



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Modalidade: Licenciatura)

MONOGRAFIA

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E LIPIDÔMICA EM CEPAS DE *Leishmania*
infantum CIRCULANTES NO MARANHÃO**

Aluna: Thaiza Carvalho de Sousa

SÃO LUÍS

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (Modalidade:
Licenciatura)

MONOGRAFIA

CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA E LIPIDÔMICA EM CEPAS DE *Leishmania*
***infantum* CIRCULANTES NO MARANHÃO**

Orientando: Thaiza Carvalho de Sousa
Orientador: Prof. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima
Coorientadora: Me. Juliana Mendes Sousa

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

SÃO LUÍS
2026

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Sousa, Thaiza Carvalho de.
Caracterização proteômica e lipidômica em cepas de *Leishmania infantum* circulantes no Maranhão / Thaiza Carvalho de Sousa. - 2026.

47 p.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Coorientador(a): Juliana Mendes Sousa.

Monografia (Graduação): Curso de Ciências Biológicas
- Licenciatura, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2026.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Proteínas. 3. Lipídios.
4. Metabolismo. I. Lima, Mayara Ingrid Sousa. II. Sousa, Juliana Mendes. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Modalidade: Licenciatura)
FOLHA DE APROVAÇÃO

THAIZA CARVALHO DE SOUSA
Caracterização proteômica e lipidômica em cepas de *Leishmania infantum*
circulantes no Maranhão

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a. Mayara Ingrid Sousa Lima - Orientadora
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Me. Juliana Mendes Sousa - Coorientadora
Universidade de São Paulo - USP

Prof.^a Dr.^a Claudia Quintino da Rocha – 1º Examinadora
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof.^a Dr. Hermes Ribeiro Luz – 2º Examinador
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar estes agradecimentos destacando a importância dos meus pais, **Jailson** e **Tatiane**, na minha caminhada acadêmica. Sou eternamente grata por me apresentarem aos estudos, por me incentivarem a crescer e a aprender. Pai e mãe, eu sempre me dedicarei a construir a minha melhor versão por vocês. Destaco, especialmente, minha mãe, que representa para mim um verdadeiro pilar. Nem sei como te agradecer, mãe, por tudo: por dedicar-se à maternidade desde o início, abdicando de muitas coisas para acompanhar nosso crescimento, sempre presente, aplaudindo de pé, da primeira fileira, cada passo, cada pequena e grande conquista. Obrigada por tudo, mãe, este trabalho é seu também.

Aos meus irmãos, **Thaiz** e **David**, que representam, acima de tudo, companhia. Thaiz, nós sempre estivemos juntas: viemos a este mundo juntas e seguimos acompanhando cada passo uma da outra de pertinho. Você sabe o quanto significa para mim, e eu sempre vou me sentir sua irmã mais velha (mesmo que, por cinco minutos, eu seja a mais nova). Carrego comigo seu carinho e sua esperança, que nutrem minha alma há 23 anos. Ao meu irmão caçula, que, embora teste bastante a minha paciência, sempre me arranca sorrisos com suas piadas bobas.

Ao meu namorado, amigo e fiel apoiador, **João Matheus**. Obrigada não apenas por acreditar em mim, mas por me incentivar a persistir. Você, sem dúvidas, foi e é o maior presente que tive durante esta graduação. Sou imensamente grata por tudo o que temos construído juntos. Este trabalho é fruto de muita persistência e dedicação, que só consegui manter graças a você, que me incentivou a continuar e a nunca esquecer o potencial que existe dentro de mim. Minha melhor versão é quando estou com você, e eu nunca abrirei mão disso. Guardo com muito carinho uma frase que você me disse em um momento difícil: *“sei que a vida é realmente complexa e somos lançados a situações sem saída, mas vai dar certo, eu sempre estarei aqui”*. E eu sei, amor, que tempestades e terremotos podem, e irão, me atingir, mas você estará comigo, e isso é suficiente para que enfrentemos a vida juntos.

Às minhas queridas e batalhadoras avós, **Conceição**, **Cristina**, e à minha bisavó, **Maria de Lourdes**. Sou profundamente grata por ter vocês ao meu lado; não consigo agradecer-las sem sentir os olhos marejados. Obrigada por sempre me presentear com amor, carinho e alegria. Todos entendem a importância de se ter avós, e eu me sinto privilegiada por ainda tê-las comigo. Vocês são meu porto seguro, onde o caos não alcança e a calma se manifesta como em um verdadeiro lar.

Aos meus tios, **Janilson**, **Washington** e **Luciane**, obrigada por tanto e um pouco mais: por me ensinarem valores da vida e por torcerem pela minha vitória. Ao meu tio Washington, por me apresentar aos estudos e fazer questão de acompanhar esse processo. Ao meu tio Janilson e à minha tia Lu, por serem o maior exemplo de matrimônio e companheirismo que tenho, por respeitarem minhas decisões e, ainda assim, estarem sempre ao meu lado. Admiro muito vocês e sou imensamente feliz por tê-los comigo.

Às minhas melhores amigas, **Larissa** e **Priscylla**, por todo o companheirismo e carinho dedicados a esta linda amizade, que permanece viva desde 2018 e seguirá por muitos e muitos anos. Vocês fazem parte da minha vida, e eu sempre estarei aqui por vocês, assim como sempre estiveram por mim. Obrigada por torcerem e me incentivarem sempre; vocês fazem parte de tudo isso. À minha amiga **Ana Paula**, que me arranca sorrisos e me ajuda a aliviar o peso de encarar a vida com tanta seriedade. Com você, minha vida se torna mais leve e feliz; obrigada por isso. À minha amiga **Maysa**, que, embora hoje esteja distante e não tão próxima como antes, permanece guardada com muito carinho em meu coração. Não poderia deixar de agradecer por tantos anos compartilhando e vivendo momentos importantes ao seu lado. Obrigada por tudo o que vivemos juntas.

Às minhas amigas “Anas”, **Anna Clara** e **Ana Jéssica**, que estiveram ao meu lado e tornaram mais leve o processo árduo que é enfrentar uma graduação. À minha companheira de tudo, Anna Clara, por cada trabalho realizado e por todos os surtos compartilhados; sou muito grata por ter conhecido alguém tão especial quanto você, que me inspira a sempre enxergar o melhor das situações. À minha mãe acadêmica, Ana Jéssica, por me apresentar ao “mundinho” das leishmanias e por me ensinar tudo o que sei hoje sobre técnicas e procedimentos laboratoriais. Obrigada por toda a paciência e carinho ao longo desses anos; sem você, duvido que eu tivesse conseguido chegar até aqui.

À minha excelentíssima e brilhante coorientadora, **Juliana**, que, além de me coorientar durante esses dois anos, foi meu suporte e minha base para que eu não desistisse. Talvez eu nunca tenha dito isso claramente, mas você é o meu maior exemplo no meio acadêmico. Eu te admiro profundamente e me sinto lisonjeada por ter construído este trabalho ao seu lado. Obrigada por suportar meus surtos, as inúmeras perguntas e áudios cheios de dúvidas, e por cada reunião rápida e sem hora marcada, que eram suficientes para tranquilizar. Obrigada por tudo, Ju.

Aos meus colegas do **Programa de Educação Tutorial (PET)**. Sinto que uma das melhores decisões da minha graduação foi ter ingressado no PET; eu jamais seria quem sou hoje academicamente sem essa experiência. Estendo meus agradecimentos a uma pessoa

muito especial: meu tutor e pai científico, **Prof. Lucas Marinho**, que tanto me auxiliou e contribuiu para o meu crescimento profissional. Obrigada por cada conselho e dica compartilhados; você foi essencial para que eu estivesse aqui hoje. Tenho certeza de que o senhor conhece sua importância em nossas vidas, mas faço questão de reiterar o quanto é um profissional admirável, um exemplo que levarei para toda a vida. Obrigada por sua constante disposição em ajudar e contribuir com a nossa formação. Nem sei como lhe agradecer, na verdade. Obrigada por tanto!

Agradeço imensamente ao **LabGeM** e ao meu grupo de pesquisa **Biogen**, sobretudo pelo acolhimento e pelos ensinamentos adquiridos ao longo desses anos. Conheci profissionais e cientistas dedicados e inspiradores, que levarei como exemplo por toda a vida. Agradeço, em especial, à **Santinha**, nossa amada técnica. Obrigada por tudo, San; você é muito especial para mim. Torço sempre por você e para que consiga viver em paz. Você é incrível e uma profissional sem igual.

Aos nossos parceiros do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, **Mário Machado** e **Hebréia Oliveira**. Sou muito grata por todo apoio e parceria que vocês tiveram comigo e com esse projeto, o qual só foi possível graças a ajuda de vocês.

E, por fim, mas não menos importante, à minha orientadora, **Prof.^a Mayara Ingrid**, por cada ensinamento compartilhado, por me proporcionar o desenvolvimento desta pesquisa tão importante e por acreditar no meu potencial enquanto pesquisadora. Fico muito feliz por tê-la neste projeto e por tudo o que você tem proporcionado à pesquisa envolvendo a leishmaniose no estado do Maranhão. Obrigada, professora.

Por fim, finalizo meus agradecimentos dedicando este trabalho a pessoas muito importantes na minha vida e que, infelizmente, não estão mais conosco. Dedico-o ao meu avô, **João Batista**, que certamente estaria muito orgulhoso, e ao meu bisavô, **Carlos Augusto**, que me confortava em cada abraço. Este trabalho é dedicado a vocês.

“Se você se empenhar o suficiente pode fazer qualquer história resultar”. —

Saul Goodman

RESUMO

A leishmaniose está incluída em um grupo de zoonoses tropicais e subtropicais causadas por parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*. A doença apresenta diferentes manifestações clínicas, como a leishmaniose visceral (LV), causada nas Américas pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* e caracterizada pela disseminação do parasito através do sistema reticuloendotelial do hospedeiro, acometendo, de maneira sistêmica, fígado, baço, medula e linfonodos. Essa ampla variabilidade de respostas clínicas ocorre devido, entre outros fatores, à diversidade populacional de parasitos, sob essa perspectiva, torna-se crucial a caracterização dos parasitos de áreas endêmicas. Para isso, ferramentas pós-genômicas, como a proteômica e lipidômica, oferecem interessantes possibilidades de análise e compreensão das vias bioquímicas e processos metabólicos possivelmente envolvidos na diferenciação, virulência, replicação, resistência a fármacos e patogenicidade. Diante desses aspectos, este trabalho teve por objetivo analisar o perfil proteômico e lipidômico de três isolados clínicos de *L. (L.) infantum* obtidos de pacientes provenientes do estado do Maranhão, uma área geográfica de alta endemia para LV. O conteúdo total de proteínas foi acessado por meio do extrato proteico total de 1×10^8 de parasitos promastigotas, submetido a digestão e purificação seguida da técnica de cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução, ao passo que para os lipídios foi utilizado cromatografia gasosa. Nessa caracterização, foram encontradas 12 proteínas e 5 lipídios diferencialmente expressos nos isolados clínicos quando comparados à uma cepa de referência (controle). Os resultados mostraram que a cepa de referência apresentou um perfil marcadamente distinto, com alto grau de dissimilaridade em relação aos isolados clínicos. As classes de proteínas encontradas estão envolvidas na metaciclo-gênese, diferenciação intracelular e resposta ao estresse térmico, oxidativo e químico; os lipídios, por sua vez, estão relacionados à estabilidade da membrana, metabolismo energético e regulação redox. Assim, os resultados indicam que os isolados clínicos possuem características metabólicas específicas, provavelmente devido às pressões seletivas ou adaptações ambientais, que por consequência podem explicar diferentes padrões de virulência ou resistência medicamentosa.

Palavras-Chave: leishmaniose visceral; proteínas; lipídios; metabolismo

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2.REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 O Gênero <i>Leishmania</i> e o ciclo de vida do parasito	14
2.2 Leishmaniose visceral	15
2.2.1 <i>Epidemiologia</i>	15
2.2.2 <i>Tratamento</i>	17
2.3 Abordagens pós-genômicas e estudos envolvendo <i>Leishmania</i> spp.	17
2.3.1 <i>Biologia do parasito e o papel das ômicas nas leishmanioses</i>	17
2.3.2 <i>Proteômica</i>	18
2.3.3 <i>Lipidômica</i>	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 Obtenção dos isolados clínicos	22
4.2 Extração de proteínas	22
4.3 Digestão e purificação de proteínas	23
4.4 Extração de lipídios	23
4.5 Espectrometria de massa para proteínas	23
4.6 Espectrometria de massa para lipídios	24
4.7 Estatística e tratamento dos dados obtidos por MS	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Análise do proteoma	25
5.1.1 <i>Análise de significância</i>	25
5.1.2 <i>Clusterização hierárquica</i>	26
5.1.3 <i>Papel biológico das proteínas com expressão diferencial</i>	27
5.2 Análise do lipidoma	30
5.2.1 <i>Análise de significância</i>	30
5.2.2 <i>Comparação de perfis lipidômicos</i>	32
5.2.3 <i>Papel biológico dos lipídios com expressão diferencial</i>	34
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose representa um grupo de doenças zoonóticas tropicais e subtropicais, causadas por parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae), transmitidos pela picada de fêmeas de flebotomíneos, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo), embora outros gêneros também possam estar envolvidos na transmissão (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). As leishmanioses são doenças com distribuição mundial, apresentando endemicidade em cerca de 99 países pertencentes a 4 regiões ecoepidemiológicas, sendo estas Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático (Ruiz-Postigo *et al.*, 2023).

