/67.0543/81.0678/93.0698/95.0857/109.101/119.0822/131.0825/145.1125/161.1327/175.1444/187.1381/201.1599/207.1271/215.1784/227.1646/247.168/269.2236/293.222/311.2368/329.2442*	CLAE-EM(+)
40	Ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenóico ^{metlin}	C22H34O2	330.2559	-2.30	9.47	396.00	0.002	2.0	59.0152/155.3270/231.2099/285.2585/329.2486*	CLAE-EM (-)
	Ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenóico ^{metlin}	C22H34O2	330.2559	6.66	16.21	270.48	0.002	0.6	57.0666/67.0537/81.0693/95.0868/109.0999/119.0830/150.0614/175.1400/189.1677/215.1421/271.2352/295.2338/313.2444/331.2551*	CLAE-EM(+)
41	Ácido 7,10,13,16-docosatetraenóico	C22H36O2	332.2715	-4.56	12.60	488.96	0.002	0.7	Putativo 74.66%	CLAE-EM (-)
Glicerolipídios (GLs)										
42	MG(18:0/0:0/0:0) ^{padrão}	C21H42O4	358.3083	2.51	22.51	135.92	0.041	1.3	57.0699/71.0854/95.0833/116.0511/109.1039/123.1216/137.1282/341.3045/359.313	CLAE-EM(+)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolípidios (GFLs)										
43	glicerol 1-fosfato ^{NIST}	C3H9O6P	172.0137	0.00	12.58	132.79	0.002	1.2	confirmado	CG-EM
44	Glicerofosfocolina ^{padrão}	C8H20NO6P	257.1028	1.17	13.35	617.27	0.002	1.4	60.0826/86.0978/ <u>104.1072</u> /124.9993/166.0594/184.0703/240.1027/258.1098*	CLAE-EM(+)
	Glicerofosfocolina	C8H20NO6P	257.1028	0.72	13.69	189.39	0.002	1.4	Putativo 97.41	EC-EM
45	LPE(16:1)	C21H42NO7P	451.2699	-3.76	10.44	146.31	0.002	0.5	78.9575/112.9823/140.0050/153.0045/196.0413/214.5417/ <u>253.2179</u> /450.2548*	CLAE-EM (-)
46	LPE(17:1) ^{lipidmaps}	C22H44NO7P	465.2856	-3.12	9.28	130.66	0.002	0.5	78.9676/112.6878/140.0079/152.9847/196.0340/214.0596/ <u>267.2310</u> /464.2713*	CLAE-EM (-)
47	LPC(14:0) ^{padrão}	C22H46NO7P	467.3012	0.43	10.55	81.98	0.002	0.8	86.0966/104.1064/ <u>184.0721</u> /285.2379/391.2379/450.2939/468.3058*	CLAE-EM(+)
48	LPE(18:3)	C23H42NO7P	475.2699	-0.21	10.36	159.45	0.002	2.7	78.9583/140.0106/152.9936/196.0366/214.0486/ <u>277.2172</u> /474.2660*	CLAE-EM (-)
	LPE(18:3)	C23H42NO7P	475.2699	1.89	11.07	135.15	0.002	2.0	62.0603/261.2164/304.2613/ <u>335.2552</u> /476.2657*	CLAE-EM(+)
49	LPE(18:2)	C23H44NO7P	477.2856	0.94	10.15	70.10	0.002	2.7	78.9588/140.0086/152.9908/196.0369/214.0473/279.2332/476.2798*	CLAE-EM (-)
	LPE(18:2) ^{padrão}	C23H44NO7P	477.2856	3.56	11.77	94.95	0.026	1.8	62.0603/81.0696/95.0852/155.0099/216.0605/263.2349/306.2772/337.2723/460.2808/478.2917*	CLAE-EM(+)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolipídios (GFLs)s										
50	LPE(18:1)	C23H46NO7P	479.3012	0.88	10.18	146.82	0.002	3.0	78.9587/140.0124/152.9957/196.0382/214.0487/281.2511/478.3011*	CLAE-EM (-)
	LPE(18:1) ^{lipidmaps}	C23H46NO7P	479.3012	2.30	11.79	108.39	0.002	2.2	62.0606/155.01/265.2495/308.2929/339.2878/419.2529/462.2926/480.306	CLAE-EM(+)
51	LPC(16:2)	C24H46NO7P	491.3012*	0.00	9.85	133.84	0.002	0.6	44.9987/78.9521/112.9816/152.9906/168.0337/224.0663/242.0830/251.2019/476.2801/536.299*	CLAE-EM (-)
52	LPC(16:1) ^{padrão}	C24H48NO7P	493.3168	0.00	11.86	144.94	0.002	1.1	86.096//104.1068/184.072/258.1087/311.259/417.2351/476.3134/494.3229*	CLAE-EM(+)
	LPC(16:1)	C24H48NO7P	493.3168*	0.00	9.19	186.18	0.002	1.4	44.9988/78.9605/152.9955/168.0428/224.0687/242.0788/253.2145/478.2884/538.31*	CLAE-EM (-)
53	LPC(17:3)	C25H46NO7P	503.3011*	-3.38	10.58	153.47	0.002	0.9	44.9988/78.9566/152.9941/168.0384/224.0679/242.0750/263.2019/275.9169/488.2756/548.298*	CLAE-EM (-)
	LPC(17:3)	C25H46NO7P	503.3011	0.40	10.84	131.01	0.002	0.7	60.0799/86.0962/104.1068/124.9976/166.0593/184.0721/258.1113/486.296/504.3049*	CLAE-EM(+)
54	LPC(17:2)	C25H48NO7P	505.3168	0.14	7.80	137.44	0.002	0.5	60.0792/86.0947/104.1069/124.9905/166.0614/184.0734/258.1020/488.3083/506.3207*	CLAE-EM(+)
55	LPC(17:1) ^{padrão}	C25H50NO7P	507.3325	-0.20	10.22	180.57	0.002	0.7	86.0967/104.1022/184.0862/3391.7752/449.1297/508.3116*	CLAE-EM(+)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolipídios (GFLs)										
56	LPC(18:4)	C26H46NO7P	515.3012	0.97	11.00	31.67	0.002	0.9	60.0813/86.0966/104.107/124.9987/166.0623/184.0723/258.1084/333.239/439.2219/498.2953/516.3040*	CLAE-EM(+)
57	LPC(18:3)	C26H48NO7P	517.3168	4.57	12.06	112.14	0.002	7.8	Putativo 87.73%	CLAE-EM(+)
	LPC(18:3)	C26H48NO7P	517.3168*	-2.39	8.41	110.27	0.002	1.5	78.9599/152.9974/168.0416/224.0696/242.0815/277.2172/502.2974*	CLAE-EM (-)
58	LPC(18:2) ^{padrão}	C26H50NO7P	519.3325	4.81	10.40	109.15	0.002	4.8	71.0738/81.0698/86.0969/95.0857/104.1076/124.9992/166.0615/184.0733/258.1088/337.2725/443.2538/502.3275/520.3384*	CLAE-EM(+)
	LPC(18:2)	C26H50NO7P	519.3325*	-2.18	8.31	109.26	0.002	0.9	78.9554/152.9933/168.0399/224.0668/242.0732/279.2345/504.3149*	CLAE-EM (-)
59	LPC(18:1) ^{padrão}	C26H52NO7P	521.3481	1.73	11.59	165.35	0.002	3.2	60.0819/86.0964/104.1071/124.999/166.0698/184.0727/258.1073/339.2867/445.268/504.3426/522.3533*	CLAE-EM(+)
	LPC(18:1)	C26H52NO7P	521,3481*	0.00	9.89	232.44	0.002	4.0	44.9986/78.9599/168.0436/224.0669/242.0806/281.2486/506.3247/566.34*	CLAE-EM (-)
60	LPE(22:6) ^{padrão}	C27H44NO7P	525.2855	-3.00	9.78	133.42	0.002	0.6	59.0131/78.9564/140.0094/153.0009/196.0388/214.0436/283.2389/327.2291/524.2793*	CLAE-EM (-)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolipídios (GFLs)										
61	LPC(19:3)	C27H50NO7P	531.3325 *	0.00	9.50	214.29	0.002	0.9	44.9978/78.9576/152.9880/168.1034/224.0747/242.0918/291.2316/516.3087/576.32*	CLAE-EM (-)
	LPC(19:3)	C27H50NO7P	531.3325	-5.83	10.54	174.80	0.002	0.8	60.0814/86.0957/104.1068/124.9998/166.0623/184.0723/258.1036/514.3243/532.3363*	CLAE-EM(+)
62	LPC(19:2)	C27H52NO7P	533.3481 *	-5.25	11.67	119.45	0.002	0.6	60.0819/86.0983/104.1051/124.9946/166.0636/184.0716/258.1087/516.3525/534.3526*	CLAE-EM(+)
63	LPC(19:1)	C27H54NO7P	535.3638 *	0.19	14.03	78.44	0.002	0.5	44.9984/78.9589/152.9929/168.0377/224.0657/242.0756/295.2617/520.3385/580.36*	CLAE-EM (-)
64	LPC(20:3) ^{padrão}	C28H52NO7P	545.3481	3.67	12.02	186.77	0.002	4.3	86.0968/104.1074/124.9997/166.0616/184.073/258.1058/363.2871/469.2696/528.3423/546.3538	CLAE-EM(+)
	LPC(20:3)	C28H52NO7P	545.3481 *	-2.26	9.53	189.10	0.002	0.8	78.9561/168.0377/224.0736/242.0795/305.2500/530.3377*	CLAE-EM (-)
65	LPC(20:2) ^{padrão}	C28H54NO7P	547.3638	2.01	10.63	163.62	0.002	2.5	60.0813/71.072/86.0964/104.1069/124.9986/166.0622/184.0723/258.109/365.3051/471.2828/530.3571/548.3685*	CLAE-EM(+)
	LPC(20:2)	C28H54NO7P	547.3638	-0.18	10.79	230.08	0.002	3.2	44.9989/78.9569/152.9950/168.0410/224.0684/242.0819/307.2652/532.3427/592.36*	CLAE-EM (-)
66	LPC(20:1) ^{padrão}	C28H56NO7P	549.3795	0.36	11.20	112.43	0.002	1.1	60.0813/71.0833/86.0966/104.1068/124.9993/166.0630/184.0720/258.1124/367.3173/473.3030/532.3710/550.2833*	CLAE-EM(+)
67	LPC(22:6)	C30H50NO7P	567.3325	4.94	10.38	122.33	0.002	6.1	60.0803/86.0968/104.1075/124.9986/166.0614/184.0721/258.1039/385.2755/491.2533/550.3295/568.3361*	CLAE-EM(+)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolípidios (GFLs)										
68	LPC(22:5) ^{padrão}	C30H52NO7P	569.3481	4.39	11.51	148.69	0.002	4.2	60.0813/71.0725/86.0964/104.1069/124.9993/184.0721/258.1098/387.2838/493.2729/552.3438/570.3542*	CLAE-EM(+)
69	LPC(22:4) ^{padrão}	C30H54NO7P	571.3638	1.05	12.27	105.52	0.002	0.8	60.0818/86.0972/104.1064/184.0716/259.1038/389.2941/495.2797/554.3494/572.3585	CLAE-EM(+)
70	LPC(22:1)	C30H60NO7P	577.4108	1.56	17.85	76.65	0.002	0.6	60.0797/86.097/104.1064/125.0009/166.0542/184.0722/258.1027/270.2755/301.1361/337.2763/395.3334/501.3309/560.4081/578.4158*	CLAE-EM(+)
71	LPI(17:1)	C26H49O12P	584.2961	2.67	15.08	221.23	0.002	0.9	78.9583/152.9947/222.9964/241.0092/267.2302/315.0441/403.2255/583.2856*	CLAE-EM (-)
72	LPI(18:3)	C27H47O12P	594.2805	-2.05	14.38	368.15	0.002	2.8	78.9572/152.9948/222.9957/241.0099/277.2161/315.0470/333.0527/413.2043/593.2743*	CLAE-EM (-)
73	LPI(18:2)	C27H49O12P	596.2961	-1.07	15.33	260.53	0.002	3.9	78.9581/152.9942/222.9971/241.0107/279.2315/315.0511/333.0520/415.2197/595.2834*	CLAE-EM (-)
	LPI(18:2)	C27H49O12P	596.2961	0.34	29.00	287.39	0.002	0.6	Putativo 75.60%	CLAE-EM(+)

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
74	LPI(18:1)	C27H51O12P	598.3118	1.34	19.53	188.63	0.002	10.7	78.9595/152.9952/222.9961/241.0110/281.2475/315.0503/333.0606/417.2395/597.3056*	CLAE-EM (-)
75	PC(16:0/5:0(COOH))	C29H56NO10P	609.3642	-4.59	21.83	1178.81	0.002	1.2	Putativo 77.19%	CLAE-EM(+)
76	PA	C41H73O8P	724.5043	4.23	13.05	71.26	0.041	0.8	Putativo 91.47%	CLAE-EM (-)
Esfoliolipídios (ELs)										
77	C17 esfoliosina ^{lipidmaps}	C17H35NO2	285.2668	-1.05	16.51	3319.97	0.002	0.6	56.0514/166.0976/238.25/268.2621/286.2611	CLAE-EM(+)
78	C17 esfolianina ^{lipidmaps}	C17H37NO2	287.2824	-0.35	12.82	575.82	0.002	1.3	60.0451/81.0690/95.0862/109.0988/124.0832/137.1201/166.0959/226.2451/231.1105/240.2636/252.2443/270.2758/288.2661*	CLAE-EM(+)
79	C-18 esfoliosina ^{padrão}	C18H33NO2	295.2511	0.00	14.20	-38.79	0.004	0.6	71.0856/99.0801/109.1020/123.1142/147.1161/261.2266/279.2309/296.2558*	CLAE-EM(+)
80	esfolianina ^{metlin}	C18H39NO2	301.2981	-1.33	17.23	182.57	0.002	1.1	60.0448/95.085/254.2793/266.282/284.2932/302.2932	CLAE-EM(+)
Ácidos orgânicos										
81	urea ^{NIST}	CH4N2O	60.0324	0.00	22.17	-72.83	0.004	0.5	confirmado	CG-EM
82	Succinato ^{padrão}	C4H6O4	118.0266	-3.42	19.72	174.43	0.002	0.9	confirmado	EC-EM
	Succinato ^{NIST}	C4H6O4	118.0266	0.00	6.12	64.56	0.002	1.5	confirmado	CG-EM

continuação

Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco CBP

	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	%DPR CQs	% Variação	p valor	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
83	Imidazol lactato ^{padrão}	C6H8N2O3	156.0535	9.63	11.73	98.40	0.002	0.6	confirmado	EC-EM
Purinas/pirimidinas e conjugados										
84	Hipoxantina ^{NIST}	C5H4N4O	136.0385	0.00	15.96	109.84	0.004	0.7	confirmado	CG-EM
	Hipoxantina	C5H4N4O	136.0385	-4.40	4.83	326.62	0.002	0.6	Putativo 92.45%	CLAE-EM (-)
85	Xantina	C5H4N4O2	152.0334	-3.96	16.60	405.24	0.002	0.7	41.9970/ 78.9595/ <u>108.0180</u> /136.9132/151.0240*	CLAE-EM (-)
Esteróis										
86	17β-Hidroxiesteróide/ Androstan-3alfa,17beta-diol	C19H32O2	292.2402	-4.12	13.20	416.18	0.002	0.6	Putativo 79.70%	CLAE-EM (-)
87	ergosterol ^{NIST}	C28H44O	396.3392	0.00	9.35	-64.52	0.002	2.0	confirmado	CG-EM
Outros										
88	Ácido fosfórico ^{NIST}	H3PO4	97.9768	0.00	6.20	-9.11	0.041	2.2	confirmado	CG-EM
89	Pipecolato ^{NIST}	C6H11NO2	129.0789	0.00	18.69	258.45	0.002	0.5	confirmado	CG-EM
90	Aminoimidazol ribotide	C8H14N3O7P	295.0569	6.44	16.60	PT	0.002	1.1	Putativo 83.11%	CLAE-EM(+)

conclusão

^{sobrescrito} refere-se à confirmação por meio de padrão comercial ou base de dados; erro, % de variação %DPR foram calculados como descrito no item 3.18.9.2; PT: presente apenas nos promastigotas tratados; Perfil de fragmentação EM em tandem: fragmento sublinhado corresponde ao mais abundante; *fragmento precursor MG, monoglicerídeos; PA, ácido fosfatídico; LPE, lisofosfatidiletanolamina; LPC, lisofosfatidilcolina, LPI, lisofosfatidilinositol, LPS, lisofosfatidilserina; nomenclatura: exemplo, LPC(nº de carbonos na cadeia FAs: grau de insaturação), LPC(16:1).

4.16 Metabolômica: interpretação biológica

A representação gráfica em forma de *heatmap*¹⁵² do perfil das alterações metabólicas revelou que a CBP promove um aumento de abundância da maioria dos metabólitos identificados após 12 horas de incubação (Figura 24). A figura 25 resume as principais vias metabólicas com seus respectivos metabólitos identificados.

Figura 24 - *Heatmap* do efeito de regulação positiva do metabolismo de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após 12 horas de incubação com fármaco CBP. A escala na lateral direita representa o nível das variações: vermelho indica aumento enquanto verde indica diminuição, valores respectivos a tabela 3.

Figura 25 - Resumo das principais vias metabólicas e seus respectivos metabólitos alteradas após incubação de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* com fármaco CBP. Setas indicam o tipo de variação sofrido por cada via metabólica.

A figura 26 descreve o mecanismo de ação da CBP em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* proposto após a análise de todos os resultados obtidos neste estudo.

Figura 26 - Mecanismo de ação proposto para a atividade leishmanicida da CBP em parasitas *Leishmania*. O fármaco CBP atravessa membrana plasmática causando (1) diminuição do $\Delta\psi_p$; no interior citoplasmático induz um (2) estresse do RE com liberação de Ca^{2+} para o citoplasma; concomitantemente a indução de um desacoplamento brando da cadeia respiratória mitocondrial (II, III, IV, V) e depleção dos níveis de ATP. Com o efeito prolongado, a liberação de Ca^{2+} parece (3) ativar autofagia e seu influxo para a mitocôndria potencializar efeitos deletérios induzindo (4) diminuição do $\Delta\psi_m$ e o (5) aumento da produção de ROS; a longo prazo, o fármaco CBP induziu uma alteração metabólica caracterizada pelo (6) aumento dos níveis da maioria dos metabólitos e (7) atividade desregulada de transportadores de membrana gerando alto gasto energético associado a condições insuficientes de produção de energia, resultando em morte celular. Mecanismos representados em cinza são hipotéticos e carecem de comprovação. Espessura da seta indica intensidade de efeito.

4.17 Discussão

O fármaco CBP é um quimioterápico tricíclico de administração oral com ação central. É um fármaco com patente expirada e amplamente comercializado como um antiespasmódico. Apesar da similaridade estrutural com antidepressivos tricíclicos,

cuja atividade antiparasitária é conhecida desde a década de 80, a eficácia *in vivo* anti-*Leishmania* do fármaco CBP foi apenas recentemente descrita por nosso grupo de pesquisa¹¹⁴. Em continuação, no presente estudo, os mecanismos de ação responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* do fármaco CBP foram investigados.

O mecanismo de ação da CBP como antiespasmódico no hospedeiro mamífero, apesar de pouco compreendido, tem sido localizado no sistema nervoso com envolvimento da inibição de receptores 5HT₂¹²⁸, efeito este, não propriamente associado a uma ação na musculatura local. Receptores 5HT₂ são membros da grande família de receptores de membrana plasmática responsáveis pela transdução de ~80% dos estímulos extracelulares para vias de sinalização intracelulares, através da ativação de proteínas G heterotriméricas (GPCRs – *G Protein-Coupled Receptors*)¹⁵³. Receptores GPCRs e proteínas G heterotriméricas são ausentes em tripanossomatídeos, assim como várias importantes moléculas de sinalização celular encontradas no hospedeiro¹⁵⁴.

Apesar de não se conhecer seus alvos em *Leishmania*, a atividade antiparasitária observada, sugere que o fármaco CBP apresente alvos específicos no parasita, independente daqueles descritos na célula do hospedeiro. De fato, a atividade anti-*Leishmania* da CBP não foi restrita a um efeito “leishmanistático” em incubações de 4 horas (CE_{50A}). Este efeito foi capaz de desencadear um processo letal e irreversível, potencializado ao longo do tempo, conforme observado pela sua atividade 7 vezes maior após 72 horas de incubação (CE_{50C}), assim como pela incapacidade de recuperação dos promastigotas após a retirada da pressão contínua do fármaco (CE_{50B} 1,3 vezes menor que CE_{50A}). O efeito leishmanicida irreversível também parece ocorrer no estágio intracelular da *Leishmania*, como sugerido pela lise de amastigotas tratados com CBP após 18 horas.

Modificações de fluidez, ordenamento e dinâmica das funções de bicamadas lipídicas são comumente associadas a ação de antidepressivos tricíclicos devido a interações não-covalentes com fosfolipídios de membrana¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. De fato, aumento de fluidez associado a inibição de bombas Na⁺/K⁺ foram descritos após o tratamento com amitriptilina e nortriptilina em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos¹⁵⁸. Em *Leishmania*, a difusão da CBP através da membrana plasmática, diminuiu o $\Delta\psi_p$, o

qual foi medido indiretamente a partir da fluorescência da sonda bisoxonol, sem induzir danos severos a estrutura da bicamada lipídica, conforme observado pela ausência de fluorescência da sonda Sytox® Green. De fato, um efeito detergente sob membranas lipídicas seria esperado apenas em altas concentrações (15-30 mM) como descrito para o fármaco análogo, amitriptilina¹⁵⁹. Enquanto, a diminuição do $\Delta\psi_p$ e inibição do transporte de prolina, representam mecanismos anteriormente correlacionadas ao efeito leishmanicida de vários antidepressivos tricíclicos¹⁰⁷.

Um alto gasto energético é previsto para recuperação do $\Delta\psi_p$. Promastigotas incubados durante 4 horas com CBP demonstraram despolarização do $\Delta\psi_m$ associada a uma pronunciada diminuição dos níveis de ATP_c (Figura 10b), sugerindo um efeito direto sobre a mitocôndria do parasita e o processo de síntese de ATP. De fato, CBP induziu o desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial, como determinado tanto pelo aumento das taxas de consumo de oxigênio em promastigotas intactos, quanto pelo efeito direto sobre a cadeia respiratória mitocondrial de promastigotas tratados com digitonina em presença de oligomicina, um inibidor da ATPase mitocondrial. Apesar do uso de concentrações até 10 vezes maiores, o efeito desacoplador da CBP foi 2,25 vezes menor quando comparado ao clássico desacoplador mitocondrial, FCCP, caracterizando assim, um efeito desacoplador brando.

O exato mecanismo pelo qual o fármaco CBP desacopla a cadeia respiratória mitocondrial de *Leishmania* é desconhecido. Em concentrações apropriadas, clássicos desacopladores como FCCP, desacoplam a cadeia respiratória por meio de um efeito protonofórico, onde a oxidação de substratos, não mais inibida pelo controle respiratório, procede a velocidades máximas na produção de calor ao invés da síntese de ATP¹⁶⁰. Análogos tricíclicos parecem ter múltiplos efeitos sobre a cadeia respiratória, diferindo dos clássicos desacopladores e apresentando diferentes sítios de inibição. Foi descrito que imipramina desacopla a cadeia, aumentando a atividade reversa da ATPase mitocondrial, produzindo altas taxas de hidrólise de ATP, porém, sem indução do efeito protonofórico¹⁶¹. Adicionalmente, clomipramina e amitriptilina inibem o complexo III^{162,163}, enquanto clorpromazina inibe o complexo IV¹⁶⁴.

A inibição específica de complexos ao longo da cadeia respiratória, usualmente está associada ao aumento significativo da produção de ROS^{163,165}, assim como a produção de ROS e processos de desacoplamento, parecem agir como um ciclo de retroalimentação¹⁶⁶. O fármaco CBP não produziu aumento significativo de ROS até 4 horas de incubação na CE_{50A} de 30 μ M, concentração na qual o efeito desacoplador foi observado.

Especificamente para o fármaco CBP, o aumento de metabólitos como monossacarídeos-5-fosfato (ribose/ribulose/xilose-5-fosfato), monossacarídeos-6-fosfato (glicose/frutose-6-fosfato) sugeriram a regulação positiva da via das pentoses fosfato, a principal responsável pela manutenção da razão NADPH/NADP⁺, essencial ao sistema tiol antioxidante de *Leishmania*¹⁶⁷. Além disso, o próprio sistema tiol pareceu estar regulado positivamente como sugerido pelo aumento de glutathiona dissulfeto (GSSG). Esses resultados somados a baixa capacidade de inibição da TryR previamente descrita para CBP¹¹⁴, sugerem que a exacerbação do estresse oxidativo é provavelmente contingenciada pelo metabolismo tiol-redox operante em promastigotas incubados com CBP. Entretanto, em altas concentrações de CBP o acúmulo de ROS ao longo do tempo, pode contribuir como um mecanismo coadjuvante no processo de morte induzido pela CBP.

Em nossos estudos, foram necessárias 4 horas para a máxima depleção de ATP_c, enquanto a máxima despolarização do $\Delta\psi_p$, foi alcançada na primeira hora de incubação. Além disso, o esgotamento dos níveis de ATP_c não foi acompanhado por um colapso total do $\Delta\psi_m$, sugerindo que a inibição da síntese de ATP mitocondrial pode não ter sido completa. A severa drenagem dos baixos níveis de ATP_c, pode ser decorrente do mal funcionamento das bombas H⁺-ATPases da membrana, na tentativa de recuperar o $\Delta\psi_p$ ¹⁴² amplamente afetado pela CBP. Neste cenário, a mitocôndria parece ser um alvo secundário no mecanismo de morte induzido pela CBP em *Leishmania*. Em contraste com compostos que têm a mitocôndria como alvo primário^{163,165}, CBP não colapsa completamente o $\Delta\psi_m$, não é um grande indutor da produção de ROS em tempos iniciais e não induz um importante efeito de inchaço mitocondrial até 12 horas de incubação. Em harmonia com nossos resultados, foi demonstrado que o valor de concentração inibitória 50% do análogo amitriptilina, requerido para diminuição de 50% do transporte de prolina e pH intracelular, foi menor

do que aquele requerido para diminuição de 50% de ATP_c¹⁰⁷, sugerindo também uma maior intensidade de efeitos sobre a membrana plasmática do que sobre a mitocôndria de *Leishmania*.

Surpreendentemente, a perturbação inicial do $\Delta\psi_p$ e depleção de ATP_c induzida pelo fármaco CBP, foram insuficientes para afetar negativamente o transporte ativo de aminoácidos, conforme demonstrado pelo aumento do *pool* de aminoácidos intracelulares após 12 horas de incubação, incluindo aminoácidos auxotróficos (lisina, metionina, arginina). Possivelmente, outros distúrbios associados a alvos intracelulares desencadeiam uma atividade supérflua dos transportadores de membrana plasmática altamente regulados em *Leishmania*¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Do ponto de vista energético, o aumento dos níveis de malato, succinato e glutamato, sugeriram uma regulação positiva do ciclo TCA de promastigotas incubados com CBP. Um possível aumento das taxas de fluxo do ciclo TCA, pode não ser traduzido em adequada síntese de ATP, devido ao estado de desacoplamento da cadeia respiratória. Isso restringe grande parte da produção de energia de promastigotas incubados com CBP na glicólise glicossomal, um processo bioquímico, conhecidamente menos eficiente na produção de energia, quando comparado a fosforilação oxidativa mitocondrial¹⁷¹. Apesar do estado energético crítico induzido pela CBP, promastigotas incubados durante 12 horas, não restringiram processos celulares de intenso gasto energético como síntese de lipídios de membrana^{52,92}, ao contrário, mantiveram a biossíntese e o acúmulo intracelular generalizado das principais classes lipídicas encontradas na *Leishmania* como AGs, GFLs, ELs e esteróis.

A classe de lisofosfolipídios correspondeu a 88% do total de GFLs identificados em promastigotas incubados com CBP; todos estes apresentaram níveis aumentados em relação ao controle não tratado. Lisofosfolipídios são metabólitos intermediários do metabolismo de GPLs, estimados em apenas 8,5-10% do total de lipídios de membranas de promastigotas *Leishmania*^{40,44}. A manutenção de baixos níveis de lisofosfolipídios evita efeitos deletérios sobre as bicamadas lipídicas, e seu aumento normalmente ocorre em condições de estresse celular. Lisofosfolipídios possuem forma estrutural de cone invertido e provocam modificação das propriedades de

curvatura se inseridos na membrana¹⁷². A perda de condutância do canal iônico porina OmF-like de bactérias *Yersinia pseudotuberculosis* e, a indução de um estado permanente de abertura de canais MscL de *E. coli*, são claros exemplos dos efeitos de estresse de curvatura de membranas lipídicas resultante da incorporação do lisofosfatidilcolina (LPC)^{173,174}. A LPC correspondeu a principal espécie acumulada em promastigotas incubados com CBP. Imagens de microscopia eletrônica mostraram presença anormal de estruturas lipídicas no interior citoplasmático de promastigotas tratados com CBP, possivelmente, uma tentativa de segregar os lisofosfolípidios, evitando seu acúmulo e inserção direta na membrana plasmática.

O aumento de lisofosfolípidios, com concomitante diminuição de precursores, é geralmente descrito como resultado da ativação de fosfolipases em processos de estresse celular^{40,175,176}. Em contraste, o único precursor fosfatidilcolina identificado putativamente em promastigotas incubados com CBP, apresentou níveis aumentados em relação ao controle, sugerindo que o acúmulo generalizado de GFLs, tenha sido resultado do aumento da biossíntese. De fato, análogos tricíclicos da CBP, amitriptilina e imipramina, foram descritos induzir positivamente a regulação de genes relacionados a biossíntese de lipídios em células de mamíferos HepG₂¹⁷⁷.

As vias biossintéticas de AGs, GFLs e ELs de *Leishmania* são intimamente conectadas, uma vez que AGs são primariamente incorporados na formação de GFLs¹⁷⁸, e o metabolismo de ELs é especialmente responsável pelo *pool* de etanolamina¹⁷⁹. Estrategicamente, estas vias biossintéticas são co-localizadas majoritariamente no retículo endoplasmático (RE) de *Leishmania*^{178,180}, incluindo enzimas que catalisam os últimos passos da via biossintética de esteróis¹⁸¹.

Promastigotas incubados durante 4 horas com CBP apresentaram extensa hipertrofia e acúmulo de material biológico em estreitas membranas tubulares, sugerindo características de RE, assim como vacúolos com conteúdo organelar similares a autofagossomos.

O processo de estresse de RE é caracterizado pelo acúmulo de proteínas não enoveladas no lúmen e expansão do RE. Promastigotas de *Leishmania major*, sob estresse de RE induzido pelo composto tunicamicina, demonstraram rápida produção de ROS e concomitante a liberação de Ca⁺² para o citoplasma. O RE corresponde a um

dos principais armazenadores de Ca^{+2} intracelular¹⁶⁶; seu mau funcionamento resulta na capacidade reduzida de armazenar Ca^{+2} . O mecanismo pelo qual o estresse de RE produz ROS em *Leishmania* permanece desconhecido. Nestes promastigotas, o aumento de Ca^{+2} citoplasmático causou despolarização do $\Delta\psi_m$ e diminuição de ATP⁶¹. A mitocôndria possui alta capacidade de sequestrar Ca^{+2} citoplasmático, evitando que prolongado aumento dos níveis citoplasmáticos levem a morte celular do parasita. A principal força que dirige o transporte de Ca^{+2} mitocondrial é o $\Delta\psi_m$, e portanto, uma rede de movimento de carga como o influxo de Ca^{+2} , reduz o $\Delta\psi_m$ ¹⁶⁶.

Diferente de *Leishmania*, parasitas *Trypanosoma brucei* sob estresse de RE demonstraram a produção de ROS secundária aos eventos liberação de Ca^{+2} e diminuição do $\Delta\psi_m$; o aumento de Ca^{+2} mitocondrial foi sugerido como gatilho para produção de ROS¹⁸². Níveis fisiologicamente aceitáveis de Ca^{+2} mitocondrial, coordenam a regulação positiva de toda a maquinaria mitocondrial pela ativação alostérica de várias enzimas do ciclo TCA, cadeia respiratória e fosforilação oxidativa, enquanto em condições de sobrecarga de Ca^{+2} mitocondrial, engatilha a abertura do poro de transição de permeabilidade, que é associado a liberação de fatores apoptóticos ou necrose devido ao dano mitocondrial¹⁸³. Ciclobenzaprina aumentou os níveis de Ca^{+2} citoplasmático em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*, sugerindo que a liberação de Ca^{+2} de reservas intracelulares para o citoplasma possa contribuir com a toxicidade mitocondrial determinada em nossos estudos.

A presença de autofagossomos foi evidente em *Trypanosoma brucei* sob estresse de RE¹⁸². De maneira geral, a ativação da maquinaria autofágica é comumente observada em células sob estresse de RE¹⁸⁴, pois funciona como um mecanismo de segurança, quando substratos destinados para degradação, ultrapassam a capacidade do sistema de degradação associado ao RE (ERAD)⁶⁵. Em eucariotos superiores, o aumento do Ca^{+2} citoplasmático foi implicado como um dos gatilhos indutores de autofagia em condições de estresse de RE¹⁸⁵. Sob condições de estresse prolongado, a autofagia pode representar um via alternativa de morte celular^{186,187}.

Em eucariotos superiores a típica resposta ao estresse de RE desencadeada é a regulação positiva da expressão de diversos genes para manutenção da homeostase do RE (resposta UPR)⁶⁵. Em resposta ao estresse de RE, parasitas *Trypanosoma brucei*

foram capazes de montar uma resposta UPR-like, onde demonstraram alterar transcriptoma de maneira similar as mudanças observadas em outros eucariotos. As mudanças mais óbvias induzidas, além da regulação positiva de genes envolvidos com processos centrais UPR (enovelamento, degradação e translocação) foram a regulação positiva principalmente de genes relacionados ao metabolismo lipídico, transporte de membrana, funções mitocondriais, balanço redox e sinais de transdução. Todas estas alterações do transcriptoma foram acompanhadas pela dilatação do RE e elevação dos níveis da chaperona BiP, a principal proteína de resposta UPR¹⁸². Em *Leishmania*, não há relatos sobre alterações bioquímicas semelhantes e, sequer existe um consenso sobre a capacidade de regulação positiva dos níveis da chaperona BiP em resposta ao estresse de RE^{61,64}. Estudos de resposta UPR em parasitas protozoários são extremamente limitados.

Em linha com parasitas *Trypanosoma brucei* sob estresse de RE, promastigotas incubados com o fármaco CBP demonstraram um consistente acúmulo de metabolitos após o tratamento sugerindo uma possível regulação positiva do metabolismo, ou ainda uma possível diminuição do fluxo das reações enzimáticas. Entretanto, aqui, a regulação positiva induzida pelo fármaco CBP parece extrapolar os limites de recuperação da homeostasia pretendido em qualquer resposta hipotética UPR-like.

Um paralelo ao estado metabólico induzido pela CBP em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*, pode ser comparado àquele descrito em células tumorais¹⁷¹. Células tumorais, comumente desenvolvem mecanismos para promover proliferação celular e sobreviver em microambientes hostis, tais como (i) ativação da via fosfatidilinositol-3-quinase/TOR quinase e (ii) repressão da maquinaria apoptótica. Quando em condições de escassez de nutrientes, células tumorais que desenvolvem ambos os mecanismos, são impedidas de regular negativamente o metabolismo devido à ativação da via TOR quinase. Desta forma, gera-se um estado de catástrofe metabólica, marcado pela alta demanda energética sustentada pela via glicolítica, ativada como resultado da hipóxia do microambiente tumoral e acúmulo de dano mitocondrial comumente encontrado nessas células¹⁷¹.