De acordo com a OMS, a leishmaniose pode se manifestar em três formas principais: a leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), sendo essa última caracterizada por representar a forma clínica mais grave das leishmanioses (WHO, 2023; Ruiz-Postigo *et al.*, 2023). Cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas, enquanto 350 milhões estão em risco de contrair alguma forma de leishmaniose. Estima-se que, a cada ano, ocorram 212.000 novos casos da doença (Thomaz-Soccol *et al.*, 2018; OMS, 2023).

A LV, causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* nas Américas e pelo *Leishmania donovani* na Europa, África e Ásia, é caracterizada pela disseminação do parasito através do sistema reticuloendotelial do hospedeiro, acometendo de maneira sistêmica, portanto, fígado, baço, medula e linfonodos. Por tais motivos, é o tipo mais grave de leishmaniose, sendo uma doença crônica e debilitante e, se não tratada adequadamente, pode evoluir a óbito, como em 90% dos casos (Alvar *et al.*, 2012).

A quimioterapia representa, ainda hoje, uma das ferramentas terapêuticas mais importantes para o controle da doença, sendo constituída, no Brasil, principalmente pelo antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e a anfotericina B (Ambisome[®]) nas formulações Lipossomal (Abelcet[®]) ou Desoxicolato de Anfotericina B (Fungizone[®]) (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Embora essas opções farmacológicas sejam comprovadamente eficazes, fatores como a toxicidade e a biodisponibilidade podem limitar bastante o tratamento. Além disso, estes tratamentos apresentam ocorrência de falhas terapêuticas e recidivas clínicas nos pacientes, que podem ter relação direta e multifatorial com a baixa adesão ao tratamento (e/ou tratamento inadequado) além de fatores como estado imunológico e variáveis clínicas do hospedeiro (Vanaerschot *et al.*, 2014; Bamorovat *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que a forma de administração desses fármacos representa um obstáculo adicional ao tratamento, uma vez que não possuem absorção oral e devem ser aplicados exclusivamente em unidades de saúde

ou hospitais, por via endovenosa ou intralesional. Frequentemente, os locais que dispõem do medicamento não estão situados no mesmo município de residência do paciente, o que compromete a adesão e a continuidade do tratamento. Atualmente, a Miltefosina é a única droga de administração oral disponível para o tratamento da leishmaniose, sendo aprovada no Brasil pelo SUS em 2018 para o tratamento somente de LT (Brasil, 2018; Pálic; Beijnen; Dorlo, 2022).

Fatores como a resistência do parasito aos medicamentos convencionais podem interferir diretamente no desfecho clínico. Esse fenômeno pode ser atribuído a diversos mecanismos, incluindo alterações no DNA ou na expressão gênica, modificações em vias bioquímicas envolvidas na entrada, no metabolismo e no transporte de fármacos, bem como em vias relacionadas à morte celular (Santos et al., 2023; Khadem Erfan et al., 2013). A heterogeneidade na resposta aos fármacos está diretamente relacionada à diversidade populacional de patógenos, frequentemente observada em doenças infecciosas, o que constitui um desafio para os profissionais da saúde, os quais já relatam, através da literatura, diferenças significativas na manifestação e gravidade de determinadas doenças, além de resposta variável ao tratamento (Tkindt *et al.*, 2010). Com base nisso, ensaios de sensibilidade fenotípica e caracterização de isolados clínicos de *L. (L) infantum* representam, sobretudo, importantes instrumentos de delineamento terapêutico, podendo resultar em dados significativos acerca da resistência do parasito aos medicamentos (Garin *et al.*, 2001; Bamorovat *et al.*, 2018).

Sob essa perspectiva, para garantir o sucesso das medidas preventivas contra a leishmaniose, é essencial compreender o complexo equilíbrio entre hospedeiro, patógeno e vetor, explorando suas interações em nível molecular. As abordagens ômicas emergem como ferramentas vitais, fornecendo *insights* sobre as dinâmicas entre parasitos, hospedeiros vertebrados, e os vetores flebotômicos, possibilitando a caracterização de parasitos de áreas endêmicas de infecção, como o Maranhão (Cantacessi *et al.*, 2015). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa já isolaram material biológico de pacientes com diferentes desfechos clínicos (Santos, 2022), o que reforça a relevância de caracterizar biologicamente esses parasitos. A partir dessas estratégias multiômicas (junção de duas ou mais ciências ômicas, como proteômica e lipidômica) é possível realizar análises sistêmicas abrangentes, abrindo novas perspectivas para o estudo de doenças e a biologia de sistemas como um todo (Khan *et al.*, 2019).

Nesse contexto, análises a níveis genômico e pós-genômico (transcriptômico, proteômico, metabolômico e lipidômico) envolvendo espécies de *Leishmania* têm sido

cruciais na compreensão da plasticidade genética e das diferenças moleculares entre espécies/cepas, as quais podem estar associadas à resistência a medicamentos e à falha do tratamento (Cruz; Freitas-Castro, 2019; Zheng *et al.*, 2020). Através da proteômica, estudos têm revelado proteínas diferencialmente expressas entre formas do ciclo de vida, bem como entre diferentes espécies e até mesmo de cepas da mesma espécie, destacando vias metabólicas específicas, fatores de virulência e possíveis alvos terapêuticos (Coelho *et al.*, 2012; Rezende *et al.*, 2017; Pinho *et al.*, 2020). Enquanto a lipidômica tem contribuído para a caracterização de perfis lipídicos relacionados à modulação da membrana e ao metabolismo energético (Ribeiro *et al.*, 2024). Essas técnicas integradas têm permitido o mapeamento funcional de componentes celulares e metabólicos do parasito, aprofundando o entendimento de sua biologia, o que possibilita a investigação de novas estratégias de combate à leishmaniose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Gênero *Leishmania* e o ciclo de vida do parasito

O gênero *Leishmania* é composto por protozoários parasitas flagelados unicelulares, pertencentes à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida). Esses parasitos apresentam um ciclo de vida heteroxênico digenético, alternando entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. As duas principais formas evolutivas do parasito são as promastigotas, geralmente são flageladas, livres ou aderidas ao interior do trato digestivo do vetor e as amastigotas, em sua maioria com flagelo retraído, encontradas no interior das células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros mamíferos infectados (McNicoll *et al.*, 2006).

A classificação taxonômica de *Leishmania* divide o gênero em três subgêneros: *Viannia*, *Leishmania* e *Mundinia*. Essa divisão é fundamentada em características biológicas, bioquímicas e moleculares dos protozoários, levando em consideração ainda as linhas evolutivas e apoiado por métodos taxonômicos tradicionais e cladísticos (Shaw, 1994; Auwera; Dujardin, 2015). Os parasitas do subgênero *Viannia* se desenvolvem inicialmente no intestino posterior do flebotômíneo, migrando subsequentemente para o intestino médio e anterior. Em contraste, os parasitas do subgênero *Leishmania* se desenvolvem exclusivamente no intestino médio e anterior do vetor (Shaw, 1994; Akhoundi *et al.*, 2016). O subgênero *Mundinia*, criado em 2018, abrange espécies de *Leishmania* responsáveis por doenças humanas e animais previamente reunidas no complexo *L. enriettii*, que inclui *L. martiniquensis* (Espinosa *et al.*, 2018; Sereno, 2019).

De um modo geral, a transmissão do protozoário ocorre através da picada de fêmeas de flebotômíneos (ordem Diptera, família Psychodidae), pertencentes principalmente aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia*, principal gênero envolvido na transmissão de *L. infantum*, no Novo Mundo (Américas). Esses insetos se alimentam alternadamente de um reservatório mamífero infectado e de um hospedeiro vertebrado suscetível (Ready, 2013; Neuber, 2008). A infecção do vetor acontece durante a hematofagia, quando a fêmea do flebotômíneo ingere, junto com o sangue ou líquido intersticial do hospedeiro, macrófagos contendo as formas amastigotas do parasito (Neuber, 2008; Sacks; Perkins, 1984). No trato intestinal do inseto, os macrófagos se rompem, liberando as amastigotas, que se diferenciam em promastigotas procíclicas, forma com intensa atividade proliferativa. Após alguns dias, os protozoários migram para o esôfago e a faringe do vetor, onde se aderem ao epitélio pelo flagelo até se transformarem em

promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado e obstruem o canal alimentar do inseto (Figura 1) (Sacks; Perkins, 1984; Besteiro *et al.*, 2007).

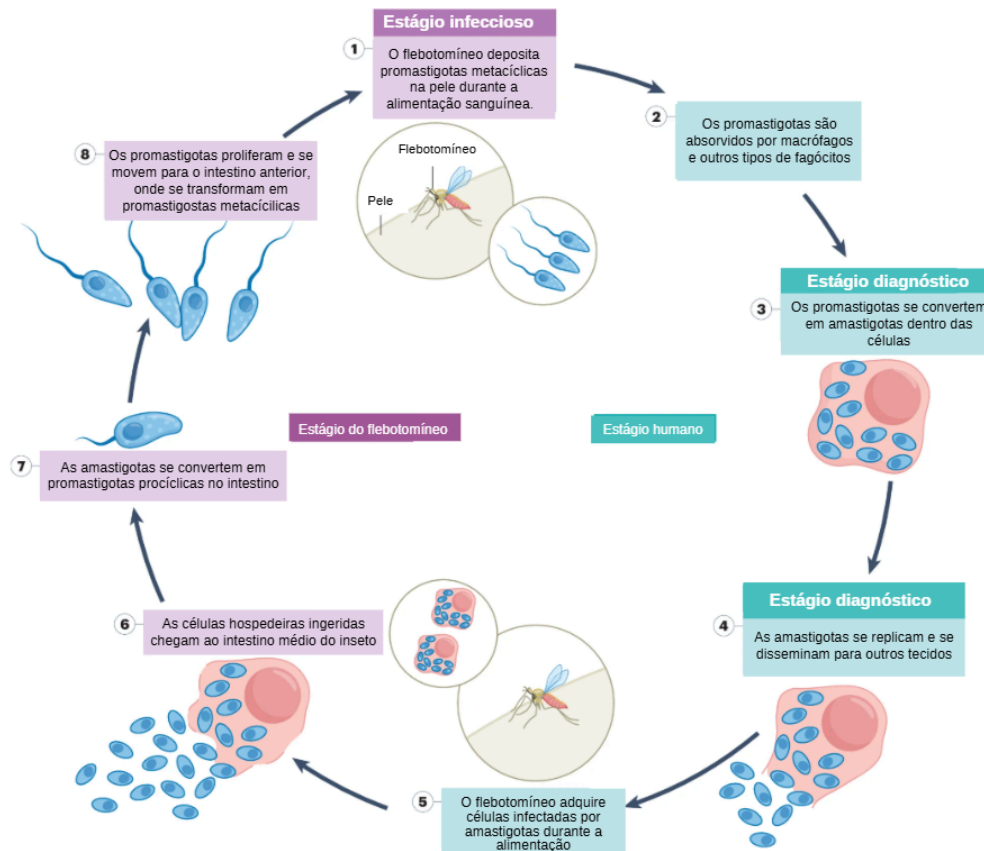


Figura 1. Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: Adaptado de Pareyn *et al.* (2025).

A *Leishmania* spp. é novamente transmitida durante o processo de hematofagia do inseto vetor, quando a fêmea do flebotomíneo infectada regurgita na derme do hospedeiro vertebrado, no sítio de ocorrência do repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas (McNeely *et al.*, 1990). Eventualmente, as promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos e principalmente por macrófagos. Dentro destas células os parasitos assumem a forma amastigota (com flagelo reduzido e interno) que, uma vez que atingem sucesso na infecção, multiplicam no vacúolo parasitóforo e irão infectar novas células (Spath *et al.*, 2000).