Neste estudo, foi descrito que o fármaco CBP apresenta um mecanismo de ação leishmanicida irreversível na *Leishmania*. A partir de nossos resultados, um cenário

hipotético do mecanismo de ação da CBP pôde ser delineado, onde: (1) diminuição do $\Delta\psi_p$; no interior citoplasmático, o fármaco CBP resulta em um (2) estresse do RE com liberação de Ca^{2+} para o citoplasma e concomitante indução de desacoplamento brando da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na depleção dos níveis de ATP. Com o efeito prolongado, a liberação de Ca^{+2} parece (3) ativar autofagia e o influxo de Ca^{+2} mitocondrial potencializar efeitos mitocondriais induzindo (4) diminuição do $\Delta\psi_m$ e o (5) aumento da produção de ROS. A longo prazo, o fármaco CBP induziu uma catástrofe metabólica caracterizada pela (6) regulação positiva generalizada do metabolismo e (7) atividade desregulada de transportadores de membrana gerando alto gasto energético associado a condições insuficientes de produção de energia, e morte celular do parasita.

Nossos estudos também demonstraram um mecanismo leishmanicida desencadeado pela CBP no amastigota intracelular de *Leishmania*, estágio de vida clinicamente relevante na doença humana. Amastigotas intracelulares mantêm estado metabólico quiescente, marcado pela rigorosa repressão de processos celulares de intenso gasto energético^{52,92}. Portanto, a indução de um estado metabólico, similar àquela induzida pela CBP em formas promastigotas, poderia desencadear um processo letal no parasita residente em um vacúolo limitado em nutrientes, em que formas amastigotas se multiplicam dentro do hospedeiro mamífero.

Nossos resultados sugerem, que a origem do mecanismo leishmanicida desencadeado pelo fármaco CBP, possa ser o estresse de RE em parasitas *Leishmania*. Em linha com esta hipótese, CBP demonstrou a expansão de membranas tubulares, liberação de Ca^{+2} de reservas intracelulares, regulação positiva do metabolismo, possível ativação da maquinaria autofágica e alterações mitocondriais menos intensas comparado ao estresse RE, como sugerido pela ausência de inchaço em 12 horas de incubação. Futuros estudos utilizando marcadores específicos de RE seriam necessários para comprovar esta hipótese.

Estudos recentes têm destacado a importância do estresse de RE em tripanossomatídeos, como um novo e importante alvo para quimioterápicos^{64,182}. Ambos os estágios, extra- e intracelulares de *Leishmania*, foram descritos como altamente sensíveis ao estresse de RE, devido à falta de uma resposta eficaz que

contribua para sua homeostasia⁶⁴. Se comprovado, nossos estudos reforçariam a letalidade desta via de morte em parasitas *Leishmania*, e uma vez mais colocariam técnicas metabolômicas na vanguarda de estudos de mecanismos de ação de fármacos e descobertas de novas rotas de morte de parasitas.

5 RESULTADOS: FÁRMACO SERTRALINA

5.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* e citotóxica do fármaco SRT

A atividade contra parasitas *Leishmania (L.) infantum* e atividade citotóxica células de mamífero NCTC (clone 929) foram determinadas pelo ensaio MTT e cálculo de índice de infecção. Após 72 horas de incubação, o fármaco SRT demonstrou valores de CE_{50C} de 2,0 μM contra formas promastigotas, 3,9 μM contra formas amastigotas intracelulares, e atividade citotóxica (CC_{50}) de 19,6 μM . O fármaco padrão miltefosina foi apenas 2,4 vezes mais seletivo que o fármaco SRT, nas condições *in vitro* testadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade biológica do fármaco SRT contra parasitas *Leishmania (L.) infantum* (CE_{50}) e citotóxica (CC_{50}) em células de mamífero NCTC

Fármacos	$CE_{50}(\mu M) \pm SEM$					
	promastigotas		amastigotas		NCTC	
	CE_{50A}	CE_{50B}	CE_{50C}	CE_{50C}	CC_{50}	IS
SRT	20,8 $\pm$ 4,5	11,7 $\pm$ 2,8	2,0 $\pm$ 0,7	3,9 $\pm$ 0,3	19,6 $\pm$ 4,9	5,0
Miltefosina	nd	nd	16,7 $\pm$ 3,5	10,5 $\pm$ 3,5	125 $\pm$ 3,0	11,9

CE_{50A} determinada após 4 horas contínuas; CE_{50B} determinada após 72 horas, posterior ao contato inicial de 4 horas com SRT; CE_{50C} determinada após 72 horas contínuas na presença de SRT; CC_{50} determinada após 72 horas. nd: não determinado. Índice de seletividade: CC_{50}/CE_{50C} ama.

Em uma tentativa de indução de resistência, durante oito meses promastigotas cresceram sob pressão constante do fármaco SRT a 2 μM (CE_{50C}). Concentrações foram paulatinamente aumentadas até 5 μM , contudo a taxa de crescimento nunca se equiparou a de promastigotas não tratados, sugerindo fraca capacidade de aquisição de resistência de parasitas *Leishmania* ao fármaco SRT (dados não mostrados).

5.2 Determinação da atividade anti-*Leishmania* para desenvolvimento dos ensaios de mecanismo de ação do fármaco SRT

Para os estudos dos efeitos iniciais desencadeados pela SRT em formas promastigotas, novo valor de CE_{50A} de 20,8 μM foi estabelecido pelo ensaio MTT após 4 horas de incubação contínua em meio definido (HBSS+glicose), condições estabelecidas como padrão para os estudos de mecanismos de ação.

Alternativamente, quando uma alíquota desses promastigotas incubados com o fármaco SRT durante 4 horas foi transferida para nova microplaca contendo meio de cultura RPMI suplementado com 10% SFB, na ausência da SRT, um valor de CE_{50B} de 11,7 μM foi determinado após 72 horas de incubação (Tabela 4). Estes resultados sugeriram que o fármaco SRT desencadeou nas primeiras 4 horas de incubação, um programa de morte letal, não finalizado dentro deste intervalo de horas, como demonstrado pela incapacidade de recuperação de promastigotas pré-incubados, demonstrada pelo CE_{50B} 1,77 vezes menor que CE_{50A} , mesmo após remoção da pressão contínua do fármaco.

5.3 Variação dos níveis de ATP_c de promastigotas 3-Luc *Leishmania donovani* após incubação com fármaco SRT

O sinal de luminescência de promastigotas incubados com o fármaco SRT na CE_{50A} de 20 μM foi inibido em 50% após 1 hora de incubação (Figura 27a) e alcançou completa inibição em 4 horas (Figura 27b). O sinal de luminescência de promastigotas não tratados e tratados como solução detergente 0,1% Tx100 foram usados como medidas de níveis máximos e mínimos de luminescência, respectivamente. Esses resultados sugeriram que o fármaco SRT induziu um rápido e severo colapso bioenergético em promastigotas *Leishmania*.

Figura 27 - Variação dos níveis de ATP_c de promastigotas 3-Luc incubados com SRT. (a) Redução da luminescência acompanhada até 1 hora na presença de SRT. (b) Redução da luminescência após 4 horas de incubação. Legenda: não tratados (Δ); SRT 10 μM (▼); SRT 20 μM (○); SRT 50 μM (●); 0,1% Tx-100 (■). Dados foram normalizados em relação aos controles; ($p < 0.0001$ ***).

5.4 Avaliação das alterações da membrana plasmática de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* induzidas pelo fármaco SRT

O efeito de permeabilização de membrana plasmática em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com o fármaco SRT foi determinado pela fluorescência da sonda Sytox® Green. Sertralina induziu aumento significativo de 36% de fluorescência da sonda Sytox® Green, apenas em promastigotas incubados em altas concentrações como 50 μM (CE_{70A}) e após 4 horas de incubação. Como nenhuma fluorescência Sytox® Green significativa foi medida na CE_{50A} de 20 μM (Figura 28a), concentração cuja diminuição do ATP_c foi visível após 15 minutos da adição da SRT, o $\Delta\psi_p$ foi determinado pela fluorescência bisoxonol. Nesta concentração, o fármaco SRT causou uma modesta e transitória despolarização do $\Delta\psi_p$, enquanto a CE_{70A} de 50 μM produziu uma completa despolarização do $\Delta\psi_p$, equivalente àquela produzida pelo peptídeo membrana ativo indolicidina (10 μM) (Figura 28b).

Em conjunto, estes resultados sugeriram que efeitos de permeabilização e de despolarização de membrana plasmática têm pouca contribuição no colapso energético induzido pela SRT em tempos iniciais de incubação.

Figura 28 - Avaliação da permeabilidade (a, Sytox® Green) e do $\Delta\psi_p$ (b, bisoxonol) de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* na presença do fármaco SRT. As porcentagens de fluorescência são relativas a fluorescência máxima adquirida pelo tratamento com 0,1% de Tx100 (a) ou 10 μM de indolicidina (b). Legenda SRT: 0 μM (Δ); 10 μM (▼); 20 μM (○); 50 μM (●); ($p < 0.0001$ ***).

5.5 Avaliação do potencial de $\Delta\psi_m$ de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com fármaco SRT

A variação do $\Delta\psi_m$ de promastigotas incubados durante 4 horas com o fármaco SRT foi avaliada por citometria de fluxo por meio da intensidade de fluorescência Rd123, enquanto alterações morfológicas foram acompanhadas pela fluorescência da sonda mitocondrial Mitotracker® Red; as intensidades de fluorescência de ambas as sondas são dependentes do $\Delta\psi_m$.

Sertralina diminuiu significativamente a intensidade de fluorescência Rd123 em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* comparado aos níveis de fluorescência medidos em promastigotas não tratados. Promastigotas incubados com 10, 20 e 50 μM mostraram porcentagens de fluorescência de $49,4 \pm 16,3$; $0,4 \pm 0,2$ e $0,0 \pm 0,1\%$ ($Rd123 \pm SD$; $p < 0.05$), respectivamente, enquanto a incubação com 10 mM KCN

mostrou níveis de fluorescência de $24,8 \pm 0,1\%$ ($p < 0.05$) (Figura 29). Parasitas severamente danificados foram excluídos do estudo quando marcados com PI.

Figura 29 - Avaliação do $\Delta\psi_m$ em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT durante 4 horas. Porcentagem de fluorescência relativa a máxima intensidade de fluorescência Rd123 de promastigotas não tratados. Promastigotas despolarizados foram obtidos pelo tratamento com KCN 10 mM.

Em um estudo alternativo realizado por microscopia confocal, promastigotas corados com a sonda Mitotracker® Red ($0,1 \mu\text{M}$) e em seguida incubados com o fármaco SRT durante 4 horas demonstraram um padrão fragmentado de fluorescência comparado ao padrão visualizado em promastigotas não tratados (Figura 30).

Em conjunto, estes resultados sugeriram que o fármaco SRT altera o $\Delta\psi_m$ (fluorescência Rd123) e promove alterações morfológicas (fluorescência Mitotracker® Red) na mitocôndria de parasitas *Leishmania*.

Figura 30 - Microscopia confocal da fluorescência da sonda Mitotracker® Red em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT. (a) promastigotas marcados não tratados. (b) Promastigotas marcados incubados com SRT 20 μM durante 4 horas. Mitocôndria e núcleo foram corados com Mitotracker® Red (0,1 μM) e DAPI (5 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Barra = 5 μm . Objetiva de imersão (100X).

5.6 Taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com fármaco SRT

Em promastigotas vivos, a adição de 50 μM da SRT aumentou a taxa de consumo de oxigênio de 15,94 $\text{nmol} \cdot (\text{min}^{-1} \times 10^8 \text{células})$ para 18,39 $\text{nmol} \cdot (\text{min}^{-1} \times 10^8 \text{células})$ após 2,5 minutos (dados não mostrados). Este efeito foi confirmado em promastigotas permeabilizados com digitonina (60 μM), como descrito a seguir. Após permeabilização, a integridade da membrana mitocondrial interna sob estudo foi demonstrada pelo aumento da taxa de respiração após adição de ADP (100 μM). A inibição da taxa de respiração da cadeia respiratória inibida ao nível do complexo V – ATPase pela adição de oligomicina (12,5 μM) foi restaurada com um aumento de 12% pela adição de 50 μM do fármaco SRT, sugerindo que o mesmo atue como um desacoplador mitocondrial (Figura 31a), embora menos potente que o clássico desacoplador mitocondrial FCCP que produziu um aumento de 90% na taxa de respiração, sob mesmas condições (Figura 31b).

A adição da SRT a 20 μM ($\text{CE}_{50\text{A}}$) aumentou em 6% a taxa de respiração sob mesmas condições (dado não mostrado). A figura 32 ilustra complexos, substratos e inibidores específicos da cadeia respiratória mitocondrial, assim como o local de ação do fármaco SRT.

Figura 31 - Avaliação das taxas de consumo de oxigênio de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* permeabilizados com digitonina. (a) Efeito do fármaco SRT. (b) Efeito do desacoplador mitocondrial FCCP. Concentrações empregadas: 60 μM digitonina; 100 μM ADP; 12,6 μM oligomicina; 3,3 μM FCCP; 50 μM SRT. Setas indicam adição dos respectivos reagentes.

Figura 32 - Sítio de ação do fármaco SRT na cadeia respiratória em parasitas *Leishmania*. A extrusão de prótons foi indicada por setas cinza. O efeito desacoplador foi indicado pela seta preta mais espessa. Legenda: α -GP, α -glicerofosfato; FAD-GPDH, flavina adenina dinucleotídeo dependente glicerofosfato desidrogenase; UQ, ubiquinona Q; Cyt C, citocromo c; TMPD, N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato. Locais de alimentação de elétrons ou inibição foram indicados por linhas sólidas ou pontilhadas, respectivamente. Figura adaptada Carvalho et al¹⁶⁵

5.7 Produção de ROS mitocondrial em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT

A produção do radical ROS mitocondrial foi determinada pelo aumento da fluorescência da sonda MitoSOX™ Red. Durante os 30 minutos iniciais de incubação, a SRT produziu um aumento significativo de 45% e 100% nos níveis de produção de ROS nas concentrações de 20 e 50 μ M, respectivamente. Após 4 horas de incubação, a produção de ROS na concentração de 20 μ M foi similar àquela produzida pelo controle positivo antimicina A (0,3 μ g/mL), enquanto a diminuição de fluorescência observada na maior concentração testada da SRT (50 μ M) foi provavelmente decorrente do processo de morte celular (Figura 33).

Figura 33 - Avaliação da produção de ROS mitocondrial em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com SRT. Antimicina A (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo. Níveis de fluorescência foram normalizados em relação aos controles ($p < 0.001^{**}$; $p < 0.0001^{***}$)

5.8 Microscopia eletrônica (TEM) de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* incubados com o fármaco SRT

As características morfológicas mais relevantes de promastigotas, incubados com o fármaco SRT na CE_{50A} de 20 µM durante 4 horas em meio definido HBSS+glicose (Figura 34b), foram uma intensa vacuolização citoplasmática, presença de vacúolos com conteúdo organelar, acidocalcissomas com baixa definição de membrana e condensação de DNA dentro do núcleo. A morfologia mitocondrial foi alterada, demonstrando padrão vesicular circular quando comparada a promastigotas não tratados, confirmando o padrão fragmentado de fluorescência Mitotracker® Red, previamente detectado por microscopia confocal (Figura 30). Alterações de membrana plasmática não foram detectadas corroborando os resultados prévios obtidos pela sonda Sytox® Green.

Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas incubados com SRT. (a) Promastigotas não tratados. (b) Promastigotas tratados com na CE_{50A} de 20 μM durante 4 horas em meio definido HBSS+glicose. Legenda: m, mitocôndria; n, núcleo; k, cinetoplasto. Setas indicam vacúolos multivesiculares. Barra = 1 μm .

5.9 Estudo metabolômico das alterações bioquímicas induzidas pelo fármaco SRT em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*: validação, seleção e confirmação de metabólitos alterados.

Para o desenvolvimento dos estudos metabolômicos não dirigidos, um novo valor de CE_{50} de $24,5 \pm 4,8 \mu\text{M}$ foi determinado pelo ensaio MTT, uma vez que nesses ensaios o meio definido HBSS+glicose foi substituído pelo meio completo RPMI, a fim de evitar o rápido esgotamento nutricional. Assim, promastigotas *Leishmania (L.) infantum* foram incubados durante 12 horas com 35 μM da SRT ($\sim CE_{70}$) em meio completo RPMI, a 26 °C. A escolha deste valor foi uma tentativa de assegurar um dano significativo ao parasita, abrangendo modificações metabólicas a longo prazo, enquanto mantém relativa viabilidade dos parasitas, excluindo artefatos produzidos em concentrações maiores como a CE_{90} .

A aquisição e processamento dos dados metabolômicos procederam como descrito em materiais e métodos, com exceção de que plataforma CG-EM não aplicada nesse estudo devido a problemas técnicos.

A projeção das matrizes de dados filtradas (presença $\geq 50\%$ e %DPR $< 30\%$ das amostras CQs) a partir de análise multivariada não supervisionada PCA demonstrou o agrupamento das amostras CQs evidenciando a estabilidade e reprodutibilidade dos métodos e instrumentação EC-EM e CLAE-EM modos positivo e negativo (Figura 35).

Figura 35 – Validação analítica por modelos não supervisionados PCA. Modelos foram construídos a partir da matriz de dados filtros (presença $\geq 50\%$ e %DPR $< 30\%$ nas amostras CQs). Componente 1 vs componente 2 estão representadas. R^2 = coeficiente de variação explicada; Q^2 = coeficiente de predição. CQ: amostras de controle de qualidade

Matrizes foram novamente filtradas e *features* que não obedeceram ao critério de presença em pelo menos 66,66% das amostras de um grupo (SRT tratado ou não tratado), foram descartados e *missing values* remanescentes foram tratados como descrito em materiais e métodos. Em seguida, modelos supervisionados PLS-DA foram construídos para as diferentes técnicas demonstrando para todas as análises altos valores R^2 e Q^2 (Figura 36).

A identidade das amostras dentro de um grupo específico (SRT tratado ou não tratado) foi validada utilizando a abordagem de validação cruzada (exclusão e predição de 1/3 das amostras do grupo) (Figura 36). Amostras excluídas foram corretamente preditas em 100% das análises, validando os modelos e, garantindo suporte estatístico para as diferenças metabólicas induzidas pelo tratamento com fármaco SRT em comparação as amostras não tratadas.

Figura 36 - Modelos PLS-DA construídos para controles não tratados vs tratados. R^2 = coeficiente de variação explicada; Q^2 = coeficiente de predição.

A discriminação dos metabólitos estatisticamente significativos foi realizada a partir de análises multivariadas usando modelos OPLS-DA, intervalos de confiança *jackknife* e gráficos VIP (modelos não mostrados). Assim como análises univariadas

utilizando teste Mann-Whitney U (não-paramétrico) para determinação do valor de significância $p < 0.05$.

A confirmação dos metabólitos foi conduzida como descrito no item 3.17.11, onde as identidades metabólicas foram determinadas por meio da massa exata, auxílio de banco de dados, adição de padrões comerciais às amostras para a técnica de EC-EM (APÊNDICE A), e análises de CLAE-EM/EM (APÊNDICE B).

5.10 Resultados multiplataforma das alterações metabólicas induzidas pelo fármaco SRT

Um total de 11.447 *features* foram detectados e alinhados. Após tratamento dos dados empregando filtrações e análises estatísticas, um total de 585 *features* cumpriram o critério estatístico de seleção (p valor < 0.05) e 111 foram identificados e confirmados como metabólitos. A tabela 5 resume o número de *features* obtidos em cada passo do estudo.

Tabela 5 - *Features* detectados e identificados após alterações do metabolismo de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* induzidas pelo fármaco SRT ao longo dos diferentes passos da seleção estatística

Técnica analítica	Após alinhamento	Após filtração	Significância estatística	Identificados/confirmados
EC-EM	1128	130	38	25
CLAE-EM(+)	7276	543	210	44
CLAE-EM(-)	3043	478	337	42
Total	11.447	1.151	585	111

As técnicas empregadas foram altamente complementares quanto a natureza bioquímica dos metabólitos identificados. Dos 111 metabólitos totais identificados, 22 foram identificados por mais de uma técnica analítica (Figura 37), resultando em um total de 88 diferentes metabólitos, descritos na Tabela 6 como resultado final multiplataforma e, utilizados na interpretação biológica dos efeitos produzidas pela SRT sobre parasitas *Leishmania*.

Figura 37 - Diagrama de Venn construído a partir dos 111 metabólitos totais identificados ilustrando a complementariedade das técnicas analíticas EC-EM e CLAE-EM, modos positivo e negativo nos estudos das alterações bioquímicas induzidas pelo fármaco SRT em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*.

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Fórmula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Aminas										
1	colina ^{padrão}	C5H13NO	103.0997	2.8	1451.4	0.002	7.2	3.7	confirmado	EC-EM
2	fosfocolina ^{metlin}	C5H14NO4P	183.0660	-3.5	-74.9	0.002	5.5	0.6	60.0814/86.0945/124.9996/184.0726	CLAE-EM(+)
3	putrescina ^{padrão}	C4H12N2	88.1000	4.6	-64.0	0.002	3.0	0.9	confirmado	EC-EM
Aminoácidos e peptídeos (AAs)										
4	glutathiona (GSH) ^{padrão}	C10H17N3O6S	307.0838	-1.0	10168.1	0.002	24.7	1	confirmado	EC-EM
5	glutathiona dissulfeto (GSSG) ^{padrão}	C20H32N6O12S2	612.1520	1.7	108.6	0.002	8.5	0.9	confirmado	EC-EM
6	lisina ^{padrão}	C6H14N2O2	146.1055	0.7	57.4	0.002	4.9	1.1	confirmado	EC-EM
7	histidina ^{padrão}	C6H9N3O2	155.0695	0.0	35.1	0.002	5.9	0.4	confirmado	EC-EM
8	prolina ^{padrão}	C5H9NO2	115.0633	2.6	-99.7	0.002	3.2	4.9	confirmado	EC-EM
9	asparagina ^{padrão}	C4H8N2O3	132.0535	5.3	-82.9	0.002	4.7	1.4	confirmado	EC-EM
10	arginina ^{padrão}	C6H14N4O2	174.1117	0.6	-76.9	0.002	2.5	2.7	confirmado	EC-EM
11	alanina/sarcosina/ β -alanina	C3H7NO2	89.0477	5.6	-71.3	0.002	5.1	3.7	Putativo 79%	EC-EM
12	glutamato ^{padrão}	C5H9NO4	147.0532	2.0	-64.5	0.002	3.1	2.4	confirmado	EC-EM
13	aspartato ^{padrão}	C4H7NO4	133.0375	0.0	-63.7	0.002	2.5	1	confirmado	EC-EM
14	leucina/isoleucina ^{padrão}	C6H13NO2	131.0946	0.7	-61.5	0.002	5.1	3.6	confirmado	EC-EM
15	valina ^{padrão}	C5H11NO2	117.0790	0.0	-61.2	0.002	4.2	1.8	confirmado	EC-EM

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Aminoácidos e peptídeos (AAs)										
16	serina ^{padrão}	C3H7NO3	105.0426	4.7	-59.9	0.002	4.3	1.5	confirmado	EC-EM
17	Tripanotiona dissulfeto ^{padrão}	C27H47N9O10S2	721.2887	0.3	-55.3	0.065	9.0	0.7	confirmado	EC-EM
18	cistationina ^{padrão}	C7H14N2O4S	222.0674	-8.5	-50.5	0.002	4.3	1.1	confirmado	EC-EM
19	metionina ^{padrão}	C5H11NO2S	149.0510	0.7	-48.4	0.002	7.0	0.9	confirmado	EC-EM
20	tirosina ^{padrão}	C9H11NO3	181.0739	-0.6	-29.7	0.002	7.4	0.5	confirmado	EC-EM
Carboidratos (Carbs)										
21	manitol ^{metlin}	C6H14O6	182.0790	-6.0	150.4	0.002	5.4	0.7	43.0165/59.0136/71.0154/89.0269/101.0222/181.0701	CLAE-EM(-)
22	dissacarídeo-fosfato ^{metlin}	C12H23O14P	422.0825	-2.1	106.6	0.002	6.7	0.6	78.9573/96.9662/241.0121/421.0892	CLAE-EM(-)
23	monossacarídeo C6 glicerol-fosfato ^{metlin}	C9H19O11P	334.0665	-0.9	73.0	0.002	7.0	0.4	78.9574/92.9240/94.9256/96.9194/152.9942/241.0136/333.0598	CLAE-EM(-)
24	Sedoheptulose 7-fosfato/ glicero-mano-heptose 7-fosfato	C7H15O10P	290.0403	-3.1	-77.4	0.009	6.7	0.6	Putative 85%	CLAE-EM(-)
25	hexose-fosfato ^{metlin}	C6H13O9P	260.0297	-3.1	-39.4	0.009	10.5	0.5	78.9583/96.9689/138.9969/198.9521/259.0703	CLAE-EM(-)

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Ácidos Graxos (AGs)										
26	Octadecenal/Octadecen-11-one/ octadecadien-1-ol	C18H34O	266.2610	-5.5	830.7	0.002	27.6	0.5	Putativo 72%	CLAE-EM(+)
27	Ácido aracdônico ^{lipidmaps}	C20H32O2	304.2402	-4.6	169.9	0.002	6.2	0.8	41.9964/59.0109/112.9954/205.1859/259.2409/285.2442/ <u>303.2336</u>	CLAE-EM(-)
28	Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	C16H32O2	256.2402	-1.2	115.2	0.009	7.7	3.4	<u>255.231</u>	CLAE-EM(-)
29	Ácido mirístico 12-metil (C14:0 CH3)	C15H30O2	242.2246	-7.4	39.5	0.041	6.3	0.4	223.2077/ <u>241.214</u>	CLAE-EM(-)
30	Ácido α -linolênico ^{metlin}	C18H30O2	278.2246	-1.1	-72.0	0.002	5.5	4.7	59.0132/259.2047/277.2163	CLAE-EM(-)
31	Ácido estearidônico ^{metlin}	C18H28O2	276.2089	-4.7	-67.3	0.002	7.4	0.8	59.0023/231.1190/257.1843/ <u>275.1972</u>	CLAE-EM(-)
32	Ácido linoleico ^{metlin}	C18H32O2	280.2402	-1.1	-51.2	0.002	6.2	3.2	<u>59.0111</u> /71.0119/279.2314*	CLAE-EM(-)
33	Ácido eicosatrienóico (ETA)	C20H34O2	306.2559	-5.2	-49.0	0.002	7.8	0.6	59.3451/83.0456/287.2246/ <u>305.2515</u>	CLAE-EM(-)
34	(Ácido 4,7,10,13,16,19, docosaheptaenóico ^{metlin}	C22H32O2	328.2402	-0.9	-24.4	0.015	5.2	1.4	59.0131/67.0533/83.0537/93.0627/107.0826/121.0931/135.1151/149.1313/161.1340/175.1448/229.2013/355.2049/283.2364/327.1769	CLAE-EM(-)
35	Ácido oleico ^{metlin}	C18H34O2	282.2559	-3.9	-16.7	0.026	6.2	0.7	<u>281.2478</u>	CLAE-EM(-)

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Ácidos Graxos (AGs)										
36	Ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenóico ^{metlin}	C22H34O2	330.2559	-2.1	-16.0	0.041	4.6	0.6	Putativo 94%	CLAE-EM(-)
Glicerolipídios (GLs)										
37	PA(10:0/10:0)	C23H45O8P	480.2852	1.8	897.4	0.002	20.3	0.4	Putativo 86%	CLAE-EM(+)
38	MG(18:1/0:0/0:0)	C21H40O4	356.2927	-6.1	377.9	0.009	24.5	0.3	Putativo 61%	CLAE-EM(+)
39	PA(18:4/13:0)	C34H59O8P	626.3948	4.9	-58.8	0.002	11.8	0.4	Putativo 70%	CLAE-EM(-)
40	PA(P-16:0/20:5)	C39H67O7P	678.4625	-4.9	-40.7	0.004	6.9	0.3	Putativo 71%	CLAE-EM(-)
Glicerofosfolipídios (GFLs)										
41	LPS(O-18:0)	C24H50NO8P	511.3274	-3.7	1790.1	0.002	8.2	0.5	Putativo 71%	CLAE-EM(-)
42	LPI(O-16:0)	C25H51O11P	558.3169	-3.8	1768.8	0.002	10.1	0.8	78.9564/241.0099/ <u>377.2430</u> /557.3109	CLAE-EM(-)
43	LPE(P-16:0)	C21H44NO6P	437.2906	-3.7	608.8	0.002	13.5	2	78.9586/140.0107/ <u>196.0373</u> /239.2359/375.2270/436.2809	CLAE-EM(-)
44	LPC(18:0)/LPE(21:0)	C26H54NO7P	523.3638	-4.7	165.7	0.002	7.9	0.6	Putativo 87%	CLAE-EM(+)
45	LPC(16:0)/LPE(19:0)	C24H50NO7P	495.3325	-6.2	88.9	0.002	14.9	0.6	Putativo 93%	CLAE-EM(+)

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolipídios (GFLs)										
46	LPE-Cer(d14:2/16:0)	C32H63N2O6P	602.4424	7.5	56.2	0.009	7.6	0.5	Putativo 76%	CLAE-EM(-)
47	LPE(18:1)	C23H46NO7P	479.3012	-1.7	-84.1	0.002	13.1	3.5	78.9609/140.0097/196.0366/214.0465/281.2476/478.2949	CLAE-EM(-)
48	LPS(22:2)	C28H52NO9P	577.3380	-4.8	-83.4	0.002	23.0	0.9	Putativo 80%	CLAE-EM(-)
49	LPS(20:3)	C26H46NO9P	547.2910	-7.9	-82.2	0.002	11.3	0.8	Putativo 72%	CLAE-EM(-)
50	LPC(18:3) ^{padrão}	C26H48NO7P	517.3168	4.0	-81.6	0.002	18.0	6.2	60.0813/86.0964/104.1072/124.9993/166.0617/184.0729/258.1081/500.3111/518.3229	CLAE-EM(+)
51	LPC(18:4)	C26H46NO7P	515.3012	0.6	-81.0	0.002	16.0	1.7	Putativo 98%	CLAE-EM(+)
52	LPC (17:3)	C25H46NO7P	503.3012	0.0	-80.6	0.002	18.7	0.6	60.0825/86.0951/104.1071/184.0716/258.1044/486.2999	CLAE-EM(+)
53	LPC(19:3)	C27H50NO7P	531.3325	-5.9	-78.0	0.002	16.5	0.5	60.0793/86.0975/104.1063/124.9928/166.0549/184.0713/514.3202/532.3392	CLAE-EM(+)
54	LPE(18:2) ^{padrão}	C23H44NO7P	477.2856	2.8	-73.2	0.002	12.6	2.3	62.0611/81.0694/95.0849/216.0532/263.02348/306.2734/337.2719/478.3040	CLAE-EM(+)

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolípidios (GFLs)										
55	LPC(20:3)	C28H52NO7P	545.3481	-5.4	-73.0	0.002	17.6	2.3	Putativo 85%	CLAE-EM(+)
56	LPE(18:3)	C23H42NO7P	475.2699	-2.1	-72.2	0.002	13.7	2.5	Putativo 95%	CLAE-EM(-)
57	LPS(20:5)	C26H42NO9P	543.2597	-8.8	-70.9	0.002	11.9	0.5	Putativo 71%	CLAE-EM(-)
58	Glicerofosfocolina	C8H20NO6P	257.1028	-0.4	-69.0	0.002	15.2	1.5	Putativo 94%	EC-EM
59	LPC(18:2)	C26H50NO7P	519.3325	3.8	-68.3	0.002	18.7	4	Putativo 94%	CLAE-EM(+)
60	LPC/LPE	C44H74NO8P	775.5152	2.8	-67.8	0.002	16.4	1	Putativo 73%	CLAE-EM(+)
61	LPS(22:1)	C28H54NO9P	579.3536	-4.7	-66.3	0.002	21.5	0.7	Putativo 68%	CLAE-EM(-)
62	LPC(20:2)	C28H54NO7P	547.3638	0.8	-66.0	0.002	19.3	1.4	Putativo 91%	CLAE-EM(+)
63	LPC(20:4)	C28H50NO7P	543.3325	0.3	-61.7	0.002	17.5	0.9	Putativo 88%	CLAE-EM(+)
64	LPS(20:1)	C26H50NO9P	551.3223	-3.6	-58.7	0.002	25.8	0.6	Putativo 75%	CLAE-EM(-)
65	LPE(22:5) ^{padrão}	C27H46NO7P	527.3012	-5.3	-58.3	0.002	8.9	0.3	62.0579/81.0677/95.0851/119.0852/133.0908/173.0171/229.1859/320.2473/387.2840/528.3361	CLAE-EM(+)

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Glicerofosfolípidios (GFLs)										
66	LPC(16:1)	C24H48NO7P	493.3168	0.1	-57.5	0.002	20.0	0.7	86.0991/104.1068/184.0716/258.1059/476.3124/494.3225	CLAE-EM(+)
67	LPE(22:6)	C27H44NO7P	525.2855	-3.6	-56.0	0.002	7.2	0.6	Putativo 90%	CLAE-EM(-)
68	LPC(20:1)	C28H56NO7P	549.3794	-6.7	-55.9	0.002	2.5	0.6	Putativo 88%	CLAE-EM(+)
69	LPC(22:4)	C30H54NO7P	571.3638	1.1	-52.2	0.002	13.9	0.5	86.0970/104.1063/124.9961/164.9296/184.0713/554.3669/572.3674	CLAE-EM(+)
70	LPC(14:0)	C22H46NO7P	467.3012	-5.1	-49.2	0.004	15.0	0.8	Putativo 88%	CLAE-EM(+)
71	LPC(17:1) padrão	C25H50NO7P	507.3325	-6.5	-49.0	0.002	20.0	0.3	86.0936/104.1074/124.9962/184.0713/490.3160/508.3363	CLAE-EM(+)
72	LPC(18:1) padrão	C26H52NO7P	521.3481	-3.9	-47.1	0.002	15.7	1.4	86.0971/104.1069/184.0724/258.1089/339.2824/445.2663/504.3114/522.3506	CLAE-EM(+)
73	LPC(22:6)	C30H50NO7P	567.3325	4.2	-44.9	0.002	14.7	3.6	Putativo 98%	CLAE-EM(+)
74	LPC(22:5)	C30H52NO7P	569.3481	-2.9	-44.8	0.002	12.9	2.3	Putativo 91%	CLAE-EM(+)
Esfingolipídios (ELs)										
75	C18 esfingalina 1-fosfato (C18:0)	C18H40NO5P	381.2644	-3.9	PT	0.002	15.5	0.9	78.9580/380.2500	CLAE-EM(-)
76	C16 esfingalina 1-fosfato (C16:0)	C16H36NO5P	353.2331	-4.5	2466.4	0.002	11.5	1.4	78.9577/352.2214	CLAE-EM(-)

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Esfingolipídios (ELs)										
77	esfingosina (C18:1)	C18H37NO2	299.2824	-8.7	417.2	0.002	12.0	0.4	56.0481/69.0672/83.0872/95.0843/121.0978/252.2596/264.2548/ <u>282.2811</u> /300.28	CLAE-EM(+)
78	esfinganina ^{metlin}	C18H39NO2	301.2981	-5.0	363.1	0.002	10.9	1.9	Putativo 94%	CLAE-EM(+)
79	C16 esfinganina (C16:0)	C16H35NO2	273.2668	-0.3	163.8	0.002	14.8	1.8	Putativo 98%	CLAE-EM(+)
80	C17 esfinganina ^{lipidmaps}	C17H37NO2	287.2824	-4.6	-72.8	0.002	12.5	0.5	57.0721/88.0751/106.0860/288.2874	CLAE-EM(+)
Purinas/pirimidinas										
81	S-Adenosil-L-metionina	C15H22N6O5S	398.1372	4.7	103.4	0.002	3.1	0.4	Putativo 70%	EC-EM
82	Hipoxantina ^{padrão}	C5H4N4O	136.0385	0.0	-11.7	0.041	4.9	0.3	confirmado	EC-EM
Outros										
83	Pipecolato ^{padrão}	C6H11NO2	129.0790	-0.8	543.7	0.002	7.6	1.2	confirmado	EC-EM
84	Aminoimidazol ribotide	C8H14N3O7P	295.0569	1.9	-99.3	0.002	17.7	0.8	Putativo 70%	CLAE-EM(+)
85	Imidazol lactato ^{padrão}	C6H8N2O3	156.0535	1.9	-90.4	0.002	4.3	1	confirmado	EC-EM
86	Succinato	C4H6O4	118.0266	0.8	-82.4	0.002	16.5	1.1	confirmado	EC-EM

continua

Tabela 6 - Lista de metabólitos identificados com significância estatística e tendência de variação em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação de 12 horas com o fármaco SRT

#	Nome	Formula	MM (Da)	Erro (ppm)	% Variação	p valor	%DPR CQs	VIP	Confirmação (perfil de fragmentação EM em tandem; ou injeção de padrão; ou % probabilidade)	Técnica
Outros										
87	17β-Hidroxiesteróide Androstan-3alfa,17beta-diol	C19H32O2	292.2402	-6.2	-71.5	0.002	10.9	0.5	Putativo 82%	CLAE-EM(-)
88	Fenilactato ^{metlin}	C9H10O3	166.0629	-4.2	PNT	0.002	7.9	0.8	72.9910/91.0491/103.053 7/119.0465/ <u>147.0411</u> /165.0578	CLAE-EM(-)

conclusão

número do metabólito assignado na figura 38 *Heatmap*; ^{sobrescrito} refere-se à confirmação por meio de padrão comercial ou base de dados (Metlin, Lipidmaps, NIST); erro, % Variação e %DPR foram calculados como descrito no item 3.18.9.2; PT: identificado apenas nos promastigotas tratados; PNT: identificado apenas em promastigotas não tratados. Perfil de fragmentação EM em tandem: fragmento sublinhado corresponde ao mais abundante; *fragmento precursor; MG, monoglicerídeos; PA, ácido fosfatídico; LPE, lisofosfatidiletanolamina; LPC, lisofosfatidilcolina, LPI, lisofosfatidilinositol, LPS, lisofosfatidilserina; nomenclatura: exemplo, LPC (nº de carbonos na cadeia FAs: grau de insaturação), LPC(16:1) PT: presente apenas nos promastigotas tratados;.