2.2 Leishmaniose visceral

2.2.1 Epidemiologia

A leishmaniose visceral é uma das síndromes clínicas da leishmaniose, causada principalmente por *L. donovani* e *L. infantum*, sendo esta última também chamada de *L. chagasi* na América do Sul. No continente asiático, em países como Índia, Bangladesh e Nepal, e no leste da África, especialmente no Sudão, Etiópia, Quênia e Somália, a LV é causada por *L. donovani*. Já *L. infantum* provoca LV na região do Mediterrâneo, no Oriente

Médio, Afeganistão, Irã, Paquistão e Brasil, havendo poucos casos notificados na América Latina e Central (excluindo o Brasil) (van Griensven; Diro, 2012; Burza; Croft; Boelaert, 2018; Scarpini *et al.*, 2022).

Cerca de 80 países são considerados endêmicos para a leishmaniose visceral. Na região das Américas, os 13 países com perfil de endemicidade apresentam uma taxa de notificação de 100% à Organização Mundial da Saúde (OMS) (Figura 2) (Ruiz-Postigo *et al.*, 2023). O Brasil está em segundo lugar dentre os três principais focos ecoepidemiológicos para LV, representando 12% dos novos casos no ano de 2023. Quatro países concentram 60% dos casos de LV no âmbito mundial: Brasil, Etiópia, Quênia e Sudão (PAHO, 2024).

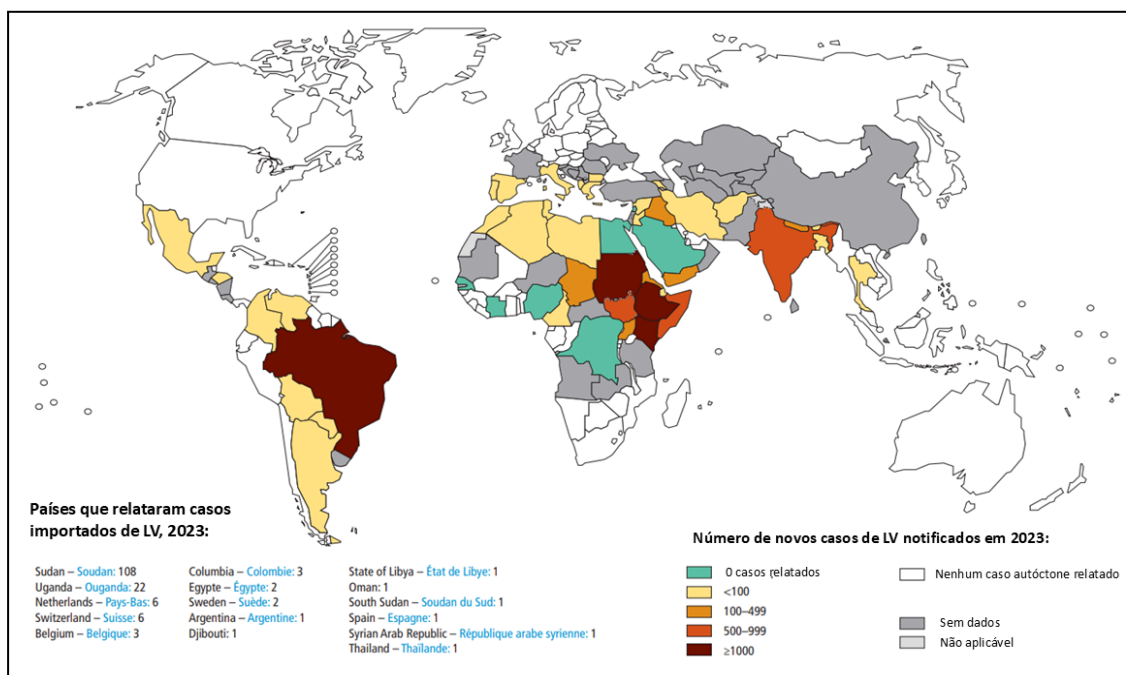


Figura 2. Situação de endemicidade da LV em todo o mundo (2023). Fonte: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), World Health Organization, Adaptado (2024).

No Brasil, durante os anos de 2013 a 2022 foram notificados 31.473 casos de LV, sendo a região Nordeste responsável pelo maior número desses casos, totalizando 17.783. Essa mesma região apresenta a maior taxa de mortalidade para a LV no território brasileiro, com aproximadamente 1.400 óbitos durante o período analisado (Negreiros *et al.*, 2024). Os registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde apontam que foram 7428 casos de LV entre 2007 e 2024 no estado do Maranhão, sendo este, portanto, responsável pelo maior número de casos durante esse período. O número de óbitos também sofreu um importante aumento, entre 2007 e 2024, foram um total 506 óbitos somente no estado do Maranhão durante esse período (Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net).

2.2.2 Tratamento

O tratamento para leishmaniose ainda é bastante limitado e difícil, sendo a quimioterapia a única opção atualmente. Os medicamentos disponíveis dividem-se em duas linhas: os antimoniais, sendo estes o estibogluconato de sódio- Pentostam[®] e o antimoniato de meglumina - Glucantime[®], e os não-antimoniais, incluindo a Pentamidina, Anfotericina B, Paramomicina e Miltefosine (Frézard *et al.*, 2001; Scarpini *et al.*, 2022). No Brasil, o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) é a droga de primeira escolha, sendo utilizado e indicado pelo Ministério da Saúde tanto para lesões cutâneas quanto para a forma visceral. No entanto, esse medicamento apresenta alta toxicidade, dificuldades durante a administração e alto índice de recidivas (Martinez e Marr, 1992; Ministério da Saúde, 2022). O tratamento para LV no Brasil, além do antimoniato de meglumina, conta com a Anfotericina B lipossomal, opção para gestantes, indivíduos imunossuprimidos e pacientes que além de contraindicações e manifestação de toxicidade, não tenham sido responsivos ao Glucantime[®]. Esse medicamento existe em quatro formulações distintas, sendo elas: Anfotericina B desoxicolato, Anfotericina B lipossomal, Anfotericina de dispersão de colesterol e Anfotericina B complexo lipídico (Kariyawasam *et al.*, 2019). Embora essa opção seja altamente eficaz, ainda é tóxico na formulação livre de desoxicolato e apresenta um alto custo de produção (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Importante ressaltar que, em relação à linha dos não-antimoniais, existe ainda uma outra opção, a Miltefosina, a qual foi aprovada em 2018 para tratamento da Leishmaniose cutânea (Brasil, 2018).

2.3 Abordagens pós-genômicas e estudos envolvendo *Leishmania* spp.

2.3.1 A Biologia do parasito e o papel das ômicas no estudo da leishmaniose

A biologia parasitária vai muito além da abordagem genética, abrangendo múltiplos conjuntos de dados 'ômicos' para desvendar as redes moleculares subjacentes às características das doenças (Tang *et al.*, 2009). A nível molecular, as interações hospedeiro-patógeno ocorrem ao longo de todo o ciclo de replicação do patógeno, e, embora existam diferentes estratégias replicativas, a maioria dos agentes infecciosos necessitam entrar na célula hospedeira e, para garantir sua replicação e sobrevivência, aproveitar componentes celulares, como proteínas, metabólitos e lipídios (Beltran *et al.*, 2017).

Os parasitas causadores das leishmanioses possuem ciclos de vida complexos e adotam diversas estratégias para garantir a infecção, sobrevivência e transmissão, refletindo uma ampla diversidade biológica. Essa diversidade se manifesta também na estrutura

genômica e nas estratégias de transmissão genética, influenciando as estruturas populacionais e desafiando o desenvolvimento de métodos de controle. Nesse contexto, estudos genômicos integrados a dados de transcriptoma, proteoma, metaboloma e lipidoma têm revelado variações moleculares entre espécies e estágios de desenvolvimento e eventualmente em diferentes cepas da mesma espécie, contribuindo para a compreensão das diferenças em infectividade e patogenicidade (Buscaglia; Kissinger; Agüero, 2015).

Mesmo dentro de uma única espécie de *Leishmania* podem ocorrer desafios clínicos relevantes, pois esta pode estar associada a uma ampla gama de manifestações e formas clínicas. A gravidade da doença varia consideravelmente entre os pacientes, sendo frequentes respostas terapêuticas variáveis ou até a ausência de resposta aos tratamentos atualmente disponíveis. Esse quadro clínico diverso é resultado de uma interação complexa entre diversos fatores, incluindo variações no hospedeiro, no parasito, no vetor e no ambiente (Dujardin, 2009). Nesse contexto, as abordagens pós-genômicas, tecnologias de análise em larga escala, tem permitido a descrição molecular dos principais agentes da vida, além de fornecer informações biológicas, tais como metabolismo, fisiologia, biologia celular e patologia. Diante disso, torna-se essencial aprofundar a caracterização molecular da diversidade do parasito e compreender sua biologia (Alves-Ferreira *et al.*, 2014; Weissenbach, 2016), para alcançar esse objetivo, estudos como o sequenciamento completo de genomas, análises transcriptômicas e investigações proteômicas, metabolômicas e lipidômicas em larga escala demonstram ser uma alternativa moderna promissora.

2.3.2 Proteômica

A proteômica consiste em uma análise em larga escala das proteínas presentes em um sistema biológico, incluindo sua identificação, quantificação, interações e modificações pós-traducionais (Pandey; Mann, 2000; Chambers, 2000). O proteoma é o conjunto completo de proteínas expressas por uma célula e revela a maior parte das informações funcionais dos genes (Pandey; Mann, 2000). Nesse sentido, essa estratégia corresponde a uma das metodologias mais significativas na compreensão da função dos genes, pois explicita o estado fisiológico do organismo (Lander *et al.*, 2001). Atualmente, a proteômica abrange uma série de técnicas sofisticadas e integralmente confiáveis, possibilitando a identificação de marcadores proteicos associados a doenças para auxiliar no diagnóstico ou prognóstico e selecionar alvos potenciais para terapias medicamentosas específicas (McArdle; Menikou, 2021). Esse tipo de abordagem pós-genômica tem fornecido informações valiosas sobre a biologia envolvida na interação entre *Leishmania* e o hospedeiro, possibilitando o

desenvolvimento de novas abordagens imunológicas e quimioterápicas (Peixoto-Capelli *et al.*, 2019).

A proteômica tem sido aplicada ao estudo da leishmaniose com diversos objetivos, sendo os principais: elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nos fenômenos de resistência da *Leishmania* a medicamentos; compreender as adaptações sofridas pelo parasito em seus distintos estágios evolutivos (promastigotas procíclicas e metacíclicas e amastigotas) a diferentes condições fisiológicas do ambiente; analisar e caracterizar o proteoma das frações celulares (como membranas, organelas e o citoplasma) e de vesículas extracelulares, estruturas envolvidas na comunicação celular e modulação do sistema imunológico do hospedeiro; identificar proteínas associadas às diferentes formas clínicas, auxiliando na compreensão das variações fenotípicas entre isolados de *Leishmania*; descobrir antígenos protéicos potenciais para o desenvolvimento de vacinas; ou ainda caracterizar biologicamente uma população de parasitos ou mesmo diferentes cepas de uma mesma espécie (Biyani; Madhubala, 2012; Jesus; Mesquita-Rodrigues; Cuervo, 2014; Sundar; Singh, 2018; Peixoto-Capelli *et al.*, 2019). Em suma, a aplicação da proteômica no estudo da leishmaniose é fundamental para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos biológicos e moleculares do parasito (Jesus; Mesquita-Rodrigues; Cuervo, 2014; Sundar; Singh, 2018; Peixoto-Capelli *et al.*, 2019). Com base nos registros apresentados, é possível observar que a proteômica possui grande potencial para uma ampla gama de aplicações no estudo de *Leishmania*.

2.3.3 Lipidômica

A lipidômica constitui uma importante ferramenta de caracterização e quantificação de moléculas lipídicas em células e fluidos biológicos, além de estar estritamente relacionada a abordagens genômicas e proteômicas (Postle, 2012). Os lipídios correspondem a uma grande família de compostos geralmente solúveis em solventes orgânicos e estruturalmente não homogêneos (Gross; Han, 2011). Essas moléculas são os principais constituintes das membranas biológicas, responsáveis por desempenhar várias funções biológicas e estruturais, tais como conversão de energia, transporte de substâncias, reconhecimento e transdução de sinais, crescimento e diferenciação (Meer; Voelker; Feigenson, 2008). O papel dos lipídios na relação hospedeiro-patógeno inclui processos como constituintes estruturais do hospedeiro, reconhecimento do hospedeiro, transferência intracelular e homeostase de energia e recursos durante a duplicação de patógeno (Koriem, 2017).