5.11 Interpretação biológica dos resultados multiplataforma do estudo metabolômico do fármaco SRT

Os 88 diferentes metabólitos alterados pelo fármaco SRT em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*, foram apresentados em forma de *heatmap* (Figura 38), para visualização de tendência de variação dos metabólitos dentro de suas respectivas classes bioquímicas (Figura 39). O metabolismo de lipídios sofreu a maior variação contando com 62,3% de todas as alterações identificadas, com destaque para a diminuição de lisofosfolipídios (inseridos em GFLs) e aumento de esfingolipídios (ELs). Variações na natureza dos ácidos graxos (AGs) não seguiram uma tendência comum e variaram de acordo com a espécie lipídica identificada. Ainda, aminoácidos (AAs) foram genericamente diminuídos e corresponderam a segunda classe bioquímica mais afetada após incubação com o fármaco SRT.

Figura 38 - *Heatmap* dos 88 metabólitos com variação significativa após incubação de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* com fármaco SRT. A escala de cinza representa o nível das variações: aumento para cores mais escuras e diminuição para cores mais claras. Os números de identificação dos metabólitos na lateral direita são respectivos a tabela 6, enquanto as classes bioquímicas foram nomeadas na lateral esquerda.

Figura 39 - Percentual das alterações metabólicas induzidas pelo fármaco SRT por classe bioquímica.

Após alocação dos 88 metabólitos em suas respectivas vias metabólicas, efeitos importantes provocados pela SRT foram revelados nas seguintes vias: i) ciclo TCA e seus precursores intermediários (Figura 40); ii) via glicolítica e via das pentoses fosfato (Figura 41); iii) biossíntese de poliaminas e tripanotona (Figura 42); iv) e metabolismo de ácidos graxos e esfingolipídios (Figura 43).

Figura 41 - Alterações da via glicolítica e da via das pentoses fosfato de promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. Metabólitos com ponto de interrogação foram arbitrariamente assignados de acordo com sua massa exata (putativos). Metabólitos com níveis diminuídos após incubação foram coloridos em cinza. Legenda: G6P, glucose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; R5P, ribose-5-fosfato; E4P, eritrose-4-fosfato; X5P, xilulose-5-fosfato; GAP, gliceraldeído-3-fosfato; DHAP, diidroxiacetona fosfato. Figura adaptada de Oppendoes; Szikora¹⁸⁸

Figura 42 - Biossíntese de poliaminas e metabolismo redox tiol alterados em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. Metabólitos com ponto de interrogação foram arbitrariamente assignados de acordo com a massa exata. Legenda: Adomet, S-adenosilmetionina; dcAdomet, S-adenosilmetionina descarboxilase; F6P, frutose-6-fosfato; G6P, glucose-6-fosfato; GSH, glutathione reduzida; GSSG, glutathione oxidada; S7P, sedoheptulose 7 fosfato; T(SH)₂, tripanotona reduzida; T(S)₂, tripanotona oxidada. Metabólitos com níveis diminuídos após o tratamento foram coloridos em cinza, enquanto aqueles que tiveram níveis aumentados foram enquadrados em retângulos cinzas. Figura adaptada de Fairlamb; Cerami.⁷⁶

Figura 43 - Metabolismo lipídico alterado em promastigotas *Leishmania (L.) infantum* após incubação com SRT. (a) Elongação de ácidos graxos. Legenda: Elo, elongase. (b) ácidos graxos poliinsaturados, $x\Delta^y$, onde $x\Delta$ indica o número de insaturações e y a posição da dupla ligação na cadeia hidrocarbônica. Legenda: DPA, ácido docosapentanóico; DHA, ácido docosahexaenóico; EPA, ácido eicosapentaenoico. (c) metabolismo de esfingolipídios. Metabólitos com níveis diminuídos após o tratamento foram coloridos em cinza, enquanto aqueles que tiveram níveis aumentados foram enquadrados em retângulos cinzas. Adaptado de Ramakrishnan et al.¹⁸⁹ e Livore et al.¹⁹⁰.

A figura 44 resume o cenário hipotético descrito a partir dos nossos resultados para a atividade leishmanicida da SRT em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*. Resumidamente, SRT induz um rápido efeito de desacoplamento da cadeia respiratória, aumentando a produção de ROS e diminuindo a síntese de ATP. Em tempos mais longos de incubação, a diminuição da síntese de poliaminas e tripanotona, assim como a ausência de adaptação do metabolismo glicolítico para a via das pentoses fosfato levam a um estresse oxidativo severo, que ao final, induz um

desarranjo metabólico geral com destaque para a escassez de metabólitos envolvidos com na produção de ATP e alimentação do ciclo TCA agravando o colapso bioenergético inicial.

Figura 44 - Compilação dos efeitos multi-alvo da SRT em parasitas *Leishmania*. Sertralina atravessa membrana plasmática causando (1) ligeira despolarização do $\Delta\psi_p$ onde se acumula na mitocôndria produzindo (2) desacoplamento da cadeia respiratória, (3) inibição da síntese de ATP, (4) aumento fluxo de elétrons com produção de ROS, e (5) despolarização do $\Delta\psi_m$. A tempos mais longos de incubação, o aumento do estresse oxidativo é amplificado pela (6) diminuição da capacidade do metabolismo tiol-redox, produzindo um desarranjo metabólico generalizado marcado pela severa (7) depleção do *pool* intracelular de aminoácidos e (8) deterioração do metabolismo energético. Flechas sólidas em preto representam aumento, enquanto flechas tracejadas representam diminuição do parâmetro correspondente.

5.12 Discussão

Reposicionamento de fármacos é uma alternativa atraente para lidar com o aumento da resistência dos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, uma estratégia de custo moderado e relativamente rápida na implantação¹⁹¹. Para esse objetivo, antidepressivos têm mostrado resultados promissores devido à atividade anti-*Leishmania*, entre eles, cetanserina¹⁹², mianserina¹⁰⁸, amitriptilina¹⁰⁴, clomipramina¹⁰⁵ e, imipramina^{105,106}. Deste ponto de vista, o fármaco SRT, um antidepressivo oral amplamente utilizado, difere dos acima mencionados em seu esqueleto químico, um tetrahidronaftaleno. Sertralina é um fármaco com sua patente expirada, com alta tolerabilidade e testado com sucesso em modelo animal de LV¹⁰⁹, assim sendo, um possível candidato ao reposicionamento.

Embora o mecanismo de ação tenha sido parcialmente revelado¹⁰⁹, um conhecimento profundo é necessário para otimizar combinações terapêuticas, ou avaliar o risco de indução de resistência. Aparentemente, nenhuma proteína homóloga ao alvo da SRT no hospedeiro mamífero foi identificada em parasitas *Leishmania*, ao passo que a disfunção mitocondrial em parasitas *Leishmania donovani* foi primeiramente descrito por Palit e Ali em 2008¹⁰⁹.

Em nossos estudos, o efeito de desacoplamento da cadeia respiratória pelo fármaco SRT foi determinado como uma possível origem desta disfunção mitocondrial. A Figura 44 resume o cenário hipotético gerado a partir de nossos resultados para a atividade leishmanicida da SRT. Em tempos iniciais de incubação, SRT age como um agente desacoplador aumentando o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória. Isso leva a um colapso bioenergético pelo bloqueio da fosforilação oxidativa, concomitante com aumento do escape de elétrons causando pela produção de ROS, resultando em estresse oxidativo. Em períodos mais longos de incubação, isto induz um desarranjo metabólico e dano morfológico, não exclusivamente restrito a mitocôndria, como visualizado pelas imagens de microscopia eletrônica. De fato, a contínua diminuição da CE₅₀ em tempos de incubação mais longos, não foi revertida após remoção do fármaco, endossando essa sequência de eventos. A letalidade da

atividade da SRT foi adicionalmente suportada pelo perfil metabólico revelado nos estudos metabolômicos.

Eventos iniciais do efeito da SRT envolveram a ligeira despolarização do $\Delta\psi_p$ na CE_{50A} agravada principalmente pela rápida e intensa diminuição dos níveis de ATP_c, dois parâmetros essenciais para transporte de aminoácidos através da membrana plasmática realizado predominantemente por permeases AAPP em *Leishmania*¹⁹³⁻¹⁹⁵. Por exemplo, a inibição de bombas H⁺-ATPase da membrana plasmática, responsáveis pela criação do $\Delta\psi_p$, com concomitante inibição parcial da síntese de ATP resultaram a diminuição do transporte e concentração intracelular de aminoácido prolina em promastigotas de *Leishmania*¹⁹⁶. Foi demonstrado que o fármaco SRT induziu severa depleção do *pool* intracelular de aminoácidos, resultado do severo colapso bioenergético, somado a possibilidade de um efeito cumulativo sobre o $\Delta\psi_p$ em tempos de incubação mais longos, como sugerido pela alta capacidade de despolarização demonstrada por altas concentrações de SRT (50 μ M). Além da óbvia função na síntese de proteínas, aminoácidos servem como osmólitos orgânicos envolvidos na regulação do volume celular¹⁹³, biossíntese de reservas energéticas¹⁹⁷ e fontes alternativas de carbono em condições deficientes de monossacarídeos como glicose¹⁹⁸.

Como outros antidepressivos ISRSs¹³⁵, a SRT não demonstrou um efeito detergente significativo; foram necessárias concentrações duas vezes maiores que a CE_{50A} para produzir um sinal de fluorescência Sytox® Green após 4 horas de incubação. Este efeito de permeabilização de membrana plasmática em altas concentrações, pode ser decorrente do fato de que antidepressivos clorados se ligam a bicamadas lipídicas com o dobro de afinidade dos análogos não clorados¹⁹⁹. A microscopia eletrônica confirmou a integridade física da membrana plasmática de promastigotas incubados durante 4 horas com SRT na CE_{50A}. Valores de CE₅₀ (24 μ M), determinados após 12 horas de incubação, não foram muito diferentes dos valores de CE_{50A} (20 μ M) determinados a 4 horas, indicando uma possível ausência de um efeito cumulativo de permeabilização com possível formação de poros de membrana. Contudo, mesmo que a integridade de membrana plasmática seja mantida, parâmetros subótimos de fluidez e permeabilidade da bicamada lipídica, podem ser esperados devido a diminuição de ácidos graxos poliinsaturados e aumento de ácidos

graxos saturados²⁰⁰, intensificando funções anormais de membrana plasmática a longo prazo, como o transporte de aminoácidos.

A perda da capacidade de regulação de fluidez da membrana plasmática em promastigotas incubados com SRT tem consequências diretas na adaptação as mudanças de temperatura, enfrentadas ao longo do ciclo de vida do parasita²⁰¹. Assim como, o aumento do metabolismo de esfingolipídios induzido pelo fármaco SRT tem implicação direta nos processos de diferenciação, virulência e viabilidade do parasita. Em *Leishmania*, tanto a via biossintética quanto a via de degradação de esfingolipídios, demarcadas pelas enzimas serina palmitoiltransferase²⁰² e esfingosina-1-fosfato liase¹⁷⁹, respectivamente, assumem a função de abastecer os níveis de fosfatidiletanolamina, indispensáveis para viabilidade de promastigotas em fase estacionária e diferenciação para formas infectantes metacíclicas. Ao mesmo tempo, altas concentrações de esfingobases como esfinganina e esfingosina são tóxicas para *Leishmania*²⁰².

A rápida diminuição dos níveis de ATP_c na CE_{50A} foi acompanhada pela alteração transitória do $\Delta\psi_p$ e ausência de permeabilização da membrana plasmática, sugerindo o colapso energético como o evento inicial e, a mitocôndria como alvo primário da SRT. De fato, o efeito de desacoplamento da cadeia respiratória, foi determinado como uma possível origem desta disfunção mitocondrial. O efeito desacoplador da SRT foi anteriormente descrito em hepatócitos de rato²⁰³.

A severa depleção dos níveis de aminoácidos, induzida pela SRT, incluiu aspartato e prolina, ambos importantes precursores para combustíveis metabólicos em *Leishmania* através de intermediários do ciclo TCA^{91, 204}, e glutamato, um aminoácido central para muitas vias metabólicas e principal produto anabólico do ciclo⁹¹. Considerando que o transporte de glutamato através da membrana é mínimo em condições de cultura, seus níveis intracelulares têm sido sugeridos como um indicativo do estado funcional do ciclo TCA⁹¹. Neste estudo, a deterioração do desempenho do ciclo TCA de promastigotas incubados com SRT, sugerida pela depleção dos aminoácidos acima descrito, foi adicionalmente suportada pela diminuição dos níveis de succinato, o principal substrato para a cadeia respiratória, visto que a contribuição do complexo I em *Leishmania* tem sido considerada negligenciável⁵⁴.

Uma fosforilação oxidativa deficiente pode ser compensada por altas taxas glicolíticas, como descrito em parasitas *Leishmania* resistentes a tafenoquina, um inibidor da cadeia respiratória²⁰⁵. Em promastigotas incubados com SRT, nenhuma evidência experimental suporta esta hipótese. De fato, se a diminuição de hexose-fosfato detectada corresponde a glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato, precursores metabólicos comuns para a via glicolítica e via das pentoses fosfato, uma diminuição no fluxo metabólico em ambas as vias pode ser esperada. Se for o caso, a fosforilação oxidativa deficiente não pode ser contrabalanceada por um aumento da contribuição da glicólise. Em condições normais de cultura, promastigotas utilizam minimamente acetato e ácidos graxos⁹¹, contudo, a depleção de aminoácidos imposta pela SRT pode ser aliviada pelo uso de ácidos graxos como fonte energética como descrito em amastigotas intracelulares⁵². A degradação de glicerofosfolipídios por fosfolipases A ou B pode fornecer ácidos graxos, com simultânea modificação do padrão de lisofosfolipídios, como observado em promastigotas incubados com SRT.

A diminuição da sedoheptulose-7-fosfato do ramo não-oxidativo da via das pentoses fortalece a hipótese de inibição desta via metabólica. O redirecionamento da glicose da via glicolítica para a via das pentoses fosfato foi descrita para parasitas *Leishmania* sob estresse oxidativo¹⁶⁷ para assegurar um suprimento adequado de NADPH, o único cofator reconhecido pela tripanotiona redutase (TryR) para manutenção de níveis adequados de tripanotiona reduzida, T(SH)₂. Em *Leishmania*, a tripanotiona, mas não a glutatona como no hospedeiro mamífero, é o fornecedor exclusivo de equivalentes redutores para enzimas envolvidas na detoxificação de ROS^{75,206}, portanto indispensável para manutenção da homeostase redox e sobrevivência do parasita²⁰⁷. Foi interessante o fato de que SRT induziu rápido acúmulo de ROS, diminuiu os níveis de tripanotiona enquanto aumentou o *pool* de glutatona.

O acúmulo de ROS em tempos iniciais de incubação, provavelmente foi uma consequência direta do aumento do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória devido ao desacoplamento induzido pela SRT, uma vez que, o escape progressivo de elétrons, causa a produção de ROS, resultando em estresse oxidativo. Como em promastigotas incubados com SRT, a perda do $\Delta\psi_m$ tem sido demonstrada após indução de estresse oxidativo por fármacos^{165,208}. A redução não enzimática de ROS, desempenhada apenas por tióis livres como GSH, tem sido argumentada como

excessivamente lenta para contrabalancear o estresse oxidativo, comparado ao sistema tripanotiona–TryR²⁰⁶. Assim, a redução dos níveis de tripanotiona dissulfeto, sugerem a incapacidade do promastigotas de manter um adequado metabolismo de defesa tiol, enquanto que o desequilíbrio do *pool* de GSH/GSSH parece incapaz por si só de subverter o estresse oxidativo induzido pela SRT.