A combinação de técnicas lipidômicas com abordagens genômicas ou pós-genômicas tem sido aplicada em estudos associados à infecção por *Leishmania*, que podem ser usados

para diagnóstico, prognóstico ou monitoramento da resposta ao tratamento (Malta-Santos *et al.*, 2020). Além disso, a lipidômica pode ajudar na identificação de lipídios específicos envolvidos nos processos de replicação, diferenciação ou patogenicidade da *Leishmania*, o que pode levar à descoberta de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de drogas mais eficazes contra a doença (Negrão *et al.*, 2017; Biagiotti *et al.*, 2017). A partir dessa abordagem é possível identificar bioassinaturas influenciadas por mediadores lipídicos e prever, com precisão, o fracasso do tratamento em pacientes com LC (Malta-Santos *et al.*, 2020).

A análise do perfil lipidômico pode ser usada, ainda, para investigar se a resistência a drogas leishmanicidas está associada a alterações no perfil lipídico do parasito, o que de certa forma pode auxiliar a identificar mecanismos de resistência e a desenvolver estratégias para superar esse problema (Aquino *et al.*, 2022). Um estudo desenvolvido por Kim *et al.* (2024) avaliaram uma remodelação significativa dos lipídios em cepas sob pressão de medicamentos, o que sugeriria potenciais mecanismos associados à resistência. Em suma, a caracterização do perfil lipídico de isolados clínicos de *Leishmania* é essencial para uma melhor compreensão da biologia do parasito.

Diante das diversas possibilidades oferecidas pelas abordagens pós-genômicas, propomos este trabalho pioneiro, visando caracterizar o perfil proteômico e lipidômico de isolados clínicos de *L. (L.) infantum* obtidos de uma área de alta endemia para leishmaniose visceral.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o perfil proteômico e lipidômico de isolados clínicos de *L. (L.) infantum* obtidos de pacientes maranhenses com uma cepa referência para caracterizar moléculas relacionadas a vias de metabolismo adaptativo do parasito.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o conjunto de proteínas e lipídios presentes em isolados clínicos de *L. (L.) infantum*, a fim de estabelecer o perfil proteômico e lipidômico;
- b) Comparar os perfis moleculares entre os isolados clínicos e a cepa de referência, visando reconhecer proteínas e lipídios diferencialmente expressos associados a processos de adaptação metabólica do parasito.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção de isolados clínicos

Os três isolados foram obtidos em estudos anteriores do grupo, a partir da aspiração da medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral. A coleta do material biológico foi realizada por um médico infectologista especializado, durante o procedimento de rotina para confirmação laboratorial da presença de parasitas, em um Centro de Referência em Doenças Infectocontagiosas, em São Luís, MA. Tais isolados estão disponíveis no biorrepositório do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM). A coleta desse material biológico está regulamentada, com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (nº 2.793.599), bem como devidamente registrados no SisGen. Os parasitos foram isolados através de diluição seriada do aspirado em placa de 24 poços contendo meio de cultura Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco®), 10 U/mL de penicilina (Gibco®) e 10µg/mL de estreptomicina (Gibco®). Após a observação da migração de parasitas do meio intra para o extracelular, estes foram repicados para garrafas de cultura de células (25 cm²).

4.2 Extração de proteínas de células de *Leishmania infantum*

A extração de metabólitos e a separação de proteínas de culturas promastigotas de *L. (L.) infantum* foi realizada segundo metodologia previamente descrita por Tkindt *et al.* (2010). De cada amostra foram utilizados 1×10^8 parasitas, contados previamente na câmara de Neubauer. As formas promastigotas foram submetidas à temperatura de 0°C em recipiente contendo gelo e etanol e posteriormente lavadas três vezes com 1mL de tampão fosfato salino (PBS; pH 7.4 – Invitrogen) a 0°C por centrifugação (15.557 rpm, 0°C, 3 min). A ruptura das células para extração dos metabólitos foi executada através da lavagem do pellet em 1 mL de solução clorofórmio/metanol/água 20/60/20 (v/v/v) durante 1h em Thermomixer (1400 rpm 4°C). Em seguida, os componentes celulares foram separados por centrifugação (15.557 rpm, 0°C, 3 min). O sobrenadante contendo metabólitos foi coletado e seco em um concentrador de amostras SpeedVac (Thermo Scientific Savant SpeedVac™ Vacuum Concentrators) por 2h, a análise do metaboloma não está inclusa neste trabalho. O debris celular obtido após a última centrifugação foi armazenado a -4°C para ser submetido a posterior análise proteômica. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C e sua solubilização em metanol de grau espectroscópico (700 uL) foi feita próximo ao momento da injeção, seguida por uma filtragem em filtro 0.22 µm, diretamente em vial de vidro específico para o espectrômetro de massa.

4.3 Digestão e purificação de proteínas

100µg das proteínas obtidas foram submetidas à digestão com tripsina (quantificação por método Bradford). O agente surfactante RapiGest SF (Waters) foi usado para melhorar a eficiência da digestão enzimática. Após essa etapa, as amostras foram reduzidas com Ditiotretitol (Sigma-Aldrich) e alquiladas com Iodoacetamida (Sigma-Aldrich), em seguida submetidas à ação da tripsina (Promega) à 37°C por 16 horas. A ação da enzima foi interrompida pela adição de solução de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich) 0,5%. Os peptídeos obtidos foram então submetidos à purificação por extração em fase sólida (SPE) em ponteira de fase reversa C18 Bond Elut OMIX® (Agilent Technologies). Após a secagem em concentrador de amostras, a amostra foi solubilizada em TFA 0,1% e acondicionada em vial específica para injeção no Espectrômetro de Massa.

4.4 Extração de lipídios de células de *Leishmania infantum*

A extração de lipídios das culturas promastigotas de *Leishmania infantum* seguiram metodologia previamente descrita por Tkindt *et al.* (2010). Após a lavagem e ruptura das células em uma solução de extração, os lipídios extraídos foram separados por centrifugação. O sobrenadante contendo lipídios, especificamente a fase de clorofórmio, foi separado e levado a um concentrador de amostras para secagem do solvente. Após, o armazenamento foi feito em freezer a -20°C. A solubilização das amostras foi feita próximo ao momento da injeção em metanol, seguida por uma filtragem em filtro 0.22 µm, diretamente em vial de vidro específico para o espectrômetro de massa.

4.5 Espectrometria de massa para proteínas

As análises de Espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Agilent Infinity 1260), acoplado a Espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de ionização por eletrospray e analisador Q-TOF (Agilent 6520B Q-TOF), alocado no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os parâmetros cromatográficos para análise foram: coluna Agilent modelo AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, a fase móvel: água (A) e acetonitrila (B) ambas acidificadas com ácido fórmico (0,1% vv-1), com o gradiente: 2% de B (0 min), 2% de B (10 min), 15% de B (40 min), 50% de B (150 min), 70% de B (200 min), 98% de B (220 min), 98% de B (300 min), 100% de B (301 min) e 100% de B (400 min), em um fluxo de 400 µL/min. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 45 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 325 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4KV

4.6 Espectrometria de massa para lipídios

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS) da Agilent Technologies 7890B, equipado com amostrador automático PAL RSI 85, alocado no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os parâmetros cromatográficos para análise de lipídios foram: Coluna DB-5 (30 m x 0,22 mm x 0,1 μ m) com fluxo de 1 mL min⁻¹, no modo monitoramento de íon selecionado (SCAN) e rampa de aquecimento de 60°C - 250°C em 40min. Foi injetado 1 μ L de cada amostra. A detecção foi realizada por ionização por impacto eletrônico (70 eV), utilizando um analisador quadrupolar simples.

4.7 Estatística e tratamento dos dados obtidos por MS

Tanto para as proteínas quanto para os lipídios foi utilizado o software *Mass Profiler Professional-MPP* (Agilent Technologies) para alinhamento e normalização dos espectros de massa obtidos. A identificação das proteínas foi realizada levando em consideração a massa de alta resolução (erro com a massa exata menor que 10 ppm) e os espectros de massa/massa (MS/MS), sendo estes dados cruzados com banco de dados. A análise foi feita no programa *Spectrum Mill MS Proteomics Workbench* (Agilent Technologies) usando banco de dados UniProt, disponível online (<https://www.uniprot.org/>). Os lipídios foram filtrados utilizando filtro de abundância mínima de 10.000 contagens e filtro de frequência de 100% (apenas os compostos encontrados em 100% das amostras biológicas dentro de pelo menos um grupo foram considerados), $p < 0,05$ e fold change ≥ 2 . As análises estatísticas dos lipídios foram realizadas no programa *MassHunter Profiler Professional 15.1*, e a identificação *MassHunter Qualitative* com as bibliotecas NIST 2023.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados neste trabalho 03 isolados clínicos de pacientes com leishmaniose visceral, todos coletados em momento anterior ao início de qualquer tratamento e identificados previamente como *L. (L.) infantum*, sendo eles: MHOM/BR/PV09-MA; MHOM/BR/PV020-MA; MHOM/BR/PV21-MA (Torres, 2021; Sousa, 2021). Estes isolados foram comparados com uma cepa de referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75).

5.1 Análise do proteoma

5.1.1 Análise de significância

No proteoma, foram identificadas 12 proteínas diferencialmente expressas (Tabela 1). A comparação entre os isolados clínicos e a cepa de referência demonstrou que as proteínas (1), (3), (4) e (8) apresentaram abundância consistentemente aumentada nos isolados clínicos. A proteína (6) também exibiu aumento de abundância em parte dos isolados, com valores semelhantes ou superiores aos observados na cepa de referência. Esses resultados indicam um padrão de aumento da abundância proteica nos isolados clínicos em comparação com a cepa de referência. Os isolados apresentaram, aparentemente, uma taxa de tradução mais elevada, possivelmente devido a replicação mais intensa em comparação com a cepa de referência. Essa diferença metabólica pode estar associada a um processo de adaptação dos isolados clínicos ao ambiente de cultivo *in vitro*.

Tabela 1. Abundância das proteínas diferencialmente expressas nos isolados e na cepa.

Identificação	Proteínas	Abundância das proteínas			
		Isolados clínicos			Cepa de referência
		PV09	PV20	PV21	PP75
1	Cadeia alfa de tubulina	17,65228	18,65228	18,72733	16,30563
2	Proteína 1 mitocondrial relacionada ao choque térmico 70 putativa	15,68551	15,90595	17,23257	16,90829
3	Subunidade beta da ATP sintase	16,11553	14,25118	15,04899	12,92740
4	Helicase de RNA dependente de ATP	15,14370	14,63820	14,90124	14,00140
5	Translocase ADP/ATP	13,90124	17,33210	16,28048	17,14569
6	Proteína da família AhpC/TSA	16,54924	14,22128	17,25118	16,16545
7	Proteína eS1 da subunidade ribossômica pequena	0	13,538673	15,67176	15,68825
8	Proteína 1 relacionada ao choque	16,30919	16,30919	13,41204	12,72067

térnico 70, mitocondrial, putativa					
9	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5A	13,92925	14,99258	14,30919	14,98815
10	Proteína não caracterizada	16,54924	15,92230	15,30919	17,49716
11	Histona H2B	15,67176	15,66622	14,92925	16,86060
12	Proteína ribossômica 60S L5, putativa	15,87747	11,17990	17,20419	16,0254

*Para facilitar a organização gráfica dos dados, foram atribuídos números às proteínas diferencialmente expressas.

5.1.2 Clusterização hierárquica

Com os valores normalizados de intensidade das 12 proteínas diferenciais foi construído um *cluster heatmap* agrupando as cepas de acordo com a similaridade dos perfis encontrados. Os 4 grupos foram clusterizados em 3 níveis (Figura 3). O primeiro nível agrupou o isolado MHOM/BR/PV21-MA e a cepa de referência MHOM/BR/74/PP75 com menor grau de dissimilaridade. O segundo nível agrupou o isolado MHOM/BR/PV020-MA e o terceiro nível inclui o isolado MHOM/BR/PV09-MA. Essa variação sugere que os isolados clínicos provavelmente exibem perfis de expressão proteica moldados pelas pressões ambientais e seletivas encontradas em um ambiente de infecção ativa. Essa variabilidade na expressão proteica é consistente com o que foi relatado por Zheng *et al.* (2020), os quais demonstraram que alterações genéticas (como variação no número de cópias e mutações pontuais) e variabilidade na expressão proteica entre diferentes cepas de *Leishmania* estão potencialmente moldadas pelas pressões seletivas do ambiente de infecção.