A indatralina, outro ISRSs, estruturalmente homólogo a sertralina, inibe a TryR de *T. brucei*²⁰⁹. Caso esta inibição seja extrapolada para *Leishmania*, SRT enfraqueceria ainda mais a capacidade de detoxificação de ROS. Neste cenário, SRT não apenas induziria o estresse oxidativo, mas também bloquearia os principais sistemas de defesa do parasita contra ROS de maneira sinérgica, evitando adaptação da glicose para a via das pentoses fosfato com diminuição do suprimento NADPH, mais inibição da TryR.

O aumento dos níveis de glutathione é coerente com a diminuição dos níveis de tripanotiona, uma vez que duas moléculas GSH, são utilizadas na conjugação com espermidina para síntese da tripanotiona⁷⁶. O mesmo padrão de estresse oxidativo, com diminuição de tripanotiona e concomitante aumento de glutathione, foi descrito em parasitas *Leishmania* tratados com cisplatina²¹⁰ ou hipericina²¹¹. Assim como em situações de bloqueio da biossíntese de espermidina, tanto por inibição²¹¹, quanto por deleção do gene ornitina descarboxilase²¹². Similar aos promastigotas incubados com SRT, estes parasitas nocauteados apresentam níveis diminuídos de arginina e putrescina, dois metabólitos da via das poliaminas. Vale a menção de que tripanotiona pode sofrer uma degradação reversa em glutathione e espermidina, para assegurar níveis adequados de espermidina envolvida na biossíntese de hipusina, um aminoácido essencial para *Leishmania*^{212,213}.

A via das poliaminas tem sido considerada um potencial alvo terapêutico em parasitas *Leishmania*⁷² e a regulação negativa desta via foi claramente sugerida em promastigotas incubadas com SRT pela diminuição dos níveis de metionina e arginina, ambos dependentes do transporte ativo devido a ausência de síntese endógena²¹⁴ e putrescina sintetizada pela ornitina descarboxilase. O acúmulo anômalo de S-adenosilmetionina (Adomet) no ramo adjacente a via das poliaminas, pode ser decorrente da atividade da enzima metionina adenosiltransferase de *Leishmania* que,

diferentemente da sua contraparte em mamíferos, é fracamente regulada por seu produto Adomet²¹⁵. Promastigotas *Leishmania* podem subverter deficiências de poliaminas provocadas por fármacos ativando o transporte de putrescina e espermidina²¹⁶, tal mecanismo parece não ocorrer em promastigotas incubados com SRT corroborando a hipótese de perda das funcionalidades da membrana plasmática sob longos períodos de incubação.

Sertralina foi um pobre indutor de resistência em *Leishmania*, como demonstrado pelo ligeiro aumento de CE_{50C} em 8 meses de crescimento *in vitro* de promastigotas sob pressão constante do fármaco. Sertralina tem sido descrita como um sensibilizador¹³⁴ em bactérias e linhagens de células tumorais¹⁴¹. Se um efeito similar for suposto em *Leishmania*, SRT não somente demonstraria pouca capacidade indutora de resistência, mas também agiria como um excelente candidato para combinação terapêutica com fármacos cuja resistência seja completa ou parcialmente baseada no efluxo do fármaco por transportadores ABC de membrana como descrito para o antimônio ou miltefosina^{217,218}. Além disso, o aumento dos níveis de glutatona favoreceriam a formação de adutos de antimônio e glutatona (Sb(V)-GSH). Esses adutos são substratos da enzima redutase 1 tiol-dependente (TDR1) envolvida na conversão do pró-fármaco Sb(V) para Sb(III), a forma final tóxica do antimônio²¹⁹. Nesse caso, um potencial sinergismo entre SRT e antimônio poderia ser hipotetizado.

Em conclusão, este estudo demonstrou que SRT induz o desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial de promastigotas *Leishmania*, entretanto, como descrito para muitos outros desacopladores²²⁰, alvos adicionais foram necessários para produzir a atividade leishmanicida letal como apontado pelos estudos metabolômicos. Em conclusão, a sertralina parece ser um possível candidato para o reposicionamento de fármacos no tratamento da LVA, com boas expectativas para sua implementação em combinações terapêuticas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Antidepressivos encontram-se entre os fármacos mais vendidos do mundo, onde muitos deles, já apresentam suas patentes expiradas, possibilitando o reposicionamento como estratégia de Saúde Pública, principalmente em países de baixa renda e com alta prevalência das leishmanioses.

A nova geração de antidepressivos ISRSs, aqui representada pelo fármaco SRT, geralmente tem estruturas moleculares das quais diferem completamente dos clássicos antidepressivos de estrutura tricíclica, aqui representada pelo fármaco relaxante muscular CBP. Em comum, a presença um grupamento hidrofóbico (anel aromático) e grupamento amina conferem características anfifílicas de importantes consequências para uma ampla variedade de funções na membrana e interações não-específicas, que primariamente foram sugeridas como responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* inespecífica de antidepressivos tricíclicos.

De fato, as estruturas anfifílicas destes fármacos parecem desempenhar um importante papel no particionamento de ambas as moléculas em bicamadas lipídicas, facilitando o acesso ao interior citoplasmático, mas não foram determinantes na tradução de um mecanismo leishmanicida inespecífico; pelo contrário, os fármacos CBP e SRT demonstraram mecanismo de ação complementemente diferentes em parasitas *Leishmania*.

Estudos metabolômicos foram precisos em detectar alterações moleculares específicas para cada fármaco. Desta forma, foi observado duas situações, onde: i) o fármaco CBP induziu uma evidente catástrofe metabólica a partir da regulação positiva generalizada do metabolismo, incluindo a atividade desregulada de transportadores de membrana e, possivelmente perda completa da capacidade de sinalização e regulação celular e; ii) o fármaco SRT induziu um desarranjo metabólico generalizado marcado pela severa depleção do *pool* intracelular de aminoácidos e deterioração do metabolismo energético.

É interessante ressaltar o fato de que apesar do desenvolvimento racional dos antidepressivos ISRSs sobre alvos moleculares específicos, interações com alvos não previstos, enfatizam os diferentes níveis de “promiscuidade” molecular e, alta probabilidade de efeitos multi-alvo, como descrito para fármaco SRT. Apesar de ambos os fármacos CBP e SRT serem aprovados e disponíveis no mercado, um profundo estudo de definição de novas doses *in vivo* será necessário para o reposicionamento no tratamento das leishmanioses. Além disso, o conhecimento de como um fármaco funciona permite a proposição de terapias combinatórias racionais, como as discutidas para o fármaco SRT.

Nesse projeto de pesquisa, a junção de clássicas técnicas parasitológicas na determinação da atividade biológica, técnicas de fluorescência, técnicas de microscopia, citometria de fluxo e as mais recentes técnicas analíticas aplicadas nos estudos metabolômicos permitiu uma clara ampliação da descrição dos mecanismos de ação do fármaco SRT, e proposição de um provável alvo para a atividade do fármaco CBP em parasitas *Leishmania*. Estudos futuros poderiam confirmar a indução de estresse de RE pelo fármaco CBP e ampliar o conhecimento científico, ainda bastante limitado. Apesar disso, o estresse do RE vem sendo reconhecido como um potencial alvo farmacológico em parasitas *Leishmania*.

Finalmente, os fármacos CBP, um relaxante muscular e a SRT, um antidepressivo, são dois fármacos orais, que demonstraram seletividade para parasitas *Leishmania (L.) infantum* similar ao fármaco padrão miltefosina. Ambos demonstraram um mecanismo de ação letal e irreversível nestes parasitas, encorajando o prosseguimento para estudos em modelo animal de infecção da LV para ajuste de doses e melhoria de redução de carga parasitária.

7 CONCLUSÕES

- a) Os fármacos CBP e SRT demonstraram atividade *in vitro* anti-*Leishmania (L.) infantum*, tanto para as formas extracelulares, quanto intracelulares do parasita.
- b) Nas condições *in vitro* estabelecidas, os fármacos CBP e SRT demonstraram seletividade similar ao fármaco miltefosina.
- c) A hipótese do mecanismo de ação CBP em *Leishmania* envolve: difusão do fármaco CBP pela membrana plasmática causando diminuição do $\Delta\psi_p$; no interior citoplasmático, o fármaco CBP parece induzir em um estresse do RE com liberação de Ca^{+2} para o citoplasma e concomitante desacoplamento brando da cadeia respiratória mitocondrial e depleção dos níveis de ATP. Com o efeito prolongado, a liberação de Ca^{+2} parece ativar autofagia e seu influxo para mitocôndria, potencializar os efeitos deletérios como a diminuição do $\Delta\psi_m$ e o aumento da produção de ROS. A longo prazo, o fármaco CBP induz uma catástrofe metabólica caracterizada pela regulação positiva generalizada do metabolismo e atividade desregulada de transportadores de membrana, gerando alto gasto energético, associado a condições insuficientes de produção de energia, resultando na morte celular do parasita.
- d) A hipótese de mecanismo de ação do fármaco SRT sugere um mecanismo multi-alvo em promastigotas *Leishmania (L.) infantum*. Desta forma, a SRT atravessa membrana plasmática, causando ligeira despolarização do $\Delta\psi_p$, seguido pelo acúmulo na mitocôndria, produzindo desacoplamento da cadeia respiratória, inibição da síntese de ATP, aumento fluxo de elétrons com aumento da produção de ROS e, despolarização do $\Delta\psi_m$. A tempos mais longos de incubação, o aumento do estresse oxidativo é amplificado pela diminuição da capacidade do metabolismo tiol-redox, produzindo um desarranjo metabólico generalizado marcado pela severa depleção do *pool* intracelular de aminoácidos e deterioração do metabolismo energético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
2. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases. Geneva:WHO; 2015. 191 p.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2003
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Situação Epidemiológica – Dados. [acesso em 03 maio 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>.
5. González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, Sarkar S. Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1):e585.
6. Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. *BMJ*. 2002;325(7357):176-7.
7. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604-15.
8. Singh B, Sundar S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*. 2012;30(26):3834-42.
9. Moore EM, Lockwood DN. Treatment of visceral leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(2):151-8.
10. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003;19(11):502-8.
11. Furtado TA, Cisalpino EO, Santos UM. In vitro studies of the effect of amphotericin B on *Leishmania brasiliensis*. *Antibiot Chemother*. 1960;10:692-3.
12. Cunha MA, Leao AC, de Cassia Soler R, Lindoso JA. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2015.

13. Hendrickx S, Van den Kerkhof M, Mabille D, Cos P, Delputte P, Maes L, et al. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5):e0005620.
14. Ramesh V, Singh R, Avishek K, Verma A, Deep DK, Verma S, et al. Decline in Clinical Efficacy of Oral Miltefosine in Treatment of Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) in India. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0004093.
15. Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis*. 2012;55(4):543-50.
16. Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(8):2397-403.
17. Canuto GA, Castilho-Martins EA, Tavares MF, Rivas L, Barbas C, López-González Á. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(14):3459-76.
18. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(2):237-52.
19. Chawla B, Jhingran A, Panigrahi A, Stuart KD, Madhubala R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One*. 2011;6(10):e26660.
20. Machado-Silva A, Guimarães PP, Tavares CA, Sinisterra RD. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(3):247-60.
21. Chong CR. Repurposing drugs for tropical diseases: case studies and open-source screening initiatives. In: Barratt MJ, Frail DE, editors. *Drug repositioning: bringing new life to shelved assets and existing drugs*. Hoboken: John Wiley; 2012. p.347-88.
22. van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(3):184-94.
23. Mesquita JT, Tempone AG, Reimao JQ. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta Trop*. 2013;130C:112-6.

24. Zheng W, Thorne N, McKew JC. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(21-22):1067-73.
25. Tempone AG. Recent Advances in the treatment of leishmaniasis. In: Leon L, Torres-Santos EC. *Different aspects on chemotherapy of Trypanosomatids*. New York: Nova Science Publishers; 2017. p. 227-44.
26. Schenone M, Dančík V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol*. 2013;9(4):232-40.
27. Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9764):477-86.
28. Sanderson L, Yardley V, Croft SL. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(7):1888-91.
29. Oprea TI, Bauman JE, Bologa CG, Buranda T, Chigaev A, Edwards BS, et al. Drug Repurposing from an Academic Perspective. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2011;8(3-4):61-9.
30. Oura M, Sternberg TH, Wright ET. A new antifungal antibiotic, amphotericin B. *Antibiot Annu*. 1955;3:566-73.
31. Smorenburg CH, Seynaeve C, Bontenbal M, Planting AS, Sindermann H, Verweij J. Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs*. 2000;11(10):825-8.
32. Schroeder R, Waldsich C, Wank H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*. 2000;19(1):1-9.
33. Huang R, Southall N, Wang Y, Yasgar A, Shinn P, Jadhav A, et al. The NCGC pharmaceutical collection: a comprehensive resource of clinically approved drugs enabling repurposing and chemical genomics. *Sci Transl Med*. 2011;3(80):80ps16.
34. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(12):993-6.
35. Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, et al. The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med*. 2017;23(4):405-8.
36. Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, Houghten RA. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(9-10):495-501.

37. Barrett MP, Mottram JC, Coombs GH. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.* 1999;7(2):82-8.
38. Gilbert IH. Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches. *J Med Chem.* 2013;56(20):7719-26.
39. Zufferey R, Mamoun CB. Choline transport in *Leishmania* major promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;125(1-2):127-34.
40. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1425-30.
41. Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1327-32.
42. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):852-9.
43. Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S, Saha B. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol.* 2009;182(11):7146-54.
44. Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;170(2):55-64.
45. Zilberstein D, Dwyer DM. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem J.* 1988;256(1):13-21.
46. Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416(1-2):7-12.
47. Zilberstein D, Philosoph H, Gepstein A. Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;36(2):109-17.
48. Berg M, Van der Veken P, Goeminne A, Haemers A, Augustyns K. Inhibitors of the purine salvage pathway: a valuable approach for antiprotozoal chemotherapy? *Curr Med Chem.* 2010;17(23):2456-81.
49. Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2005;21(11):508-12.

50. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016;227:98-114.
51. Hart DT, Coombs GH. The effects of carbon dioxide and oxygen upon the growth and in vitro transformation of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 1981;4(1-2):117-27.
52. Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, Chambers JM, Ng M, McConville MJ. Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003888.
53. Van Hellemond JJ, Tielens AG. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;85(1):135-8.
54. Opperdoes FR, Michels PA. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol.* 2008;24(7):310-7.
55. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011;50(2):98-115.
56. Hanstein WG. Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 1976;456(2):129-48.
57. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios de bioquímica.* 3ª ed. São Paulo: Sarvier.; 2002. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação; p. 256.
58. Menna-Barreto RF, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int.* 2014;2014:614014.
59. Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24717-27.
60. Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11798-813.
61. Dolai S, Pal S, Yadav RK, Adak S. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in *Leishmania* through Ca²⁺-dependent and caspase-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2011;286(15):13638-46.

62. McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(1):122-54; table of contents.
63. Dolai S, Adak S. Endoplasmic reticulum stress responses in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;197(1-2):1-8.
64. Gosline SJ, Nascimento M, McCall LI, Zilberstein D, Thomas DY, Matlashewski G, et al. Intracellular eukaryotic parasites have a distinct unfolded protein response. *PLoS One.* 2011;6(4):e19118.
65. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-6.
66. Chow C, Cloutier S, Dumas C, Chou MN, Papadopoulou B. Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. *Cell Microbiol.* 2011;13(7):1059-77.
67. Moraes MC, Jesus TC, Hashimoto NN, Dey M, Schwartz KJ, Alves VS, et al. Novel membrane-bound eIF2alpha kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* 2007;6(11):1979-91.
68. Verma S, Mehta A, Shaha C. CYP5122A1, a novel cytochrome P450 is essential for survival of *Leishmania donovani*. *PLoS One.* 2011;6(9):e25273.
69. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;126(2):129-42.
70. McCall LI, El Aroussi A, Choi JY, Vieira DF, De Muylder G, Johnston JB, et al. Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):e0003588.
71. Linares GE, Ravaschino EL, Rodriguez JB. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem.* 2006;13(3):335-60.
72. Jiang Y, Roberts SC, Jardim A, Carter NS, Shih S, Ariyanayagam M, et al. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 1999;274(6):3781-8.
73. Kaur K, Emmett K, McCann PP, Sjoerdsma A, Ullman B. Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool.* 1986;33(4):518-21.

74. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*. 1985;227(4693):1485-7.
75. Flohe L, Hecht HJ, Steinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):966-84.
76. Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*. 1992;46:695-729.
77. Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:117-43.
78. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005;309(5733):436-42.
79. Das BB, Ganguly A, Majumder HK. DNA topoisomerases of *Leishmania*: the potential targets for anti-leishmanial therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2008;625:103-15.
80. Chakraborty AK, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;152(2):605-11.
81. Lucumi A, Robledo S, Gama V, Saravia NG. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(8):1990-5.
82. Yang G, Choi G, No JH. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6828-36.
83. Fernandez MM, Malchiodi EL, Algranati ID. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):86-93.
84. Gregori-Puigjané E, Setola V, Hert J, Crews BA, Irwin JJ, Lounkine E, et al. Identifying mechanism-of-action targets for drugs and probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(28):11178-83.
85. Vincent IM, Barrett MP. Metabolomic-based strategies for anti-parasite drug discovery. *J Biomol Screen*. 2015;20(1):44-55.
86. Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 2007;37(11):1173-86.
87. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*. 2007;39(7):839-47.

88. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;181(2):61-72.
89. Scheltema RA, Decuypere S, T'kindt R, Dujardin JC, Coombs GH, Breitling R. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitology.* 2010;137(9):1291-302.
90. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6(7):1060-83.
91. Saunders EC, Ng WW, Chambers JM, Ng M, Naderer T, Kromer JO, et al. Isotopomer profiling of *Leishmania mexicana* promastigotes reveals important roles for succinate fermentation and aspartate uptake in tricarboxylic acid cycle (TCA) anaplerosis, glutamate synthesis, and growth. *J Biol Chem.* 2011;286(31):27706-17.
92. Kloehn J, Saunders EC, O'Callaghan S, Dagley MJ, McConville MJ. Characterization of metabolically quiescent *Leishmania* parasites in murine lesions using heavy water labeling. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):e1004683.
93. Westrop GD, Williams RA, Wang L, Zhang T, Watson DG, Silva AM, et al. Metabolomic Analyses of *Leishmania* Reveal Multiple Species Differences and Large Differences in Amino Acid Metabolism. *PLoS One.* 2015;10(9):e0136891.
94. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry.* 2005;24(4):285-94.
95. Barrett MP, Bakker BM, Breitling R. Metabolomic systems biology of trypanosomes. *Parasitology.* 2010;137(9):1285-90.
96. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):140-50.
97. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem.* 2011;286(29):25435-42.
98. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst.* 2012;137(2):293-300.
99. Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. EC-EM for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012. *Electrophoresis.* 2013;34(1):86-98.
100. Lindsley CW. The top prescription drugs of 2011 in the United States: antipsychotics and antidepressants once again lead CNS therapeutics. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(8):630-1.