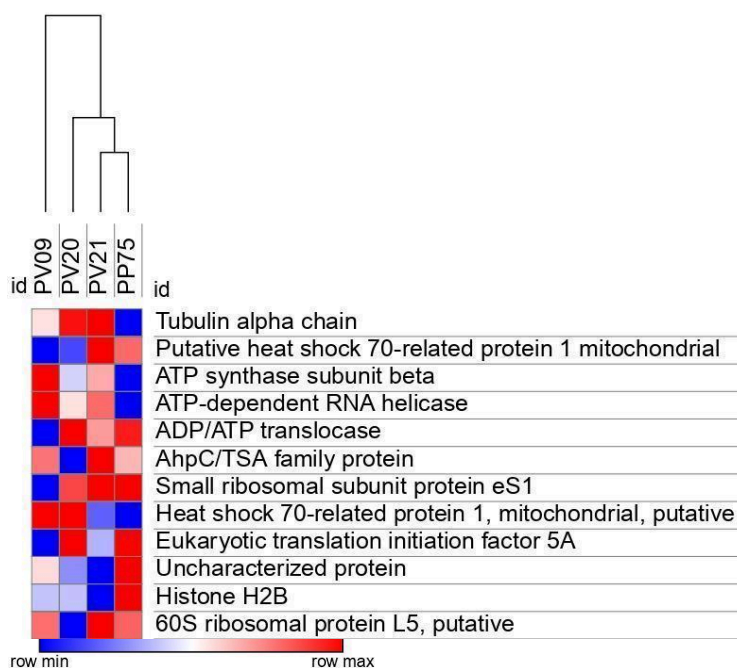


Figura 3. *Heatmap* da intensidade normalizada das 12 proteínas significantes. Clusterização por distância euclidiana dos valores de intensidade normalizada das proteínas das cepas de *Leishmania*. A variação de cores no heatmap representa as diferenças de intensidade de cada proteína: quanto mais vermelho, mais intenso. Método de ligação: simples. Produzido pelo software <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>.

5.1.3 Papel biológico das proteínas com expressão diferencial

As proteínas com expressão diferencial identificadas desempenham papéis essenciais para a biologia e sobrevivência do parasita (Tabela 2). Entre elas, destacam-se as proteínas relacionadas ao choque térmico (2) e (8), cruciais para a proteção contra estresses ambientais, e as proteínas ribossomais (7) e (12), fundamentais para a síntese proteica. As proteínas envolvidas na produção e transporte de ATP (3), (4) e (5) são vitais para o fornecimento e transporte de energia celular. Estudos anteriores com *L. major*, *L. braziliensis* e *L. donovani* também descreveram alguns desses componentes, particularmente em investigações sobre diferenciação celular, divisão celular e motilidade (Dashatan *et al.*, 2020; Alcolea *et al.*, 2023).

A avaliação do perfil proteômico obtido sugere a presença de um padrão metabólico mais ativo nos isolados clínicos, uma vez que foi observado o aumento da abundância relativa de proteínas associadas a diferentes processos metabólicos do parasito, incluindo síntese proteica, metabolismo energético, processos relacionados à replicação celular e adaptação ao estresse ambiental. Essas diferenças possivelmente podem estar relacionadas ao contraste entre o ambiente de cultivo da cepa de referência (controlado, com abundância de nutrientes e baixo estresse) e o ambiente de infecção ativa ao qual os isolados clínicos estavam expostos antes da coleta.

Um estudo realizado por Silva, Cordeiro-da-Silva e Coombs (2011) avaliou, a partir de uma abordagem metabolômica, como diferentes fases de crescimento e desenvolvimento dos promastigotas de *Leishmania donovani* levam a variações em componentes metabólicos, incluindo lipídios e outros metabólitos que podem estar relacionados à adaptação e sobrevivência do parasita. Esse estudo também destacou que transições metabólicas e morfológicas não são apenas resposta a estímulos ambientais, mas também resultado de uma programação genética que prepara o parasita para enfrentar os desafios específicos de cada ambiente (Silva, Cordeiro-da-Silva, Coombs, 2011; Bates, Rogers, 2004). Nesse sentido, é importante a realização de novos experimentos para analisar a curva de crescimento desses isolados, a fim de comparar o intervalo da fase logarítmica entre eles e entender possíveis diferenças na velocidade de proliferação, bem como suas implicações na adaptação metabólica e na resposta às condições ambientais durante o desenvolvimento.

A proteína 1 trata-se de um constituinte estrutural do citoesqueleto, responsável pela forma celular, transporte e mobilidade flagelar (Ramírez; Requena; Puerta, 2013). Devidos suas características estruturais, esse composto está envolvido em processos cruciais para a sobrevivência do parasita, tais como divisão celular, polimerização dos microtúbulos e transformação da morfologia dos parasitas durante a metaciclogênese e diferenciação do estágio intracelular (Datashan *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2012).

Os compostos (2) e (8), ambos catalisadores de dobramento e redobramento adequado das proteínas, estão envolvidos também na manutenção da homeostase celular, respondendo ao estresse térmico, oxidativo e químico (Toye; Remold, 1989; Brochu; Haimeur; Ouellette, 2004). Além disso, alguns estudos sugerem que a família HSP70 desempenha um papel determinante durante os estágios intermediários da diferenciação de promastigotas de *L. donovani* (Alcolea, 2023), já foi demonstrado inclusive, que proteínas HSP70 e HSC70 atuam como uma forma inicial de proteção contra o antimônio trivalente (Brochu; Haimeur; Ouellette, 2004; Codonho *et al.*, 2016) e estimulam uma forte resposta imunoestimuladora (Rico *et al.*, 1998).

Tabela 2. Classificação e descrição das proteínas com expressão diferencial

	Proteína	Função Principal	Classe
1	Cadeia alfa de tubulina	Componente estrutural de microtúbulos (citoesqueleto).	Proteína Estrutural
2	Proteína 1 mitocondrial relacionada ao choque térmico 70 putativa	Chaperona molecular (auxilia no dobramento de proteínas) na mitocôndria.	Chaperona (HSP70)
3	Subunidade beta da ATP sintase	Componente da ATP sintase, responsável pela síntese de ATP (não hidrólise para transporte).	ATPase F-tipo/Síntese de ATP
4	Helicase de RNA dependente de ATP	Desenrola estruturas secundárias do RNA, usando ATP.	Helicase
5	Translocase ADP/ATP	Transporta ADP e ATP entre a mitocôndria e o citosol (transporte passivo/trocador).	Trocador de Nucleotídeos
6	Proteína da família AhpC/TSA	Envolvida na resposta a estresse oxidativo	Peroxidase
7	Proteína eS1 da subunidade ribossômica pequena	Componente estrutural do ribossomo (subunidade pequena).	Proteína Ribossomal
8	Proteína 1 relacionada ao choque térmico 70, mitocondrial, putativa	Chaperona molecular.	Chaperona (HSP70)

9	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5A	Fator necessário para o início da tradução de proteínas.	Fator de Iniciação
10	Proteína não caracterizada	Função desconhecida.	N/A
11	Histona H2B	Componente estrutural do nucleossomo (empacotamento de DNA).	Histona/Proteína Estrutural
12	Proteína ribossômica 60S L5, putativa	Componente estrutural do ribossomo (subunidade grande).	Proteína Ribossomal

O composto (11) corresponde a uma proteína construtora de nucleossomos, cujas principais funções incluem o empacotamento do DNA e organização da cromatina, e transcrição e regulação da expressão gênica (Wang *et al.*, 2011; Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2010; Galanti *et al.*, 1998). Já a proteína (12) representa uma subunidade ribossômica, envolvida no processo de tradução (Liu *et al.*, 2016; Ayub *et al.*, 2012; Ayub *et al.*, 2009). Essa proteína garante o sucesso do processo de montagem das subunidades do ribossomo, tendo, portanto, um papel fundamental na síntese proteica, além de fornecer propriedades imunomoduladoras para o desenvolvimento de vacinas. Um estudo realizado Maarouf e Abdlwahab (2021) selecionou um gene da proteína ribossômica L5 para desenvolver uma vacina de DNA contra a infecção por *Leishmania tropica*, ao final foi induzida uma resposta Th1 que está associada à proteção contra o desenvolvimento e a progressão de lesões cutâneas causadas por *Leishmania* em camundongos.

A proteína (6) apresentou expressão aumentada nos isolados clínicos. Essa proteína pertence à família das peroxidases, a qual atua no sistema antioxidante da *Leishmania* e auxilia na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio da decomposição de hidroperóxido com o uso de um equivalente de tiol, como a tioredoxina (Alcolea *et al.*, 2023). Adicionalmente, essa classe proteica está associada à sobrevivência do parasito no ambiente macrofágico, considerando que os macrófagos exibem uma atividade microbicida contra *Leishmania* mediada principalmente por EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Fang, 2011).

Um estudo realizado por Henard *et al.* (2014) demonstrou como formas amastigotas de *L. amazonensis* são resistentes à toxicidade mediada por ERNs, crescendo robustamente dentro de macrófagos ativados por citocinas, enquanto as promastigotas são prontamente eliminadas. Essa defesa está ligada à expressão aumentada de uma proteína pertencente à mesma classe do composto identificado (6), ela estaria permitindo que o parasita se adaptasse e neutralizasse o ambiente hostil do macrófago, promovendo a sobrevivência intracelular e a

persistência da infecção. Esse cenário sugere que, a expressão dessa proteína em isolados clínicos, os quais foram recentemente isolados do hospedeiro (e, portanto, de um ambiente rico em macrófagos ativados), pode estar revelando resposta adaptativa sustentada ao estresse nitroxidativo.

Os níveis elevados de expressão desta proteína também têm sido associados à resistência aos antimoniais, pois aumentam a capacidade do parasita de “limpar” os produtos gerados pelo fármaco que levam à morte por estresse oxidativo (Tabatabaie *et al.*, 2012). Estudos conduzidos por Patino *et al.* (2019) revelaram, ainda, variações significativas na expressão de proteínas, envolvidas no metabolismo e na resposta ao estresse, entre isolados suscetíveis e resistentes ao antimonial trivalente em *L. amazonensis*. Rojo *et al.* (2015) identificaram, a partir de uma abordagem metabolômica, diferenças nos perfis metabólicos de cepas de *L. infantum* suscetíveis e resistentes a antimônio trivalente, destacando como a ação dos antimoniais é amplamente baseada na deterioração do metabolismo tiol-dependente do parasita. Essa superexpressão em isolados clínicos sugere que as adaptações fenotípicas observadas em ambientes naturais podem conferir uma vantagem competitiva ao parasita, permitindo-lhe sobreviver e proliferar mesmo na presença de tratamentos antimoniais.

5.2 Análise do lipidoma

5.2.1 Análise de significância

A análise realizada adotou algumas condições para a avaliação do perfil lipídômico dos isolados clínicos em comparação com a cepa de referência. Os espectros de massa obtidos no modo de ionização positiva foram avaliados nas análises de significância. Inicialmente, identificou-se um total de 161 compostos. Para refinar os resultados e focar nos compostos mais relevantes, aplicaram-se filtros de frequência e abundância de 100%, reduzindo o número de compostos para 21. Em seguida, realizou-se uma análise estatística para verificar a significância das diferenças entre as condições estudadas. Foi utilizado o teste t não pareado, com um nível de significância de $p < 0,05$ e um critério de *fold-change* maior ou igual a 2.

Essa análise permitiu detectar 5 compostos que apresentaram expressão diferencial significativa entre as condições comparadas, sendo estes identificados como Heneicosano, Heneicosano, Dodecano, 2,6,10-trimetil-, Ácido benzoico, 4-metil-, 2-p-Tolilpiridina e Ácido 4-n-propilbenzoico. Neste trabalho, esses compostos serão denominados composto A, B, C, D e E, respectivamente, para facilitar a discussão.

Na figura 4 é possível observar um gráfico do tipo Volcano Plot, em que o eixo X ($\log_2 \text{fold change}$) indica a magnitude da alteração na expressão relativa dos compostos, enquanto o eixo Y ($-\log_{10} \text{corrected P-value}$) representa a significância estatística dessas diferenças. Os pontos em azul correspondem a compostos diferencialmente expressos que apresentaram redução significativa, ultrapassando o valor de corte estabelecido tanto para o *fold change* quanto para o p-valor corrigido. Já o ponto em vermelho indica um dos compostos que apresentou aumento significativo de expressão nos isolados clínicos, também dentro dos critérios de *cutoff* definidos ($p < 0,05$ e *fold change* ≥ 2). Por outro lado, os pontos em cinza representam compostos que não superaram os limiares de significância estatística ou de *fold change*, não sendo considerados diferencialmente expressos.