101. Ramachandrai CT, Subramanyam N, Bar KJ, Baker G, Yeragani VK. Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more. *Indian J Psychiatry*. 2011;53(2):180-2.
102. López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des*. 2009;15(14):1563-86.
103. Lattimore KA, Donn SM, Kaciroti N, Kemper AR, Neal CR, Jr., Vazquez DM. Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) use during pregnancy and effects on the fetus and newborn: a meta-analysis. *J Perinatol*. 2005;25(9):595-604.
104. Evans AT, Croft SL. Antileishmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity. *Biochem Pharmacol*. 1994;48(3):613-6.
105. Zilberstein D, Dwyer DM. Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite *Leishmania*. *Science*. 1984;226(4677):977-9.
106. Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Naskar K, Sundar S, Dujardin JC, et al. Imipramine is an orally active drug against both antimony sensitive and resistant *Leishmania donovani* clinical isolates in experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1987.
107. Zilberstein D, Liveanu V, Gepstein A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochem Pharmacol*. 1990;39(5):935-40.
108. Dinesh N, Kaur PK, Swamy KK, Singh S. Mianserin, an antidepressant kills *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp Parasitol*. 2014;144:84-90.
109. Palit P, Ali N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(5):1120-4.
110. Alberca LN, Sbaraglini ML, Balcazar D, Fraccaroli L, Carrillo C, Medeiros A, et al. Discovery of novel polyamine analogs with anti-protozoal activity by computer guided drug repositioning. *J Comput Aided Mol Des*. 2016;30(4):305-21.
111. Reis M, Aamo T, Spigset O, Ahlner J. Serum concentrations of antidepressant drugs in a naturalistic setting: compilation based on a large therapeutic drug monitoring database. *Ther Drug Monit*. 2009;31(1):42-56.
112. Levine B, Jenkins AJ, Smialek JE. Distribution of sertraline in postmortem cases. *J Anal Toxicol*. 1994;18(5):272-4.
113. DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. Clinical pharmacokinetics of sertraline. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41(15):1247-66.

114. Cunha EF, Andrade-Neto VV, Lima ML, da Costa-Silva TA, Galisteo AJ, Abengozar MA, et al. Cyclobenzaprine Raises ROS Levels in *Leishmania infantum* and Reduces Parasite Burden in Infected Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1).
115. Cotton ML, Down GR. Cyclobenzaprine hydrochloride. *Anal Profiles Drug Subst*. 1988;17:41-72.
116. Chou R, Peterson K, Helfand M. Comparative efficacy and safety of skeletal muscle relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review. *J Pain Symptom Manage*. 2004;28(2):140-75.
117. Borenstein DG, Korn S. Efficacy of a low-dose regimen of cyclobenzaprine hydrochloride in acute skeletal muscle spasm: results of two placebo-controlled trials. *Clin Ther*. 2003;25(4):1056-73.
118. Arnold LM, Keck PE, Welge JA. Antidepressant treatment of fibromyalgia. A meta-analysis and review. *Psychosomatics*. 2000;41(2):104-13.
119. Cimolai N. Cyclobenzaprine: a new look at an old pharmacological agent. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2009;2(3):255-63.
120. See S, Ginzburg R. Choosing a skeletal muscle relaxant. *Am Fam Physician*. 2008;78(3):365-70.
121. Wang RW, Liu L, Cheng H. Identification of human liver cytochrome P450 isoforms involved in the in vitro metabolism of cyclobenzaprine. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(7):786-91.
122. Till AE, Constanzer ML, Demetriades J, Irvin JD, Lee RB, Ferguson RK. Evidence for route dependent biotransformation of cyclobenzaprine hydrochloride. *Biopharm Drug Dispos*. 1982;3(1):19-28.
123. Hucker HB, Stauffer SC, Albert KS, Lei BW. Plasma levels and bioavailability of cyclobenzaprine in human subjects. *J Clin Pharmacol*. 1977;17(11-12):719-27.
124. Winchell GA, King JD, Chavez-Eng CM, Constanzer ML, Korn SH. Cyclobenzaprine pharmacokinetics, including the effects of age, gender, and hepatic insufficiency. *J Clin Pharmacol*. 2002;42(1):61-9.
125. Spiller HA, Winter ML, Mann KV, Borys DJ, Muir S, Krenzelok EP. Five-year multicenter retrospective review of cyclobenzaprine toxicity. *J Emerg Med*. 1995;13(6):781-5.
126. Moreira A, Barbin C, Martinez H, Aly A, Fonseca R. Maternal use of cyclobenzaprine (Flexeril) may induce ductal closure and persistent pulmonary hypertension in neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27(11):1177-9.

127. United States. Food and Drug Administration. Flexedril (cyclobenzaprine HCl) tablets. [acesso em 25 maio 2017]. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2003/017821s045lbl.pdf.
128. Honda M, Nishida T, Ono H. Tricyclic analogs cyclobenzaprine, amitriptyline and cyproheptadine inhibit the spinal reflex transmission through 5-HT(2) receptors. *Eur J Pharmacol.* 2003;458(1-2):91-9.
129. Jones DC, Ariza A, Chow WH, Oza SL, Fairlamb AH. Comparative structural, kinetic and inhibitor studies of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase with *T. cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;169(1):12-9.
130. Benson TJ, McKie JH, Garforth J, Borges A, Fairlamb AH, Douglas KT. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. *Biochem J.* 1992;286 (Pt 1):9-11.
131. Garforth J, Yin H, McKie JH, Douglas KT, Fairlamb AH. Rational design of selective ligands for trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Structural effects on the inhibition by dibenzazepines based on imipramine. *J Enzyme Inhib.* 1997;12(3):161-73.
132. Bryson E, Hartman R, Arnold J, Gorman G, Sweitzer S, Asbill S. Skin Permeation and Antinociception of Compounded Topical Cyclobenzaprine Hydrochloride Formulations. *Int J Pharm Compd.* 2015;19(2):161-6.
133. Mandrioli R, Mercolini L, Raggi MA. Evaluation of the pharmacokinetics, safety and clinical efficacy of sertraline used to treat social anxiety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(11):1495-505.
134. Bohnert JA, Szymaniak-Vits M, Schuster S, Kern WV. Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2057-60.
135. Kumar VS, Sharma VL, Tiwari P, Singh D, Maikhuri JP, Gupta G, et al. The spermicidal and antitrichomonas activities of SSRI antidepressants. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16(9):2509-12.
136. Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Jenewein I, Ledochowski M. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(6):775-9.
137. Lass-Flörl C, Ledochowski M, Fuchs D, Speth C, Kacani L, Dierich MP, et al. Interaction of sertraline with *Candida* species selectively attenuates fungal virulence in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;35(1):11-5.
138. Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Rooney CM, Stossel A, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Sci Transl Med.* 2015;7(290):290ra89.

139. Wang H, Goehring A, Wang KH, Penmatsa A, Ressler R, Gouaux E. Structural basis for action by diverse antidepressants on biogenic amine transporters. *Nature*. 2013;503(7474):141-5.
140. Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. 2005;437(7056):215-23.
141. Drinberg V, Bitcover R, Rajchenbach W, Peer D. Modulating cancer multidrug resistance by sertraline in combination with a nanomedicine. *Cancer Lett*. 2014;354(2):290-8.
142. Luque-Ortega JR, Rivas L. Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol*. 2010;618:393-420.
143. Luque-Ortega JR, Rivero-Lezcano OM, Croft SL, Rivas L. In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1121-5.
144. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52366-75.
145. Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J*. 2007;403(2):323-34.
146. Vercesi AE, Bernardes CF, Hoffmann ME, Gadelha FR, Docampo R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J Biol Chem*. 1991;266(22):14431-4.
147. Godzien J, Alonso-Herranz V, Barbas C, Armitage EG. Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample. *Metabolomics*. 2015;11(3):518-28.
148. Godzien J, Ciborowski M, Angulo S, Barbas C. From numbers to a biological sense: How the strategy chosen for metabolomics data treatment may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LC-MS. *Electrophoresis*. 2013;34(19):2812-26.
149. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res*. 2007;6(2):469-79.

150. Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem*. 2008;80(1):115-22.
151. Oliveros JC. Venny 2.1. [acessado em 15 de outubro de 2016]. Disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
152. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W251-7.
153. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(4):533-54.
154. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005;309(5733):409-15.
155. Fisar Z. Interactions between tricyclic antidepressants and phospholipid bilayer membranes. *Gen Physiol Biophys*. 2005;24(2):161-80.
156. Fisar Z, Fuksová K, Velenovská M. Binding of imipramine to phospholipid bilayers using radioligand binding assay. *Gen Physiol Biophys*. 2004;23(1):77-99.
157. Yonar D, Paktaş DD, Horasan N, Strancar J, Sentjurs M, Sünnetçioğlu MM. EPR investigation of clomipramine interaction with phosphatidylcholine membranes in presence and absence of cholesterol. *J Liposome Res*. 2011;21(3):194-202.
158. Sanganahalli BG, Joshi PG, Joshi NB. Differential effects of tricyclic antidepressant drugs on membrane dynamics--a fluorescence spectroscopic study. *Life Sci*. 2000;68(1):81-90.
159. Kitagawa N, Oda M, Nobutaka I, Satoh H, Totoki T, Morimoto M. A proposed mechanism for amitriptyline neurotoxicity based on its detergent nature. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;217(1):100-6.
160. Terada H. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1981;639(3-4):225-42.
161. Weinbach EC, Costa JL, Nelson BD, Claggett CE, Hundal T, Bradley D, et al. Effects of tricyclic antidepressant drugs on energy-linked reactions in mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 1986;35(9):1445-51.
162. Daley E, Wilkie D, Loesch A, Hargreaves IP, Kendall DA, Pilkington GJ, et al. Chlorimipramine: a novel anticancer agent with a mitochondrial target. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(2):623-32.

163. Villanueva-Paz M, Cordero MD, Pavón AD, Vega BC, Cotán D, De la Mata M, et al. Amitriptyline induces mitophagy that precedes apoptosis in human HepG2 cells. *Genes Cancer*. 2016;7(7-8):260-77.
164. ABOOD LG. Effect of chlorpromazine on phosphorylation of brain mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1955;88(4):688-90.
165. Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets leishmania respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(12):5344-51.
166. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C817-33.
167. Ghosh AK, Sardar AH, Mandal A, Saini S, Abhishek K, Kumar A, et al. Metabolic reconfiguration of the central glucose metabolism: a crucial strategy of *Leishmania donovani* for its survival during oxidative stress. *FASEB J*. 2015;29(5):2081-98.
168. Seyfang A, Landfear SM. Substrate depletion upregulates uptake of myo-inositol, glucose and adenosine in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;104(1):121-30.
169. Rodriguez-Contreras D, Aslan H, Feng X, Tran K, Yates PA, Kamhawi S, et al. Regulation and biological function of a flagellar glucose transporter in *Leishmania mexicana*: a potential glucose sensor. *FASEB J*. 2015;29(1):11-24.
170. Darlyuk I, Goldman A, Roberts SC, Ullman B, Rentsch D, Zilberstein D. Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2009;284(30):19800-7.
171. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 3):379-83.
172. Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):743-54.
173. Perozo E, Cortes DM, Sompornpisut P, Kloda A, Martinac B. Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature*. 2002;418(6901):942-8.
174. Rokitskaya TI, Kotova EA, Naberezhnykh GA, Khomenko VA, Gorbach VI, Firsov AM, et al. Single channel activity of OmpF-like porin from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(4):883-91.

175. Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, et al. Glucosylceramide and lysophosphatidylcholines as potential blood biomarkers for drug-induced hepatic phospholipidosis. *Toxicol Sci.* 2014;141(2):377-86.
176. Saito K, Goda K, Kobayashi A, Yamada N, Maekawa K, Saito Y, et al. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine characterized by consolidated plasma and liver lipidomics as an early onset marker for tamoxifen-induced hepatic phospholipidosis. *J Appl Toxicol.* 2017.
177. Sawada H, Takami K, Asahi S. A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system. *Toxicol Sci.* 2005;83(2):282-92.
178. Lee SH, Stephens JL, Englund PT. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(4):287-97.
179. Zhang K, Pompey JM, Hsu FF, Key P, Bandhuvula P, Saba JD, et al. Redirection of sphingolipid metabolism toward de novo synthesis of ethanolamine in *Leishmania*. *EMBO J.* 2007;26(4):1094-104.
180. Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Mol Microbiol.* 2004;52(2):313-27.
181. Jiménez-Jiménez C, Carrero-Lérida J, Sealey-Cardona M, Ruiz Pérez LM, Urbina JA, González Pacanowska D. Delta24(25)-sterol methenyltransferase: intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania* major promastigotes overexpressing the enzyme. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160(1):52-9.
182. Goldshmidt H, Matas D, Kabi A, Carmi S, Hope R, Michaeli S. Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000731.
183. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu SS. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:1197-218.
184. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006;26(24):9220-31.
185. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 2007;14(9):1576-82.
186. Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;127(1):23-35.

187. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol.* 2007;78:217-45.
188. Oppendoes FR, Szikora JP. In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;147(2):193-206.
189. Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B, Bütikofer P. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog Lipid Res.* 2013;52(4):488-512.
190. Livore VI, Tripodi KE, Uttaro AD. Elongation of polyunsaturated fatty acids in trypanosomatids. *FEBS J.* 2007;274(1):264-74.
191. Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2014;4(2):95-111.
192. Singh S, Dinesh N, Kaur PK, Shamiulla B. Ketanserin, an antidepressant, exerts its antileishmanial action via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) enzyme of *Leishmania donovani*. *Parasitology research.* 2014;113(6):2161-8.
193. Inbar E, Schlisselberg D, Suter Grottemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D. A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *Biochem J.* 2013;449(2):555-66.
194. Inbar E, Canepa GE, Carrillo C, Glaser F, Suter Grottemeyer M, Rentsch D, et al. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids.* 2012;42(1):347-60.
195. Shaked-Mishan P, Suter-Grottemeyer M, Yoel-Almagor T, Holland N, Zilberstein D, Rentsch D. A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol.* 2006;60(1):30-8.
196. Vieira LL, Cabantchik ZI. Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H(+)-pump generated membrane potential. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;75(1):15-23.
197. Rodriguez-Contreras D, Landfear SM. Metabolic changes in glucose transporter-deficient *Leishmania mexicana* and parasite virulence. *J Biol Chem.* 2006;281(29):20068-76.
198. Burchmore RJ, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, Modi G, et al. Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3901-6.
199. Abdiche YN, Myszka DG. Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore. *Anal Biochem.* 2004;328(2):233-43.

200. de Mendoza D. Temperature sensing by membranes. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:101-16.
201. Uttaro AD. Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;196(1):61-70.
202. Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *EMBO J.* 2003;22(22):6016-26.
203. Li Y, Couch L, Higuchi M, Fang JL, Guo L. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. *Toxicol Sci.* 2012;127(2):582-91.
204. Bringaud F, Barrett MP, Zilberstein D. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:349-74.
205. Manzano JI, Carvalho L, Perez-Victoria JM, Castanys S, Gamarro F. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1045-52.
206. Flohé L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* 2013;1830(5):3139-42.
207. Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(11):1236-48.
208. Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavaleiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2011;6(2):e14666.
209. Walton JG, Jones DC, Kiuru P, Durie AJ, Westwood NJ, Fairlamb AH. Synthesis and evaluation of indatraline-based inhibitors for trypanothione reductase. *ChemMedChem.* 2011;6(2):321-8.
210. Tavares J, Ouaisi M, Ouaisi A, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. *Acta Tropica.* 2007;103(2):133-41.
211. Singh S, Sarma S, Katiyar SP, Das M, Bhardwaj R, Sundar D, et al. Probing the molecular mechanism of hypericin-induced parasite death provides insight into the role of spermidine beyond redox metabolism in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2015;59(1):15-24.
212. Jiang Y, Roberts SC, Jardim A, Carter NS, Shin S, Ariyanayagam M, et al. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(6):3781-8.

213. Chawla B, Jhingran A, Singh S, Tyagi N, Park MH, Srinivasan N, et al. Identification and characterization of a novel deoxyhypusine synthase in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2010;285(1):453-63.
214. Oppenheimer FR, Coombs GH. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol*. 2007;23(4):149-58.
215. Reguera RM, Balaña-Fouce R, Pérez-Pertejo Y, Fernández FJ, García-Estrada C, Cubría JC, et al. Cloning expression and characterization of methionine adenosyltransferase in *Leishmania infantum* promastigotes. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3158-67.
216. Balaña-Fouce R, Ordóñez D, Alunda JM. Putrescine transport system in *Leishmania infantum* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;35(1):43-50.
217. Leandro C, Campino L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2003;22(3):352-7.
218. Loiseau PM, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(5):539-50.
219. Fyfe PK, Westrop GD, Silva AM, Coombs GH, Hunter WN. *Leishmania* TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(29):11693-8.
220. Feng X, Zhu W, Schurig-Briccio LA, Lindert S, Shoen C, Hitchings R, et al. Anti-infectives targeting enzymes and the proton motive force. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(51):E7073-82.

APÊNDICE A – EC-EM

Tanto para a plataforma EC-EM quanto CLAE-EM foram utilizadas fonte de ionização tipo *eletrospray* (ESI), um tipo de ionização branda comparada a ionização por elétrons (IE), onde o íon precursor é pouco fragmentado e, portanto, este tipo de ionização não pode ser usado com objetivo na confirmação, como ocorre para a plataforma CG-EM. Em análises EC-EM, a identificação metabólica é realizada putativamente por meio da massa exata, enquanto a confirmação é realizada a partir de perfis de fragmentação obtidos a partir de análises EM/EM e/ou injeção de padrões comerciais para confirmação do tempo de migração (T_M)¹.