Ao avaliar os cinco lipídios diferencialmente expressos nos isolados clínicos, observou-se que os compostos A, B, D e E apresentaram expressão reduzida (*down-regulation*) em comparação com a cepa de referência, enquanto o composto C foi o único a exibir expressão aumentada (*up-regulation*) nos isolados clínicos, essa regulação positiva indica que o composto pode desempenhar um papel específico e possivelmente compensatório no metabolismo ou na virulência da cepa analisada. Contudo, não foi possível estabelecer uma relação direta, uma vez que não há evidências da participação desse composto em vias metabólicas conhecidas em organismos vivos. O valor da abundância dos compostos em cada isolado e cepa de referência pode ser acessado na Tabela 3.

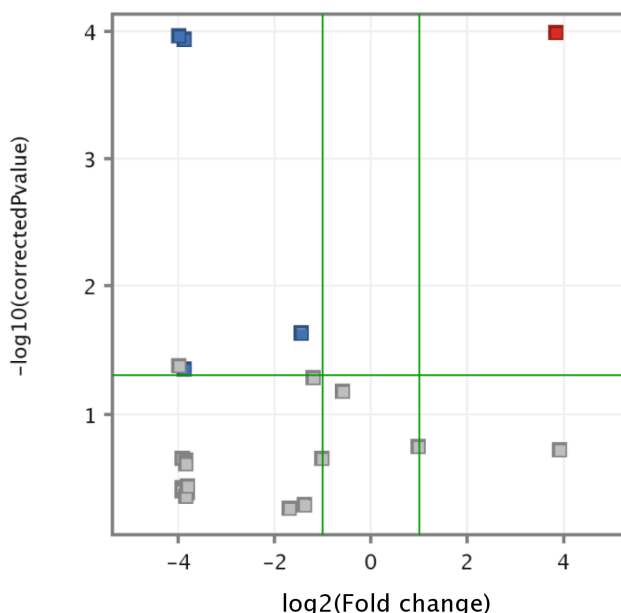


Figura 4. Volcano plot dos lipídios com expressão diferencial encontrados nos isolados clínicos em comparação com a cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75).

Tabela 3. Abundância dos compostos diferencialmente expressos nos isolados e na cepa de referência

Abundância dos compostos					
Identificação	Compostos	Isolados clínicos			Cepa de referência
		PV09	PV20	PV21	PP75
A	Heneicosano	16,92065133	17,199735	16,65633433	18,531446
B	Dodecano, 2,6,10-trimetil-	0	4,708118667	4,562241333	15,243458
C	Ácido benzoico, 4-metil-	16,14809467	16,26477	15,40556967	0
D	2-p-Tolilpiridina	0	0	0	13,964862
E	Ácido 4-n-propilbenzoico	0	0	0	15,430598

*Para facilitar a organização gráfica dos dados, foram atribuídas letras aos compostos diferencialmente expressos.

5.2.2 Comparação de perfis lipidômicos

Com os valores normalizados de intensidade dos lipídios diferenciais, foi construído um *heatmap* para representar graficamente a variação nos perfis lipidômicos entre os isolados clínicos e a cepa de referência (Figura 5).

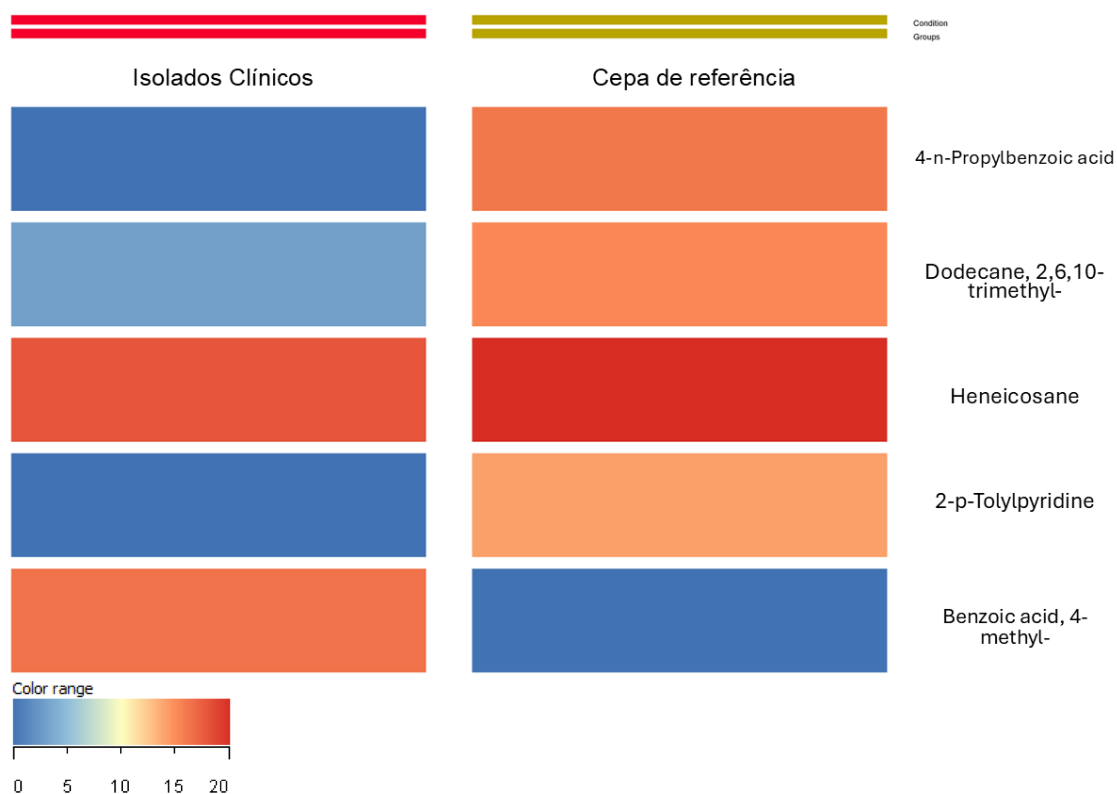


Figura 5. *Heatmap* dos compostos diferenciais entre isolados clínicos e a cepa de referência. As colunas agrupam os grupos analisados de acordo com a similaridade dos perfis, enquanto as linhas representam os cinco compostos com expressão diferencial.

Os isolados clínicos apresentam perfis de intensidade relativamente homogêneos entre si e foram agrupados na análise como um único bloco em comparação com a cepa referência, a qual exibiu padrão distinto para todos os compostos. O composto A apresenta coloração mais intensa em ambas as condições, indicando níveis elevados tanto nos isolados clínicos quanto na cepa de referência. Em contrapartida, o D e o E exibem intensidades mais pronunciadas na cepa de referência, enquanto nos isolados clínicos essas intensidades se mostram atenuadas. Por outro lado, o composto C é caracterizado por maior intensidade de cor nos isolados clínicos, refletindo sua maior abundância relativa neste grupo.

Esse contraste evidencia a clara separação metabólica entre os grupos, sugerindo que os isolados clínicos desenvolveram um perfil característico em relação à cepa de referência. Como todas as amostras foram processadas de forma idêntica, sem que houvesse diferenças técnicas na extração de lipídeos, as variações observadas refletem, de fato, componentes celulares ou alterações em vias metabólicas próprias dos isolados. Além disso, é importante considerar que esses isolados foram obtidos diretamente de pacientes humanos, onde estiveram sujeitos a constantes pressões seletivas do hospedeiro, enquanto a cepa de referência tem sido mantida em cultura por longos períodos, o que pode explicar parte das diferenças metabólicas observadas entre os grupos.

Para reforçar essa clara distinção, a análise de Componentes Principais (PCA) foi empregada para comparar os isolados clínicos de *L. infantum* com a cepa de referência, possibilitando a visualização de padrões de similaridade e dissimilaridade entre as amostras. Conforme ilustrado na Figura 6, os isolados clínicos (em vermelho) apresentam-se dispersos no gráfico, o que reflete variações em seus perfis lipídicos e demonstra a diversidade fenotípica de parasitos obtidos de amostras de campo. Por outro lado, a separação observada entre esses isolados e a cepa de referência indica que seus perfis de expressão de lipídios diferem de forma marcante daqueles verificados em parasitos mantidos rotineiramente em laboratório.

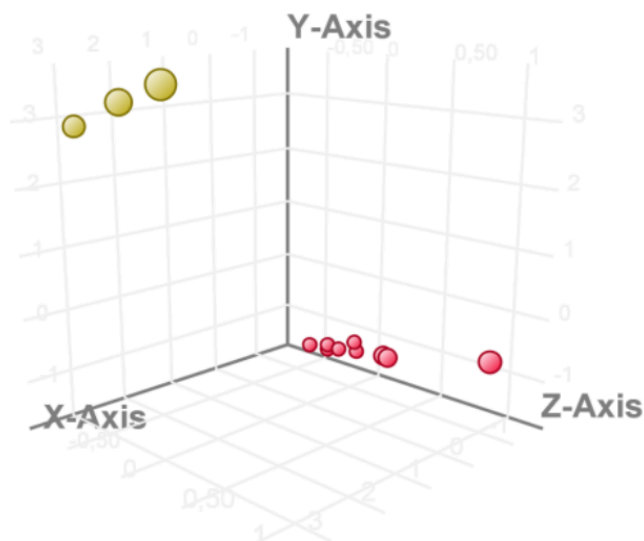


Figura 6. Análise de Componentes Principais entre isolados clínicos e cepa de referência. Os pontos vermelhos representam as replicatas de cada isolado clínico e os pontos amarelos, a cepa de referência.

Esse achado está em consonância com outros trabalhos, que também observaram esse tipo de resultado e destacam que a manutenção prolongada de uma cepa em cultura pode modificar profundamente seu metabolismo, tornando-a distinta de parasitos recém-isolados de hospedeiros. Berg *et al.* (2013) avaliou como condições de manutenção em cultura podem levar a adaptações metabólicas e fenotípicas significativas. De modo semelhante, Silva, Cordeiro da Silva, Coombs, (2011) analisaram mudanças no perfil metabólico à medida que promastigotas de *L. donovani* se desenvolvem durante culturas *in vitro*, destacando alterações principalmente nas classes lipídicas. Um estudo de Saunders *et al.* (2014) revelou que as fases culturais de *L. mexicana*, como as amastigotas axênicas, exibem um metabolismo mais “estrito” e dependente do metabolismo mitocondrial. Essa mudança metabólica difere substancialmente das formas de amastigotas isoladas diretamente de hospedeiros, indicando que o ambiente de cultura pode promover um remodelamento metabólico importante.

5.2.3 Papel biológico dos lipídios com expressão diferencial

Os lipídios desempenham funções cruciais na biologia de células e organismos. Eles constituem os principais componentes estruturais das membranas biológicas, permitem a ancoragem de glicoconjugados e diversas proteínas, atuam como mediadores de sinalização intra e extracelular, além de servirem como uma forma eficiente de armazenamento de energia e de poder redutor (Ramakrishnan *et al.*, 2014). A *Leishmania* apresenta uma composição lipídica complexa e especializada, essencial para sua sobrevivência e infectividade. Estudos demonstram que a membrana plasmática da *Leishmania* é composta

principalmente por fosfolipídios, lipofosfoglicanos (LPGs) e ergosterol, com variações dependendo da forma do parasita (promastigota ou amastigota) e do hospedeiro (Pawlowic *et al.*, 2016; Basu *et al.*, 2023).

Os compostos com expressão diferencial identificados desempenham papéis essenciais para a biologia e sobrevivência do parasita. Entre eles, destaca-se o composto A e B, ambos pertencentes à classe dos alcanos ramificados. Os hidrocarbonetos saturados em cinetoplastídeos, como a *Leishmania*, atuam como moduladores da fluidez e estabilidade da membrana, precursores de lipídios complexos, reservas energéticas e como defesa contra estresse oxidativo, sendo fundamentais para a adaptação aos diferentes ambientes do ciclo de vida (Aquino *et al.*, 2021). Nesse contexto, o metabolismo lipídico torna-se particularmente relevante, uma vez que a *Leishmania* depende fortemente da aquisição de ácidos graxos para sua sobrevivência intracelular. Embora esses compostos sejam essenciais para a formação de membranas e produção de energia, o parasita não apresenta vias biossintéticas completamente caracterizadas para sua síntese, o que o obriga a obtê-los a partir do hospedeiro. Essa captação ocorre por meio do recrutamento de corpos lipídicos (*lipid bodies* – LBs) para o vacúolo parasitóforo, onde os ácidos graxos são liberados e utilizados tanto na biossíntese de membranas quanto no metabolismo energético. Além disso, a *Leishmania* é capaz de utilizar ácidos graxos como fonte de energia por meio da β -oxidação, uma via metabólica especialmente importante na forma amastigota, quando o parasita depende de fontes alternativas para sua manutenção no ambiente intracelular do hospedeiro (Sood *et al.*, 2024).

O composto D trata-se de um heteroaromático nitrogenado, tais compostos constituem uma classe de grande relevância biológica, pois estão presentes em diversas moléculas essenciais à vida, incluindo as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, moléculas energéticas como o ATP, mensageiros e seus análogos, além de várias coenzimas (Rodriguez *et al.*, 2019; Walsh, 2015). No entanto, a biossíntese natural desses heteroaromáticos em organismos vivos ainda não é completamente compreendida, especialmente em condições de cultivo *in vitro*, onde fatores ambientais e regulatórios podem alterar as rotas metabólicas (Portero, Hang, Marchán-Rivadeneira, 2023).

A detecção exclusiva do 2-p-Tolylpyridine (D) na cepa de referência, em contraste com sua ausência nos isolados clínicos sugere que sua produção esteja relacionada às adaptações metabólicas decorrentes do cultivo prolongado em laboratório. A ausência do composto nos isolados clínicos indica que esta via pode não desempenhar papel relevante em parasitos submetidos às pressões seletivas do hospedeiro, caracterizando uma diferenciação metabólica entre cepas de campo e a cepa de referência mantida *in vitro*. Essa expressão

também pode refletir diferenças na regulação das vias biossintéticas endógenas. Considerando que alguns tripanossomatídeos podem dispensar a biossíntese de compostos heterocíclicos aromáticos, como as pirimidinas, em favor do salvamento a partir do hospedeiro (Hammond, Gutteridge, 1984; Ali Mohamed, 2013) Propomos, assim, que a cepa de referência, mantida em cultura *in vitro*, mantenha atividade de rotas anabólicas que conduzem à formação de derivados piridínicos ou a desvios de fluxo metabólico dependentes de cofatores.

Os compostos C e E referem-se a ácidos carboxílicos aromáticos, esses compostos podem atuar como precursores na síntese de metabólitos secundários e de cofatores essenciais, participando de rotas ligadas ao metabolismo energético e à regulação redox. Derivados aromáticos estão envolvidos tanto na modulação da resposta ao estresse oxidativo quanto na manutenção da integridade da membrana, podendo influenciar diretamente a sobrevivência do parasito em ambientes hostis (Marchese *et al.*, 2018; Westrop *et al.*, 2015; Nowicki, Cazzulo, 2008). Importante destacar que diferentes cepas ou espécies podem apresentar variações na expressão de enzimas relacionadas à síntese de lipídios e compostos secundários, refletindo possíveis adaptações metabólicas (Ramakrishnan *et al.*, 2014). Assim, alterações na expressão de certos compostos podem estar relacionadas a diferenças nas vias de biossíntese ou catabolismo, dependendo do isolado clínico *versus* a cepa de referência.

Nesse sentido, hipotetizamos que a maior abundância do composto 3 exclusivamente nos isolados clínicos pode estar associada a estratégias de sobrevivência frente ao ambiente intracelular hostil, como o estresse oxidativo e a pressão imunológica, indicando possível papel desse composto na modulação redox, na comunicação celular ou mesmo na virulência. Por outro lado, a expressão predominante do composto E na cepa de referência pode refletir uma rota metabólica mantida em condições laboratoriais, onde a ausência de desafios do hospedeiro favorece o acúmulo de metabólitos menos relevantes para a adaptação *in vivo*. Assim, a heterogeneidade metabólica evidenciada ressalta não apenas a plasticidade bioquímica desses parasitos, mas também a importância de considerar o contexto ambiental e evolutivo ao interpretar diferenças no perfil metabolômico entre linhagens.

6. CONCLUSÃO

A análise proteômica e lipidômica revelou a expressão diferencial de 12 proteínas e 5 lipídios, com cenários de abundância diferentes, sugerindo que as alterações nos perfis bioquímicos e protéicos-lipídicos em isolados clínicos podem refletir adaptações metabólicas relacionadas à sobrevivência e patogenicidade do parasita. Além disso, ficou evidente que os isolados clínicos de *Leishmania infantum*, analisados neste trabalho, apresentaram um perfil proteômico e lipidômico distintos quando comparados à cepa de referência, refletindo adaptações específicas ao ambiente do hospedeiro e às pressões seletivas que ocorrem dentro do organismo infectado. Os padrões de expressão proteicos sugerem que os isolados clínicos apresentam ajustes metabólicos para otimizar a sobrevivência no ambiente intracelular, particularmente frente ao estresse oxidativo e às pressões imunológicas do hospedeiro. A maior abundância de proteínas associadas à detoxificação, metabolismo energético e manutenção estrutural pode refletir uma resposta adaptativa ao microambiente inflamatório e microbicida encontrado no hospedeiro humano.

Na análise de PCA realizada para o lipidoma foi possível observar que os isolados clínicos apresentam diferenças entre si, evidenciando a existência de variações intraespecíficas. Esse aspecto é particularmente relevante quando se trabalha com amostras de campo, uma vez que tais diferenças podem refletir adaptações específicas de cada isolado, influenciando tanto o perfil metabólico quanto a resposta frente a diferentes condições ambientais ou ao hospedeiro.

As perspectivas futuras deste trabalho incluem ensaios que comparem virulência, infectividade e tolerância a fármacos e outros possíveis fenótipos dos isolados clínicos implicados por essas diferenças de expressão proteico-lipídicas. Além disso, outra possível correlação a ser estabelecida é com os dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes dos quais os parasitas foram obtidos.

Ressaltamos, aqui, a importância da caracterização biomolecular integrada de parasitos circulantes em áreas endêmicas e o ineditismo do presente estudo. Esses achados evidenciam a importância do estudo com parasitas isolados de pacientes, uma vez que conclusões baseadas somente em cepas adaptadas ao cultivo em laboratório podem resultar em extrapolações dos mecanismos biológicos evidenciados em *Leishmania*.

7. REFERÊNCIAS

- ALCOLEA, Pedro *et al.* An insight into differential protein abundance throughout *Leishmania donovani* promastigote growth and differentiation. **International Microbiology**, v. 26, p. 25-42, 2023.
- ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, vol. 07, n. 05, e35671, 2012.
- ALVES-FERREIRA, Marcelo *et al.* **Abordagens Genômicas, Transcriptômicas e Proteômicas aplicadas ao estudo de *Leishmania* spp.** In: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima, and ALVES, Carlos Roberto. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 491-511. 2014.
- AQUINO, Giovana Parreira *et al.* Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids. **Microbial Cell**, vol. 8, n. 11, p. 262-275, 2022.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 10, n. 6, e0004770, 2016.
- ATAN, Nasrin Amiri; KOUSHKI, Mehdi; AHMADI, Nayeb; REZAEI-TAVIRANI, Mostafa. Metabolomics-based studies in the field of *Leishmania*/leishmaniasis. **Alexandria Journal of Medicine**, vol. 54, n. 04, p. 383-390, 2018.
- AUWERA, Gert Van; DUJARDIN, Jean-Claude. Species Typing in Dermal Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 28, p. 265-294, 2015.
- AYUB, Maximiliano Juri *et al.* Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 1, p. 30-34, 2009.
- AYUB, Maximiliano Juri *et al.* Ribosomes from trypanosomatids: unique structural and functional properties. **Cell-Free Protein Synthesis**, InTech (London), 2012.
- BAMOROVAT, Mehdi. Major risk factors and histopathological profile of treatment failure, relapse and chronic patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis: A prospective case-control study on treatment outcome and their medical importance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 15, n. 01, e0009089, 2021.
- BAMOROVAT, Mehdi *et al.* Risk factors for anthroponotic cutaneous leishmaniasis in unresponsive and responsive patients in a major focus, southeast of Iran. **PLOS One**, vol. 13, n. 02, e0192236, 2018.
- BASU, Somrita *et al.* Ethanolaminephosphate cytidyltransferase is essential for survival, lipid homeostasis and stress tolerance in *Leishmania major*. **PLOS Pathogens**, vol. 19, n. 07, e1011112, 2023.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, p. 601-609, 2004.

BELTRAN, Pierre; FEDERSPIEL, Joel; SHENG, Xin Lei; CRISTEA, Ileana. Proteomics and integrative omic approaches for understanding host–pathogen interactions and infectious diseases. **Molecular Systems Biology**, vol. 13, n. 03, 2017.

BERG, Maya *et al.* Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 428-442, 2013.

BESTEIRO, Sébastien *et al.* Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, n. 16, p. 11384-11396, 2006.

BESTEIRO, Sébastien *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal For Parasitology**, v. 37, n. 10, p.1063-1075, 2007.

BIAGIOTTI, Michael; DOMINGUEZ, Sedelia; YAMOUT, Nader; ZUFFEREY, Rachel. Lipidomics and anti-trypanosomatid chemotherapy. **Clinical and Translational Medicine**, vol. 06, e27, 2017.

BIYANI, Neha; MADHUBALA, Rentala. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, vol. 1824, n. 12, p. 1342-1350, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta nº110/2025-CGZV/DEDT/SVS/MS e CGAFME/DAF/SECTICS/MS**: orientações sobre o uso da miltefosina 10 mg, cápsula, para o tratamento de pessoas com diagnóstico de leishmaniose tegumentar com idade entre 2 e 12 anos, no âmbito do Sistema Único de Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2025/nota-tecnica-conjunta-no-110-2025-cgzv-dedt-svs-e-cgafme-daf-sectics-ms.pdf>

BUSCAGLIA, Carlos; KISSINGER, Jessica; AGUERO, Fernan. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. **Trends in Genetics**, vol. 31, n. 10, 2015.

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

BROCHU, Christian; HAIMEUR, Anass; OUELLETTE, Marc. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Stress Chaperones**. v. 9, n. 3, p.294–303, 2004.

CANTACESSI, Cinzia; DANTAS-TORRES, Filipe; NOLAN, Matthe; OTRANTO, Domenico. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, vol. 31, n. 03, p. 100-108, 2015.

CDC. **Leishmaniasis**. DPDx – Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Centers for Disease Control and Prevention, United States. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html#print>>. Acesso em: 11 de setembro de 2025.

CHAMBERS, George; LAWRIE, Laura; CAHS, Phil; MURRAY, Graeme. Proteomics: a new approach to the study of disease. **Journal of Pathology**, vol. 192, p. 280-288, 2000.

WANG, Yingwei *et al.* Differential Microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania promastigotes* and amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1124-1133, 2011.

CODONHO, Bárbara Santoni *et al.* HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 111, n. 7, p. 460-468, 2016.

COELHO, Vinícios *et al.* Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like *Leishmania* Using an Immunoproteomic Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2012.

CRUZ, Angela Kaysel; FREITAS-CASTRO, Felipe. Genome and transcriptome analyses of *Leishmania* spp.: opening Pandora's box. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 52, p. 64-69, 2019.

DASHATAN, Nasrin; TAVIRANI, Mostafa Rezaei; HAKIMEN, Zali MEHDI, Koushki; NAYEBALI, Ahmadi. Quantitative proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in *Leishmania major* metacyclogenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, e104557, 2020.

DUJARDIN, Jean-Claude. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: Resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 09, n. 02, p. 290-297, 2009.

ESPINOSA, Omar *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and Endotrypanum. **Parasitology**, vol, 145, n. 4, p. 430-442, 2018.

FANG, Ferri C. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. **ASM Journals: mBio**, vol. 2, n. 5, e10.1128/mbio.00141-11, 2011.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; FERREIRA, Claudio; COSTA, Michele. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

GALANTI, N. *et al.* Histone genes in Trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 14, n. 2, p. 64-70, 1998.

GARIN, Yves Jean-François *et al.* Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infection and Immunity**, vol. 69, n. 12, p. 7365-7373, 2001.

GROSS, Richard; HAN, Xianlin. Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology. **Chemistry & Biology**, vol. 18, n. 03, p. 284-291, 2011.

HAMMOND, David.; GUTTERIDGE, Winston. Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 13, n. 3, p. 243-261, 1984.

HENARD, Calvin A. *et al.* *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a Tryparedoxin Peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and fosters parasite virulence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 8, n. 7, e.3000, 2014.

JAIN, Saurabh *et al.* Global leishmaniasis surveillance updates 2023: 3 years of the NTD road map. **Weekly Epidemiological Record**, n. 45, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-9945-653-669>.

JESUS, Jose Batista; MESQUITA-RODRIGUES, Camilia; CUERVO, Patricia. Proteomics advances in the study of *Leishmania* parasites and leishmaniasis. **Sub-cellular Biochemistry**, vol. 74, p. 323-349, 2014.

KANEHISA, Minoru *et al.* The KEGG databases at GenomeNet. **Nucleic Acids Research**, vol. 30, n.01, p. 6-42, 2002.

KARIYAWASAM, R.; CHALLA, P.; LAU, R.; BOGGILD, A. K. Susceptibility testing of *Leishmania* spp. against amphotericin B and fluconazole using the Sensititre™ YeastOne™ YO9 platform. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, e. 593, 2019.

KENNEDY, Eugene. The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 222, n. 1, p. 185-191, 1956.

KHADEM ERFAN, Mohammad Bagher *et al.* Downregulation of Calcineurin Gene Is Associated with Glucantime® Resistance in *Leishmania infantum*. **Iranian Journal Parasitology**, vol. 04, p. 359-366, 2013.

KHAN, Mohd *et al.* Multi-omics strategies uncover host–pathogen interactions. **ACS Infectious Diseases**, vol. 05, n. 04, 2019.

KIM, Sehyeon (Erika) *et al.* Global lipidomics reveals the lipid composition heterogeneity of extracellular vesicles from drug-resistant *Leishmania*. **Metabolites**, vol. 14, n. 12, e658, 2024.

KORIEM, Khaled Mohamed Mohamed. A lipidomic concept in infectious diseases. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, vol. 7, n. 3, p. 265-274, 2017.

LANDER, Eric *et al.* International Human Genome sequencing consortium. Initial sequencing and analysis of the Human Genome. **Nature**, vol. 409, p. 860-921, 2001.

LIU, Zheng *et al.* Structure and assembly model for the *Trypanosoma cruzi* 60S ribosomal subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 43, p. 12174-12179, 2016.

MAAROUF, Mohammad; ABDLWAHAB, Alyaa. Investigating the existence of ribosomal protein l5 gene in the Syrian strain of *Leishmania tropica* genome: sequencing it and

- evaluating its immune response as DNA vaccine. **Journal of Parasitology Research**, v. 2021, ID 6617270, 2021.
- MALTA-SANTOS, Hanya *et al.* Multi-omic analyses of plasma cytokines, lipidomics, and transcriptomics distinguish treatment outcomes in cutaneous leishmaniasis. **iScience**, vol. 23, 101840, 2020.
- MARCHESE, Leticia *et al.* The uptake and metabolism of amino acids, and their unique role in the biology of pathogenic trypanosomatids. **Pathogens** (Basel, Switzerland), v. 7, n. 2, p. 36, 2018.
- MARTINEZ, S.; MARR, J. Allopurinol in the treatment of American cutaneous Leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 11, p. 741-744, 1992.
- MARTINEZ, Escudero *et al.* Antileishmanial activity and tubulin polymerization inhibition of podophyllotoxin derivatives on *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 6, n. 14, p. 454, 2013.
- MATRANGOLO, Fabiana *et al.* Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 190, n. 02, p. 63-75, 2013.
- MCARDLE, Andrew James; MENIKOU, Stephanie. What is proteomics? Archives of disease in childhood. **Education and Practice Edition**, vol. 106, n. 03, 178-181, 2021.
- MCNEELY, Tessie; TURCO, SJ. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **Journal of immunology**, vol. 144, n. 7, p. 2745-2750, 1990.
- MCNICOLL, François *et al.* A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, vol. 06, n. 12, 2006.
- MEDDEB-GARNAOUI, Amel. Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. **Vaccine**, v. 28, n.7, p. 1881-1886, 2010.
- MEER, Gerrit van; VOELKER, Dennis R.; FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 09, p. 112-124, 2008.
- MENON, Anant.; EPPINGERL, Martina; MAYOR, Satyajit, SCHWARZ, Ralph. Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminalphosphoethanolamine group in trypanosome glycosyl-phosphatidylinositols. **The EMBO Journal**, vol. 12, n.5, p. 1907-1914, 1993.
- Ministério da saúde (2022). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5 ed. 1126 p. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf
- MOHMED, Ali Juma Ahmed. **Pyrimidine salvage and metabolism in kinetoplastid parasites**. 2013. 343 f. Tese (Doutorado em Filosofia), College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Escócia, 2013.

- NEGRÃO, Fernanda *et al.* Lipidomic alterations of in vitro macrophage infection by *L. infantum* and *L. amazonensis*. **Molecular BioSystems**, vol. 13, n. 11, p. 2401-2406, 2017.
- NEGREIROS, Maria Helena Gurgel *et al.* Análise epidemiológica dos casos de leishmaniose visceral no Brasil no período de 2013 a 2022: um estudo ecológico. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n.6, p. 1544–1558, 2024.
- NEUBER, Hubertus. Leishmaniasis. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 6, n. 9, p.754-765, 2008.
- NOWICKI, Cristina; CAZZULO, Juan. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, p. 381-390, 2008.
- PAGET, Timothy; HAROUNE, Nicolas; BAGCHI, Sushmita; JARROLL, Edward. Metabolomics and Protozoan Parasites. **Acta Parasitologica**, vol. 58, n. 2, p. 127-131, 2013.
- PÁLIC, Semra; BEIJEN, Jos; DORLO, Thomas P. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 59, n. 1, 106459, 2022.
- Pan American Health Organization (PAHO). **Leishmaniasis**, 2024. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>.
- PANDEY, Akhilesh; MANN, Matthias. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, vol. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000.
- PAREYN, Myrthe *et al.* Leishmaniasis. **Nature Reviews Disease Primers**, vol. 11, n. 81, 2025.
- PATINO, Luiz; Muskus, Carlos; Ramírez, Juan. Transcriptional responses of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the presence of trivalent sodium stibogluconate. **Parasites & Vectors**, vol. 12, n. 348, 2019.
- PAWLOWIC, Mattie *et al.* Plasmenylethanolamine synthesis in *Leishmania major*. **Molecular Microbiology**, vol. 101, n. 02, p. 238-249, 2016.
- PEIXOTO-CAPELLI, Janaína *et al.* Proteomics and Leishmaniasis: Potential Clinical Applications. **Proteomics Clinical Applications**, vol. 13, n. 06, e1800136, 2019.
- PINHO, Nathalia *et al.* In-depth quantitative proteomics uncovers specie-specific metabolic programs in *Leishmania (Viannia)* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 14, n. 08, e0008509, 2020.
- PORTERO, Carolina; HANG, Yong; MARCHÁN-RIVADENEIRA, Raquel. Advances on the biosynthesis of pyridine rings. **Engineering Microbiology**, v. 3, n. 2, 100064, 2023.
- POSTLE, Anthony. Lipidomics. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, vol. 15, p. 127-133, 2012.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n. 12, e0006052, 2017.

PULIDO, Sergio *et al.* Insights into the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthetic pathways in *Leishmania* parasites and characterization of a choline kinase from *Leishmania infantum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 213, p. 45-54, 2017.

RAMAKRISHNAN, Srinivasan *et al.* Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 488-512, 2013.

RAMÍREZ, C. A.; REQUNA, J. M.; PUERTA, C. J. Alpha tubulin genes from *Leishmania braziliensis*: genomic organization, gene structure and insights on their expression. **BMC Genomics**, v. 14, n. 454, 2013.

RAMÍREZ, Cesar Augusto *et al.* Identification of proteins interacting with HSP70mRNAs in *Leishmania braziliensis*. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 124–137, 2013.

READY, Paul. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227-250, 2013.

REZENDE, Eloiza; KAWAHARA, Rebeca, PEÑA, Mauricio; PALMISANDO, Giuseppe; STOLF, Beatriz S. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n. 11, e0006090, 2017.

RIBEIRO, Juliana Martins *et al.* Untargeted Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry Metabolomic Investigation Reveals Altered Lipid Content in *Leishmania infantum* Lacking Lipid Droplet Protein Kinase. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, vol. 09, n. 09, 2024.

RICO, Ai *et al.* Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p.347-352, 1998.

RODRIGUEZ, Laura *et al.* Nitrogen heterocycles form peptide nucleic acid precursors in complex prebiotic mixtures. **Scientific Reports**, v. 9, n. 9281, 2019.

ROJO, David *et al.* A multiplatform metabolomic approach to the basis of antimonial action and resistance in *Leishmania infantum*. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.1-20.

RUIZ-POSTIGO, José Antonio *et al.* **World Health Organization**. Global leishmaniasis surveillance, 2022: assessing trends over the past 10 years. Weekly Epidemiological Record, n. 40, 2023. (Geneva: WHO), 2023. Disponível em: https://reliefweb.int/report/world/global-leishmaniasis-surveillance-2022-assessing-trends-over-past-10-years-enfr?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwupGyBhBBEiwA0UcqaHhtqeh_ZwBOSBRjaE3Qgcllw4ImJGsAb0TE3A6bVZsk2IRqwSrKdxoCZ9QQAvD_BwE

SACKS, David; PERKINS, Peter. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, Gustavo Almeida. **Aspectos clínicos, falha de tratamento e recidivas na Leishmaniose visceral: uma abordagem bibliográfica e experimental para relacionar esses fatores com a tolerância medicamentosa de isolados clínicos de *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

SANTOS, Gustavo Almeida *et al.* Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors Associated with the Parasite and Host. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, vol. 08, n. 09, 2023.

SAUNDERS, Eleanor C. Induction of a stringent metabolic response intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. **PLoS Pathogens**, vol. 10, n.1, e1003888, 2014.

SCARPINI, S; DONDI A.; TOTARO, C. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, e.1887, 2022

SHELTEMA, Richard *et al.* The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. **Parasitology**, vol. 137, p. 1291-1302, 2010.

SERENO, Denis. *Leishmania (Mundinia) spp.*: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. **New Microbes and New Infections**, vol. 30, e100540, 2019.

SHAW, Jeffrey. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications.. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 89, n. 03, 471-478, 1994.

SILVA, Ana Marta; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; COOMBS, Graham. H. Metabolic Variation during development in culture of *Leishmania donovani* promastigotes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, e1451, 2011.

SOOD, Chandni *et al.* *Leishmania* hijack host lipid body for its proliferation in macrophages by overexpressing host Rab18 and TRAPPC9 by downregulating miR-1914-3p expression. **PLOS Pathogens**, v. 20, n. 2, e1012024, 2024.

SOUSA, Juliana Mendes. **Perfil metabólico de isolados de *Leishmania (L.) infantum* com diferenças na tolerância à Anfotericina B. Monografia** (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

SPATH, Gerald *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97, n. 16, p. 9258-9263, 2000.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Bhawana Singh. Understanding *Leishmania* parasites through proteomics and implications for the clinic. **Expert Review of Proteomics**, vol. 15, n. 05, p. 371-390, 2018.

TABATABAIE, Fatemeh *et al.* Cloning and sequencing of *Leishmania major* thiol-specific antioxidant antigen (TSA) gene. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 2, n. 4, p. 30-41, 2012.

TANG, Jing, Tan, Chong Yew, Oresic, Matej; VIDAL-PUIG, Antonio. Integrating post-genomic approaches as a strategy to advance our understanding of health and disease. **Genome Medicine**, vol. 01, n. 35, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, Vanete *et al.* Recent Advances in Vaccines Against *Leishmania* Based on Patent Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, vol. 12, n. 01, p. 21-32, 2018.

TKINDT, Ruben *et al.* Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 904, 2010.

TORRES, Karina Cristina Silva. **Avaliação da atividade antileishmanial do extrato de cianobactéria *Nostoc sp.* e sensibilidade à fármacos em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

TORRES-GUERRERO, Edoardo; QUINTANILLA-CEDILO, Marco Romano; RUIZ-ESMENJAUD, Julieta.; ARENAS, Roberto. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, vol. 6, n. 750, 2017.

TOYE, Philip; REMOLD, H. The influence of temperature and serum deprivation on the synthesis of heat-shock proteins and alpha and beta tubulin in promastigotes of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 35, n.1, p.1-10, 1989

VILLAS-BÔAS, Silas Granato; GOMBERT, Andreas Karoly. Análise do Metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, [s. l], ano IX, n. 36, p. 58-69, 2006.

van GRIENSVEN, M. D.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype?. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, vol. 12, n. 08, p. 937-946, 2014.

WALSH, Christopher. Nature loves nitrogen heterocycles. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 23, p. 3075-3081, 2015.

WEISSENBACH, Jean. The rise of genomics. **Comptes Rendus Biologies**, vol. 339, n.7-8, p. 231-239, 2016.

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

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis, 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em 08 out. 2024.

ZHANG, Kai; BEVERLEY, Stephen. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 170, n. 2, p. 55-64, 2010.

ZHENG, Zhiwan *et al.* Integrative genomic, proteomic and phenotypic studies of *Leishmania donovani* strains revealed genetic features associated with virulence and antimony-resistance. **Parasites & Vectors**, vol. 13, n. 510, 2020.