Neste estudo, a injeção dos padrões comerciais disponíveis na biblioteca CEMBIO foram adicionados as amostras para confirmação dos metabólitos. Sob mesmas condições analíticas, a coincidência do T_M e aumento do pico amostral após da adição do padrão comercial a amostra, foram considerados parâmetros confirmatórios quanto a identidade do metabólito. Figuras A1-A3 apresentam as confirmações realizados para o fármaco CBP enquanto figuras A4-A6 apresentam as confirmações para o fármaco SRT.

Fármaco CBP – Confirmação dos Metabólitos em EC-EM

Figura A1 – Confirmação dos metabólitos alterados pelo fármaco CBP na plataforma EC-EM. Eletroferogramas de íons extraídos (EIC) da amostra (menor pico) sobrepostos aos EICs correspondente a adição do padrão comercial (amostra+padrão, maior pico). A coincidência do tempo de migração e aumento do pico confirma a identidade do metabólito. Números correspondentes a Tabela 3.

Fármaco CBP – Confirmação dos Metabólitos em EC-EM

Figura A2 – Confirmação dos metabólitos alterados pelo fármaco CBP na plataforma EC-EM. Eletroferogramas de íons extraídos (EIC) da amostra (menor pico) sobrepostos aos EICs correspondente a adição do padrão comercial (amostra+padrão, maior pico). A coincidência do tempo de migração e aumento do pico confirma a identidade do metabólito. Números correspondentes a Tabela 3.

Fármaco CBP – Confirmação dos Metabólitos em EC-EM

Figura A3 – Confirmação dos metabólitos alterados pelo fármaco CBP na plataforma EC-EM. Eletroferogramas de íons extraídos (EIC) da amostra (menor pico) sobrepostos aos EICs correspondente a adição do padrão comercial (amostra+padrão, maior pico). A coincidência do tempo de migração e aumento do pico confirma a identidade do metabólito. Números correspondentes a Tabela 3.

Fármaco SRT – Confirmação dos Metabólitos em EC-EM

Figura A4 – Confirmação dos metabólitos alterados pelo fármaco SRT na plataforma EC-EM. Eletroferogramas de íons extraídos (EIC) da amostra (pico cinza) sobrepostos aos EICs correspondente a adição do padrão comercial (amostra+padrão, pico incolor). A coincidência do tempo de migração e aumento do pico confirma a identidade do metabólito. Números correspondentes a Tabela 6.

Fármaco SRT – Confirmação dos Metabólitos em EC-EM

Figura A5 – Confirmação dos metabólitos alterados pelo fármaco SRT na plataforma EC-EM pela adição de padrão comercial à amostra original. Eletroferogramas de íons extraídos (EIC) da amostra (pico cinza) sobrepostos aos EICs correspondente a adição do padrão comercial (amostra+padrão, pico incolor). A coincidência do tempo de migração e aumento do pico confirma a identidade do metabólito. Números correspondentes a Tabela 6.

Fármaco SRT – Confirmação dos Metabólitos em EC-EM

Figura A6 – Confirmação dos metabólitos alterados pelo fármaco SRT na plataforma EC-EM pela adição de padrão comercial à amostra original. Eletroferogramas de íons extraídos (EIC) da amostra (pico cinza) sobrepostos aos EICs correspondente a adição do padrão comercial (amostra+padrão, pico incolor). A coincidência do tempo de migração e aumento do pico confirma a identidade do metabólito. Números correspondentes a Tabela 6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. EC-EM in metabolomics. Electrophoresis. 2009;30(1):276-91.

APÊNDICE B – CLAE-EM/EM

Em análises CLAE-EM, diferentes colunas cromatográficas com diferentes características de separação que podem ser exploradas para separar metabólitos de massa molecular entre 50 a >1500 Da, desde apolares (colunas de fase normal), metabólitos lipofílicos de média a baixa polaridade (colunas de fase reversa, utilizada neste estudo) e metabólitos polares ou carregados (colunas HILIC – *Hydrophilic interaction liquid chromatography*). Estas análises incluem detecção de um número maior de metabólitos comparado as plataformas CG-EM e EC-EM, variando de lipídios de alta massa molecular como fosfolipídios e triglicérides até compostos apolares como triptofano¹⁻³.

Existe um número limitado de padrões comerciais disponíveis⁴, e não é realista a síntese de todos os metabólitos identificados pela plataforma CLAE-EM, o que torna o reconhecimento dos padrões de fragmentação molecular e construção de bancos de dados EM/EM uma ferramenta fundamental para análises CLAE-EM/EM. Na ausência de padrão comercial e perfil de fragmentação descrito em banco de dados, uma minuciosa interpretação dos possíveis padrões de fragmentação do íon precursor deve ser realizada, processo este, que demanda perícia e tempo, apesar do desenvolvimento de recentes softwares, que auxiliam o estudo dos padrões de fragmentação molecular *in silico*⁵.

Nas análises CLAE-EM/EM desenvolvidas neste estudo, o primeiro EM foi usado para selecionar m/z de interesse, então fragmentado no segundo EM produzindo um espectro de produtos iônicos altamente específico para o íon precursor selecionado. O perfil de fragmentação foi usado na identificação da molécula original podendo ser reconhecido em banco de dados espectrais CLAE-EM/EM como Metlin, Lipidmaps, e biblioteca construída *in house* (biblioteca CEMBio) a partir da injeção de padrões comerciais.

As principais categorias lipídicas identificadas nestes estudos glicerofosfolipídios (GFLs), ácidos graxos (AGs) e esfingolipídios (ELs). Em parasitas *Leishmania*, GFLs correspondem ~70% do total de lipídios⁶ cuja estrutura molecular pode ser resumida por uma “cabeça” polar, ligada via fosfato e glicerol, a cadeias carbônicas apolares de AGs. Fragmentos característicos das cabeças polares identificados em espectro de massas EM/EM diferenciam as classes de GFLs em fosfatidilcolina (PC, 30-40%), fosfatidiletanolamina (PE, ~10%), fosfatidilinositol (PI, ~10%), as principais classes de GFLs encontradas em *Leishmania*⁶. Assim como fragmentos característicos diferenciam a cadeia AG quanto ao número de carbonos e grau de insaturação⁴. A nomenclatura comum para referência de GFLs é definida como classe (cabeça polar) e entre parênteses as cadeias AGs (sn1/sn2), exemplo

PC(16:0/18:2) ou LisoPC(16:0), no caso de cadeia lateral única. Para um melhor entendimento da classificação de lipídios e nomenclaturas recomenda-se a leitura de Fahy et al.⁷

Esfingolipídios correspondem a 10% do total de lipídios de *Leishmania* e consistem desde moléculas simples como esfingosina, esfingina, fosforiladas ou não, até moléculas mais complexas com uma “cabeça” polar ligada a molécula de ceramida (a uma molécula de amida ligado a uma cadeia de AGs). A maioria dos ELs de *Leishmania* correspondem a moléculas simples, IPC (fosforilceramidas inositol não glicosiladas) e ceramidas⁶⁴⁴.

A seguir uma breve descrição do perfil de fragmentação das classes PCs, PEs e PIs foi descrita devido a identificação majoritária destas espécies.

Fosfatidilcolinas - PCs

No modo positivo, todas as PCs confirmadas foram ionizadas por protonação ($[M+H]^+$). A Figura B1 exemplifica a fragmentação da LPC(20:3) modo positivo. Íons relacionados as cabeças polares são encontrados na região inicial do espectro como m/z 124.99 ($C_2H_6O_4P$ – fosfato protonado) e m/z 184.07 ($C_5H_{15}O_4P$ – fosfocolina protonada), íons característicos da fragmentação de PCs. Na região intermediária do espectro, fragmentos relacionados aos AGs são normalmente identificados, exceto em ionizações positiva onde raramente podem ser detectados devido à baixa abundância. Na região final do espectro, perdas neutras e íon precursor são observados. Na figura B1, m/z 528.34 corresponde a perda de uma molécula de água (-18.01 Da) a partir do íon precursor (m/z 546.35, $[M+H]^+$) e o m/z 363.23 corresponde a perda de fosfocolina (-183.06 Da) a partir do íon precursor.

Figura B1 – Espectro CLAE(ESI⁺)-EM/EM da molécula LPC(20:3). m/z 86 ($C_5H_{12}N$)⁺; m/z 104 ($C_5H_{14}NO$)⁺; m/z 166 ($C_5H_{13}PO_3N$)⁺; m/z 184 ($C_5H_{15}NPO_4$)⁺

No modo negativo, a todas as PCs foram ionizadas por formato $[M+HCOO]^-$ e desprotonação não foi observada, possivelmente devido a carga positiva fixa do grupo alquil amônio quaternário dentro do grupo fosfocolina como discutido anteriormente em Godzien et al.⁴

A Figura B2a exemplifica a fragmentação da mesma molécula LPC(20:3), agora no modo negativo. Na região inicial do espectro, íons relacionados ao grupo fosfato foram encontrados tais como m/z 168.04 ($C_4H_{10}NO_4P$ – fosfocolina desmetilada desprotonada), m/z 224.06 ($C_7H_{15}NO_5P$ – fosfocolina desmetilada desidratada glicerol éster) e m/z 242.07 ($C_7H_{17}NO_6P$ – fosfocolina desmetilada glicerol éster), fragmentos característicos na identificação de PCs no modo de ionização negativo. Na região intermediária do espectro, fragmentos relacionados aos AGs são normalmente identificados, m/z 305.25 corresponde ao AG 20:3 desprotonado, portanto, o espectro de massa MS/MS descrito corresponde a molécula fragmentada LPC(20:3).

A massa neutra teórica da molécula LPC(20:3) é 545.3481 Da, enquanto a massa fragmentada determinada foi de 531.3304 Da (massa neutra). A molécula LPC(20:3) ionizada com $HCOO^-$ seria 545.3481 Da + 44.9982 Da = 590.3463 Da. Portanto, a diferença entre a massa teórica LPC(20:3)+ $HCOO^-$ e íon molecular seria 590.3463 - 530.3252 = 60.0211 Da que corresponde a perda metil formato ($HCOO-CH_3$), perda comumente encontrada em PCs ionizada com $HCOO^-$. Para confirmar esse tipo de ionização, os m/z 530.3252 e 590.3463 foram extraídos (Figura B2b,c) confirmando que o abundância da molécula inteira (m/z 590) é muito maior que o fragmento (m/z 530). Portanto, o íon precursor na fonte de fragmentação corresponde a LPC(20:3) ionizada com $HCOO^-$.

Figura B2 – (a) Espectro CLAE(ESI)-EM/EM da molécula LPC(20:3), fragmentos típicos de PCs: m/z 168, m/z 224, m/z 242; m/z 305 fragmento correspondente ao AG (20:3) desprotonado. (b) e (c) Abundâncias relativas ao m/z 530, fragmento molecular e m/z 590 correspondente a molécula LPC(20:3) ionizada com formato.

PEs

No modo positivo, todas as PEs foram ionizadas por protonação $[M+H]^+$. A figura B3a exemplifica o perfil de fragmentação da molécula LPE(18:2) ionizada por protonação. A região final do espectro corresponde a região mais informativa do perfil de fragmentação de PEs no modo positivo, caracterizada por perdas neutras características como -141.01 Da ($C_2H_8NO_4P$ – fosfoetanolamina) e -18.01 Da (H_2O). Na região inicial do espectro fragmentos relativos a ionização com Na^+ podem ser observados e na região intermediária do espectro, fragmentos relativos ao FAs são raramente detectados⁴.

No modo negativo, todas as PEs foram ionizadas por desprotonação $[M-H]^-$ como exemplificado pelo perfil de fragmentação da molécula LPE(18:2) (Figura B3b). Na região inicial do espectro fragmentos típicos da classe PE foram encontrados tais como m/z 140.01 ($C_2H_7NO_4P$ – fosfoetanolamina desprotonada), m/z 168.04 ($C_4H_{11}NO_4P$ – etanolamina fosfato desprotonada), m/z 196.03 ($C_5H_{11}NO_5P$ – glicerofosfocolina duplamente desidratada desprotonada). Na região intermediária, o fragmento correspondente ao AG 18:2 desprotonado (m/z 279.23) foi encontrado, enquanto na região final do espectro, perdas neutras são raramente esperadas contrastando com o modo positivo.

Figura B3 – (a) Espectro CLAE(ESI+)-EM/EM da molécula LPC (18:2), a perda neutra de fosfoetanolamina -141.01 Da é diagnóstica na identificação de PEs no modo positivo. (b) Espectro LC-(ESI-) MS/MS da molécula LPC (18:2), fragmentos m/z 140, m/z 196 identificam a classe PE e o fragmento m/z 279.2332 identifica a única cadeia de AG 18:2.

Fosfatidilinositol – PI

Todas as PIs deste estudo foram identificadas no modo de ionização negativo por desprotonação $[M-H]^-$. Fragmentos característicos da classe PI da cabeça polar modo negativo

descritos na base de dados Lipidmaps, m/z 223 (PI- $_2$ H $_2$ O-H), m/z 241 (PI-H $_2$ O-H), m/z 259, m/z 297 (GlicerolPI- $_2$ H $_2$ O, m/z 315 (GPI-H $_2$ O).

Outras classes de GLPs

Neste estudo alguma a classe PS (fosfatidilserina) foram identificadas putativamente, porém nenhuma pôde ser confirmada nas análises MS/MS. Alguns estudos sugerem que nível celular de PS é abaixo do limite de detecção de análises ESI/MS/MS⁶, enquanto outros defendem a inexistência desta espécie lipídica em parasitas *Leishmania*⁸. Exceto pela identificação putativa de uma PA (ácido fosfatídico), outras espécies lipídicas como PG (fosfatidilglicerol), cardiolipina (CL) não foram identificadas, o que também é condizente com os baixos níveis descritos em parasitas *Leishmania*⁶.

Como prova de identidade, os GFLs e AGs foram ordenados a partir do grau de insaturação, ou número de carbono da cadeia carbônica de AG e, a ordem de T_R tomada como prova de identificação, como exemplificado nas Tabelas B1 e B2. Espécies lipídicas com maior grau de insaturação são mais polares e consequentemente o T_R é menor na coluna de fase reversa, enquanto que o aumento do número de carbonos na cadeia de AG diminui a polaridade molecular e consequentemente o T_R será maior na coluna de fase reversa. Diferenças de T_R entre os dois modos de ionização entre os modo positivo e modo negativo nunca excederam 0,6 min para metabólitos duplamente identificados e, portanto, foram consideradas satisfatórias.

Tabela B1 - Glicerofosfolipídios ordenados pelo grau de insaturação

MM (BD)	Ionização		ID	RT (min)		Confirmação
521.3481	[M+HCOO] ⁻	↓ aumento polaridade	LPC(18:1)	20.33	↓ diminui T_R	MS/MS
521.3481	[M+H] ⁺		LPC(18:1)	20.89		MS/MS
519.3325	[M+HCOO] ⁻		LPC(18:2)	17.83		MS/MS
519.3325	[M+H] ⁺		LPC(18:2)	18.38		MS/MS
517.3168	[M+HCOO] ⁻		LPC(18:3)	15.93		MS/MS
517.3168	[M+H] ⁺		LPC(18:3)	16.37		Putativa
515.3012	[M+H] ⁺		LPC(18:4)	14.81		MS/MS

Tabela B2 - Glicerofosfolipídios ordenados pelo aumento do número de carbono na cadeia de FAs

MM (DB)	Ionização		ID	RT (min)		Confirmação
493.3168	[M+HCOO] ⁻	aumentando nº de carbono ↓	LPC(16:1)	16.47	aumentando Tr ↓	MS/MS
493.3168	[M+H] ⁺		LPC(16:1)	17.04		MS/MS
507.3325	[M+H] ⁺		LPC(17:1)	18.95		MS/MS
521.3481	[M+HCOO] ⁻		LPC(18:1)	20.33		MS/MS
521.3481	[M+H] ⁺		LPC(18:1)	20.89		MS/MS
535.3638	[M+HCOO] ⁻		LPC(19:1)	22.71		MS/MS
549.3795	[M+H] ⁺		LPC(20:1)	24.76		MS/MS
577.4108	[M+H] ⁺		LPC(22:1)	29.02		MS/MS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem.* 2011;286(29):25435-42.
2. Creek DJ, Anderson J, McConville MJ, Barrett MP. Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;181(2):73-84.
3. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6(7):1060-83.
4. Godzien J, Ciborowski M, Martínez-Alcázar MP, Samczuk P, Kretowski A, Barbas C. Rapid and Reliable Identification of Phospholipids for Untargeted Metabolomics with LC-ESI-QTOF-MS/MS. *J Proteome Res.* 2015;14(8):3204-16.
5. Dunn WB, Erban A, Weber RJM, Creek DJ, Brown M, Breitling R, et al. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics.* 2013;9:S44–S66.
6. Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;170(2):55-64.
7. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1811(11):637-47.
8. Weingärtner A, Kemmer G, Müller FD, Zampieri RA, Gonzaga dos Santos M, Schiller J, et al. *Leishmania* promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment. *PLoS One.* 2012;7(8):e42070.

APENDICE C – APROVAÇÃO CEUA

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 05/2011

Prezada Senhora,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa “**Estudo do Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e suas combinações terapêuticas em *Leishmania (L.) chagasi***”, sob coordenação do Pesquisador Científico André Gustavo Tempone Cardoso, foi considerado **APROVADO SEM RESTRIÇÕES**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O projeto supracitado apresenta justificativa para a utilização de animais pautada em metodologia que contribuirá para a formação em pós-graduação, assim como prevê resultados que poderão ser de grande importância à Saúde Pública, apresentando, ainda, análise estatística adequada para o cálculo da quantidade de modelos utilizados.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e para que esta Comissão remeta as informações pertinentes ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Adriano Abbud
Coordenador
CEUA-IAL/Pasteur

Ilma. Sra.
Dra. Adriana Bugno
Presidente do Conselho Técnico Científico
Instituto Adolfo Lutz

C/C
Dr. André Gustavo Tempone Cardoso
Pesquisador Científico
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz