

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 24/06/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

TÚLIO CUSTÓDIO REIS

Síntese do peptídeo L11 e sua contribuição para a inibição da internalização de formas infectantes de *Leishmania amazonensis* em macrófagos: estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea

ARARAQUARA

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

TÚLIO CUSTÓDIO REIS

Síntese do peptídeo Li1 e sua contribuição para a inibição da internalização de formas infectantes de *Leishmania amazonensis* em macrófagos: estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (Área de concentração: Análises Clínicas), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de pesquisa em Parasitologia.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Márcia A. S. Graminha

Coorientadora: Dr^a. Natália C. C. Coelho

ARARAQUARA

2025

R375s Reis, Túlio Custódio.
Síntese do peptídeo Li1 e sua contribuição para a inibição da internalização de formas infectantes de *Leishmania amazonensis* em macrófagos: estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea / Túlio Custódio Reis. – Araraquara, 2025.
110 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de conhecimento: Parasitologia.

Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha.
Coorientadora: Natália Caroline Costa Coelho.

1. Relação hospedeiro-parasito. 2. *Leishmania*. 3. Peptídeos. 4. *L. amazonensis*. 5. Peptídeos sintéticos. I. Graminha, Márcia Aparecida Silva, orient. II. Coelho, Natália Caroline Costa, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Síntese do peptídeo Li1 e sua contribuição para a inibição da internalização de formas infectantes de *Leishmania amazonensis* em macrófagos: estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea

AUTOR: TÚLIO CUSTÓDIO REIS

ORIENTADORA: MÁRCIA A. S. GRAMINHA

COORIENTADORA: NATÁLIA CAROLINE COSTA COELHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de conhecimento: Parasitologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MÁRCIA A. S. GRAMINHA (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. MARCELO SANTOS DA SILVA (Participação Virtual)
Instituto de Química / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 24 de junho de 2025

*Pelo amor e apoio incondicional, dedico
ao meu pai Juarez e a minha avó Rita.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento – 001 – processo nº 8887.820473/2023-00).

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo no 2020/0445-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

E a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), que por meio do processo 01.23.0034.00 (0419/22), também colaborou com fornecimento de recursos para a execução dessa pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (BBAF), a todos os membros do Conselho e à coordenação da professora Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, sempre solícita e disposta a orientar.

Em especial, agradeço à professora Dra. Márcia Graminha, por ter me aceitado e acolhido como seu aluno: foi um longo caminho até este momento, e seu apoio foi imprescindível. Obrigado por confiar em mim e me ensinar o que é fazer pesquisa, e o quanto devemos valorizar e defender um dos bens mais preciosos de nossa sociedade, a Universidade pública. Obrigado por todas as conversas, conselhos e orientações. Você é um grande exemplo a ser seguido! Que todos os pós-graduandos possam ser agraciados com orientadoras como você, para que realizem suas pesquisas com a qualidade que merecem.

Agradeço a Dra. Natália Coelho pela coorientação e acompanhamento durante as etapas de síntese e obtenção dos peptídeos, agradeço também ao Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas (IQ-UNESP) e ao professor Dr. Eduardo Maffud por todo suporte durante os experimentos.

Aos professores que me acompanharam durante o período sanduíche na Universidad de Sevilla (Espanha), Dr. José Ramón Arrebola Burgos (Facultad de Biología) e Dr. Daniel Gutiérrez Praena (Facultad de Farmacia), obrigado pelo acompanhamento e pelos ensinamentos sobre o emprego de métodos alternativos para a experimentação.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (FCF-UNESP), muito obrigado! Ana Clara, Angela, Juliane, Ana Laura, Jhonatan, Maysa, Juliana, Laura e Ana Júlia: durante esses mais de dois anos, pude aprender muito com cada um de vocês, para além do que pode ser ensinado em uma bancada

ou em um labmeeting. Obrigado por participarem da minha formação como pesquisador, obrigado pelas risadas e lágrimas, pelos almoços no RU, pelas mesas de bar, pelos karaokês.... partilhamos tanto, e eu sou muito grato. Amo vocês!

Deixo um agradecimento especial aos professores Dr. Aristeu, Dra. Mara, Dra. Valéria Valente, Dr. Norival Santos-Filho e Dr. Paulo Sanches, que sempre foram solícitos, gentis e atenciosos comigo.

Obrigado as unidades, FCF-UNESP e IQ-UNESP, pela infraestrutura e suporte técnico. Agradeço em especial ao pessoal das seções STPG, STAEPE, faxina, recepção e biotério.

Aos meus amigos Aduino, Caio e Max, obrigado por todo o apoio, pelas risadas, pelos conselhos e por compartilharem tanto comigo! Vocês são mais que amigos para mim, a vida me presenteou com irmãos! Aos meus amigos da Unesp — Matheus, Eloise, Christian, Letícia, Jociel, e Karen — sou muito grato pela nossa amizade. Obrigado por me mostrarem que, na vida, tudo tem um sentido, e que, por vezes, é preciso ter pessoas que nos façam sorrir mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos que fiz em Sevilla — Matheus, Ana Grotto, Martina, Karla, María, Pilar, Ana Luisa, Lucía, Luiza e Santi —, obrigado por terem sido tão acolhedores! Estar em um país diferente, com uma língua diferente, foi muito desafiador, e vocês tornaram tudo mais leve. *“Ya os echo mucho de menos, mis amigos, ojalá nos veamos pronto.”*

Ao meu pai, Juarez, e à minha avó, Rita, pelo apoio e amor incondicional durante toda a minha vida. Agradeço por terem moldado meu caráter e me ensinado a ser uma pessoa digna. Sou muito grato por me mostrarem que o amor pode ser encontrado nos gestos mais simples. *“A coisa mais fina do mundo é o sentimento.”*

Finalmente, ao Universo, à energia criadora que rege todas as coisas, a quem sou profundamente agradecido por me guiar nesta jornada. Sou feliz e abraço tudo o que me ocorreu com gratidão e carinho.

Obrigado.

Eu sei de muito pouco. Mas tenho a meu favor tudo o que não sei e - por ser um campo virgem - está livre de preconceitos. Tudo o que não sei é a minha parte maior e melhor.

Clarice Lispector

Deixe tudo acontecer a você

Beleza e terror

Apenas continue

Nenhum sentimento é definitivo.

Rainer Maria Rilke

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas (DTNs) que afetam populações vulneráveis em países em desenvolvimento. As formas infectantes de *Leishmania*, denominadas promastigotas metacíclicas, são transmitidas pelo vetor flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. No trabalho de Verga et al. (2024), o peptídeo Li1 foi selecionado por *phage display* com base em sua afinidade por formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum*, tendo sua atividade avaliada em modelos de leishmaniose visceral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Já no presente estudo, aprofundou-se a caracterização funcional do Li1, bem como de seu análogo linear Li1nc, no contexto da leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*. Foram conduzidos dois modelos *in vivo* distintos: um de infecção profilática, no qual promastigotas metacíclicas foram previamente tratadas com os peptídeos antes da infecção em camundongos BALB/c, e outro de infecção terapêutica, com administração dos peptídeos após a infecção estar estabelecida. Essa abordagem permitiu explorar o potencial dos peptídeos em diferentes fases da infecção e em um modelo clínico distinto, ampliando a compreensão sobre sua especificidade e eficácia. Promastigotas após incubação com 0,5 mg/mL do peptídeo Li1 apresentaram redução da taxa de infecção para 58,5% em macrófagos murinos e 54% em macrófagos diferenciados de células THP-1, o peptídeo Li1nc reduziu a taxa de infecção para 76,8% em macrófagos murinos e 81,1% em macrófagos THP-1. Interessantemente, os peptídeos também influenciaram no índice de infecção, enquanto o controle para os macrófagos THP-1 apresentou índice de 30,3, os peptídeos Li1 e Li1nc apresentaram índice referente a 15,9 e 24, respectivamente. Para o modelo murino, o controle apresentou índice de 36,7, enquanto Li1 e Li1nc índice referente a 21,3 e 28,2. A interação dos peptídeos com a superfície celular de formas promastigotas procíclicas e metacíclicas foi caracterizada por ensaio de localização celular utilizando microscopia confocal. Adicionalmente, verificou-se que os peptídeos interagem com a superfície celular de ambos os modelos de macrófagos empregados. As moléculas também foram avaliadas em modelo de leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c. Inicialmente, os peptídeos foram avaliados quanto a capacidade de redução da internalização das formas infectantes *in vivo*, para isso, formas metacíclicas foram incubadas previamente com 0,2 mg/mL dos peptídeos e posteriormente empregadas para a infecção em BALB/c. Após 30 dias a carga parasitária foi determinada em 44,8% para o Li1 e 68,9% para o peptídeo Li1nc, ambos reduzindo significativamente a infecção se comparado ao controle não tratado, adicionalmente, as análises bioquímicas não demonstraram danos hepáticos e renais para esses grupos. Em seguida, os peptídeos foram avaliados quanto a capacidade de redução da carga parasitária em infecção já estabelecida em BALB/c. Após 45 dias de infecção os animais foram tratados com 36 mg/Kg/dia dos peptídeos e 2 mg/Kg/dia de anfotericina B. Para esse experimento os peptídeos não foram efetivos, pois não apresentaram valores significativos para a carga parasitária se comparado ao controle não tratado, enquanto a anfotericina B reduziu a carga parasitária para 47,9%. Estes resultados evidenciam que os peptídeos Li1 e Li1nc, embora apresentem estruturas diferentes, ambos interagem com moléculas de superfície em *L. amazonensis* que são importantes para a internalização de formas metacíclicas *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, Li1 apresenta maior interação e eficácia, sugerindo especificidade de ação. Além disso, o fato de Li1nc manter parte da atividade, mas significativamente inferior a Li1, reforça que a atividade está ligada não apenas à sequência de resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica, mas à estrutura cíclica do peptídeo.

Palavras-chave: Interação parasito-hospedeiro; *L. amazonensis*; peptídeos sintéticos.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), leishmaniasis are neglected tropical diseases (NTDs) that affect vulnerable populations in developing countries. The infective forms of *Leishmania*, called metacyclic promastigotes, are transmitted by the phlebotomine vector during the blood meal. In the study by Verga et al. (2024), the Li1 peptide was selected by phage display based on its affinity for metacyclic promastigote forms of *Leishmania infantum*, and its activity was evaluated in visceral leishmaniasis models, both in vitro and in vivo. In the present study, the functional characterization of Li1 was further explored, along with its linear analogue Li1nc, in the context of cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. Two distinct in vivo models were conducted: a prophylactic infection model, in which metacyclic promastigotes were pre-treated with the peptides prior to infection in BALB/c mice, and a therapeutic infection model, in which the peptides were administered after infection was established. This approach allowed for the investigation of the peptides' potential at different stages of infection and in a distinct clinical model, thereby expanding the understanding of their specificity and efficacy. Promastigotes after incubation with 0.5 mg/mL of peptide Li1 showed a reduction in the infection rate to 58.5% in murine macrophages and 54% in THP-1 cell-derived macrophages, the Li1nc peptide reduced the infection rate to 76.8% in murine macrophages and 81.1% in THP-1 macrophages. Interestingly, the peptides also influenced the infection index, while the control for THP-1 macrophages showed an index of 30.3, peptides Li1 and Li1nc showed indices of 15.9 and 24, respectively. For the murine model, the control showed an index of 36.7, while Li1 and Li1nc showed indices of 21.3 and 28.2. The interaction of the peptides with the cell surface of procyclic and metacyclic promastigote forms was characterized by a cell localization assay using confocal microscopy. Additionally, it was found that the peptides interact with the cell surface of both macrophage models used. The peptides were evaluated in a cutaneous leishmaniasis model in BALB/c mice. Initially, the peptides were evaluated for their ability to reduce the internalization of infective forms in vivo, for this, metacyclic promastigotes were previously incubated with 0.2 mg/mL of the peptides and later used for infection in BALB/c. After 30 days, the parasitic load was determined at 44.8% for Li1 and 68.9% for peptide Li1nc, both significantly reducing the infection compared to the untreated control, additionally, biochemical analyses did not show hepatic or renal damage for these groups. Next, the peptides were evaluated for their ability to reduce the parasitic load in already established infection in BALB/c. After 45 days of infection, the animals were treated with 36 mg/kg/day of the peptides and 2 mg/kg/day of amphotericin B. For this experiment, the peptides were not effective, as they did not show significant values for the parasitic load compared to the untreated control, while amphotericin B reduced the parasitic load to 47.9%. These results demonstrate that peptides Li1 and Li1nc, despite having different structures, both interact with surface molecules of *L. amazonensis* that are important for the internalization of metacyclic promastigote forms in vitro and in vivo. However, Li1 exhibits greater interaction and efficacy, suggesting specificity of action. Moreover, the fact that Li1nc retains partial activity, albeit significantly lower than that of Li1, further supports that the activity is related not only to the amino acid sequence of the peptide chain but also to the cyclic structure of the peptide.

Keywords: Parasite-host interaction; *L. amazonensis*; synthetic peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	23
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da membrana plasmática de <i>Leishmania</i> spp.	29
Figura 3 - Estrutura do peptídeo Li1	55
Figura 4 - Estrutura do peptídeo Li1nc	55-56
Figura 5 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1 bruto não biotinilado e não cíclico, obtido por ionização positiva, com destaque para o pico +2-675,45	58
Figura 6 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1 bruto biotinilado obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos apresentando tempo de retenção de 5 minutos	59
Figura 7 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1 bruto biotinilado, com destaque para os picos +2-788,30 e +3-525,97	59-60
Figura 8 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1 bruto biotinilado e cíclico obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 5,3 minutos	60
Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1 puro biotinilado e cíclico obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 5,2 minutos	61
Figura 10 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1 biotinilado e cíclico puro, com destaque para os picos +3-525,17 e +2-787,08	62
Figura 11 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1nc bruto não biotinilado, obtido por ionização positiva com destaque para os picos +2-659,30 e +3-439,98	63-64
Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1nc bruto biotinilado obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 5,5 minutos	63

Figura 13 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1nc bruto biotilado, obtido por ionização positiva com destaque para o pico +2-772,43 e +3-515,54	64
Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1nc puro biotilado obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 4,7 minutos	64
Figura 15 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1nc biotilado puro, obtido por ionização positiva com destaque para os picos +3-515,44 e +2-772,27	65
Figura 16 - Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i>	66-67
Figura 17 - Taxa de infecção de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos murino (Cinza escuro) e THP-1(Cinza claro) pós-exposição aos peptídeos Li1 e Li1nc. *: Diferença estatisticamente significativa dos grupos teste se comparado aos seus respectivos grupos controle ($P < 0.05$); α : Diferença significativa entre o mesmo modelo/peptídeos diferentes ($P < 0.01$). Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	68
Figura 18 - Índice de infecção de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em modelos de macrófagos murino e THP-1 pós-exposição aos peptídeos Li1 e Li1nc. *: Diferença estatisticamente significativa dos grupos teste se comparado aos seus respectivos grupos controle ($P < 0.05$); α : Diferença significativa entre o mesmo modelo/peptídeos diferentes ($P < 0.001$); β : Diferença significativa entre o mesmo peptídeo/modelos diferentes ($P < 0.01$). Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer	69
Figura 19 - Viabilidade celular das formas promastigotas em fase logarítmica e estacionária pós exposição aos peptídeos na concentração de 0,5 mg/mL. *: Diferença significativa se comparado respectivo grupo controle ($P < 0.05$); α : Diferença estatisticamente significativa se comparado a Li1 logarítmica ($P < 0.01$); β : Diferença significativa se comparado a Li1 logarítmica ($P < 0.05$). Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	71
Figura 20 - Viabilidade celular dos macrófagos dos grupos controle, THP-1 e murino pós exposição aos peptídeos na concentração de 0,5 mg/mL. Não houve diferenças significativas para os diferentes grupos analisando-se pelo teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	73

Figura 21 - Ensaio de microscopia confocal com formas procíclicas de <i>L. amazonensis</i> , com destaque para o sinal acentuada para o corpo celular e flagelo do grupo Li1.....	74
Figura 22 - Ensaio de microscopia confocal com formas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i> , com destaque para o sinal acentuada para o corpo celular e flagelo do grupo Li1.....	75
Figura 23 - Ensaio de microscopia confocal com macrófago THP-1, com destaque para o sinal acentuado do grupo Li1.....	77
Figura 24 - Ensaio de microscopia confocal com macrófago murino, com destaque para o sinal acentuado do grupo Li1nc	78
Figura 25 - Peso (g) dos animais sadios, controle, infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1 e infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1nc. Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	80
Figura 26 - Espessura da pata (mm) dos animais controle e infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1 e infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1nc. Valores apresentados em média e desvio padrão. *: Diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo controle (P<0.05). Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	81
Figura 27 - Carga parasitária obtida pelo método de diluição limitante apresentada em percentual (%). Valores apresentados em média e desvio padrão. *: Diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo controle (P<0.05). Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	82
Figura 28 - Níveis plasmáticos de biomarcadores de função hepática e renal em camundongos BALB/c sadios, controle, infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1 e infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1nc. Valores apresentados em média e desvio padrão. *: Diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo infectado (não tratado) (P<0.05). α: Diferença significativa se comparado ao grupo sadio (P<0.05). Teste estatístico ANOVA <i>one-way</i> seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	83-84
Figura 29 - Peso (g) dos animais sadios, controle, infectados e tratados com o peptídeo Li1, infectados e tratados com o peptídeo Li1nc, infectados e tratados com o veículo PBS, infectados	

e tratados com anfotericina B. Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....86

Figura 30 - Espessura da pata (mm) dos animais sadios, controle, infectados e tratados com o peptídeo Li1, infectados e tratados com o peptídeo Li1nc, infectados e tratados com o veículo PBS, infectados e tratados com anfotericina B. Valores apresentados em média e desvio padrão.

*: Diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo controle ($P < 0.001$). α : Diferença significativa se comparado ao grupo controle ($P < 0.05$). Teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....87

Figura 31 - Carga parasitária obtida pelo método de diluição limitante apresentada em percentual (%). Valores apresentados em média e desvio padrão. *: Diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo controle ($P < 0.001$). Teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....88

Figura 32 - Níveis plasmáticos de biomarcadores de função hepática e renal em camundongos BALB/c sadios, controle, infectados e tratados com peptídeo Li1, infectados e tratados com peptídeo Li1nc, infectados e tratados com o veículo PBS e infectados e tratados com anfotericina B. *: Diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo controle ($P < 0.05$). α : Diferença significativa se comparado ao grupo sadio ($P < 0.05$). β : Diferença significativa se comparado ao grupo tratado com o veículo PBS ($P < 0.05$). #: Diferença significativa se comparado ao grupo tratado com anfotericina B ($P < 0.05$). Teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....90-91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos do primeiro ensaio <i>in vivo</i>	52
Tabela 2 - Grupos do segundo ensaio <i>in vivo</i>	53
Tabela 3 - Rendimento de síntese dos peptídeos	56
Tabela 4 - Dados do processo de purificação dos peptídeos	65
Tabela 5 - Viabilidade celular das formas promastigotas em fase logarítmica e estacionária após exposição a concentrações de 0,5; 0,7 e 1,0 mg/mL dos peptídeos	70-71
Tabela 6 - Viabilidade celular dos macrófagos murino e THP-1 após exposição a concentrações de 0,5; 0,7 e 1,0 mg/mL dos peptídeos	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPPG	Proteofosfoglicano secretado por amastigota
BOD	incubadora
C3	Componente 3 do sistema complemento
C3a	anáfilatoxina C3a
C3b	Fragmento b de C3
C3bi	Fragmento inativo de C3b
C4a	anáfilatoxina C5a
C5a	anáfilatoxina C5a
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CD86	<i>Cluster</i> de Diferenciação 86
CHO	Células do ovário de hamster chinês
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CR1	Receptor do complemento tipo 1
CR3	Receptor do complemento tipo 3
CRs	Receptores do complemento
CS .	Citrato sintase
CXCL10	ligante 10 da quimiocina do motivo C-X-C
CXR3	Receptor de quimiocina C-X-C 3
DCs –	Células dendríticas
DIC	N,N-Diisopropilcarbodiimida
DIEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DODT	3,6-dioxa-1,8-octanodithiol
DTN	Doença tropical negligenciada
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EVs	Vesículas extracelulares
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila

fPPG	Mucina filamentosa semelhante ao proteofosfoglicano
FTs	Fatores de transcrição
GIPL	Glicofosfatidilinositol
GP46	Glicoproteína de 46 kDa
GP63	Glicoproteína de 63 kDa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSL	Glicoesfingolípido
HASP	Proteína hidrofílica acilada de superfície
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
ICDH	Isocitrato desidrogenase específica para NADP
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-32	Interleucina-32
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK-1	Quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1
JAR2	Janus quinase 2
kDa	quilo Dalton
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
KMP-11	Proteína de membrana cinetoplastídea 11
LAMP-1	Proteína de membrana associada ao lisossomo 1
LASEBIO	Laboratório de síntese e estudos de biomoléculas
LBqBMT	Laboratório de bioquímica e biologia molecular de tripanossomatídeos

LC	Leishmaniose cutânea
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LRRs	Repetições ricas em leucina
LV	Leishmaniose visceral
m	Massa
M	Molar
MDH	L-malato desidrogenase
ME	Malato desidrogenase
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade II
MO	Microscopia óptica
mPPG	Proteofosfoglicano de membrana
MSP	Principal protease de superfície
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NH ₃	Amônia
NLRP3	Receptor do tipo NOD-like contendo domínio piridina 3
NO	Óxido nítrico
NOD2	Proteína 2 contendo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos
-OH	Hidroxila
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCBPs	Proteínas de ligação ao poli (rC)
PGE2	Prostaglandina E2
Pi	Fosfato inorgânico

PKA	Proteína quinase A
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMS	Metilsulfato de fenazina
PPG	Proteofosfoglicano
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PS	Fosfatidilserina
PSA2	Antígeno 2 de superfície promastigota
PSG	Gel secretório de promastigota
PTPs	Proteínas tirosina fosfatas
PTR1	Pteridina redutase 1
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
SDH	Succinato desidrogenase
SFB	Soro fetal bovino
SHERP	Proteína hidrofílica associada ao retículo endoplasmático
SHP-1	Fosfatase 1 contendo o domínio de homologia da região 2 de Src
sPPG	Proteofosfoglicano solúvel
SPPS	Síntese peptídica em fase sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TIS	Triisopropilsilano
TLR-2 –	Receptor do tipo Toll-2
TLR-4	Receptor do tipo Toll-4
TLR-9	Receptor do tipo Toll-9
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPL2	Locus de progressão tumoral 2

VAMP8 Proteína de membrana asociada a vesícula 8
z Carga

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 LEISHMANIOSES	22
2.2 CICLO BIOLÓGICO	23
2.3 METACICLOGÊNESE	24
2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE SUPERFÍCIE – DETERMINANTES PARA A INTERAÇÃO <i>Leishmania</i> -CÉLULA HOSPEDEIRA	29
2.4.1 Componentes do glicocálice de superfície	30
2.4.2 Proteases ancoradas a GPI.....	36
2.3 PEPTÍDEOS SELECIONADOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> EM PROTOZOÁRIOS E <i>Leishmania</i> spp.	40
3. OBJETIVO	42
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 SÍNTESE PEPTÍDICA	43
4.1.1 Peptídeos	43
4.1.2 Síntese de peptídeos	43
4.1.3 Biotinilação peptídica.....	44
4.1.4 Reação de clivagem peptídica, precipitação e extração	44
4.1.5 Reação de oxidação e ciclização peptídica.....	45
4.1.6 Purificação dos peptídeos.....	45
4.1.7 Espectrometria de massas.....	46
4.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	46
4.2.1 Cultivo de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	46
4.2.2 Determinação da curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i>	46
4.2.3 Purificação de formas metacíclicas por gradiente de densidade de ficoll	47
4.2.4 Cultivo, adesão e diferenciação de célula THP-1.....	47
4.2.5 Obtenção e adesão de macrófago murino peritoneal.....	48
4.2.6 Avaliação da atividade antipromastigota	48
4.2.7 Avaliação da citotoxicidade frente macrófagos peritoneais murinos e diferenciados de células THP-1	49
4.2.8 Avaliação do efeito dos peptídeos frente o índice e taxa de infecção de <i>L. amazonensis in vitro</i>	50

4.2.9 Ensaio de localização celular	51
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PEPTÍDEOS FRENTE CARGA PARASITÁRIA <i>IN VIVO</i> EM MODELO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM CAMUNDONGO BALB/C	52
4.3.1 Infecção com promastigotas pós-exposição aos peptídeos	52
4.3.2 Infecção e posterior tratamento com os peptídeos	53
4.3.3 Parâmetros bioquímicos: biomarcadores renais e hepáticos do ensaio <i>in vivo</i>	54
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	55
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO	67
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PEPTÍDEOS FRENTE O ÍNDICE E TAXA DE INFECÇÃO DE <i>L. amazonensis</i> <i>IN VITRO</i>	67
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA.....	70
5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE MACRÓFAGOS MURINOS E THP-1	72
5.5 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR	74
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PEPTÍDEOS FRENTE A CARGA PARASITÁRIA <i>IN VIVO</i> E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	81
5.6.1 Infecção com promastigotas pós-exposição aos peptídeos	81
5.6.1 Infecção e posterior tratamento com os peptídeos	87
6. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Leishmania* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) é um parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear, parasitando principalmente macrófagos (Gregory; Olivier, 2005). Este protozoário foi identificado por Cunningham (1885) e posteriormente descrito por Charles Donovan (1903) e William Leishman (1900) (Peters *et al.*, 1988). São organismos heterotróficos pertencentes à classe Kinetoplastea (ordem Trypanosomatida) (Valigurová; Kolářová, 2023).

Os tripanossomatídeos, incluem protozoários monoxenos e heteroxenos que parasitam invertebrados, vertebrados e plantas. Além das espécies de *Leishmania*, alguns exemplos incluem os gêneros *Trypanosoma*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas* (Frolov, 1994). Como outros tripanossomatídeos, esse parasita possui uma única mitocôndria ramificada com uma região especializada chamada cinetoplasto, que contém DNA mitocondrial (kDNA) concentrado e complexo (Cavalcanti; Souza, 2018). A transmissão desse parasita para o hospedeiro mamífero ocorre durante a alimentação sanguínea da fêmea infectada do vetor flebotomíneo, representado no Novo Mundo pelo gênero *Lutzomyia* e no Velho Mundo pelo gênero *Phlebotomus* (Mann *et al.*, 2021; Tom *et al.*, 2024).

As moléculas de superfície em *Leishmania* spp., como lipofosfoglicanos e glicoproteínas, são importantes fatores de virulência empregados pelo parasita para evasão e infecção, além disso, se bem caracterizadas essas moléculas podem ser exploradas para o desenvolvimento racional de fármacos e vacinas (Okwor; Uzonna, 2008; Sáenz-García *et al.*, 2020 e De Paula *et al.*, 2022; Mazumder *et al.*, 2023). Apesar do conhecimento acumulado sobre moléculas de superfície, a caracterização funcional de ligantes específicos capazes de interferir na infecção celular permanece limitada, especialmente aqueles identificados por técnicas avançadas como o *phage display* (Rhaiem; Houimel, 2016). Entre os ligantes identificados em *Leishmania* spp., destaca-se o peptídeo Li1 obtido por *phage display* por Verga *et al.*, (2024), cuja interação com a superfície parasitária resultou em expressiva redução da infecção em modelos experimentais. As moléculas de superfície que interagem com esses ligantes são expressas em altos níveis após a metaciclogênese, o que implica, dentre outros fatores, no sucesso parasitário das formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* e no estabelecimento da leishmaniose no hospedeiro mamífero.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que, nas concentrações avaliadas, os peptídeos Li1 e Li1nc não apresentaram citotoxicidade para macrófagos THP-1 ou peritoneais murinos, tampouco atividade leishmanicida direta sobre promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica ou estacionária. No entanto, a incubação prévia de formas metacíclicas com os peptídeos resultou em redução significativa da taxa e do índice de infecção *in vitro* em ambos os modelos de macrófagos, bem como da carga parasitária *in vivo* em camundongos BALB/c. Os peptídeos também demonstraram interação com a superfície de formas procíclicas e metacíclicas, além de interação com os macrófagos, conforme evidenciado por microscopia confocal. Por outro lado, quando administrados após o estabelecimento da infecção, os peptídeos não foram eficazes na redução da carga parasitária.

A comparação entre os peptídeos Li1 e Li1nc sugere que a estrutura cíclica da molécula desempenha papel essencial para sua eficácia, já que ambos compartilham a mesma sequência primária de aminoácidos, diferindo apenas pela substituição das cisteínas e pela ausência de ciclização em Li1nc. A especificidade funcional do Li1 foi validada por múltiplas abordagens independentes, e o desempenho superior frente ao peptídeo linear reforça que sua atividade está relacionada à conformação estrutural. Este estudo complementa e expande os achados de Verga et al. (2024), que avaliaram o peptídeo Li1 frente a *L. infantum*, agente da leishmaniose visceral, ao demonstrar que o mesmo peptídeo também é eficaz frente a *L. amazonensis*, espécie envolvida na leishmaniose cutânea, clinicamente distinta e associada a mecanismos de evasão imune mais complexos. A inclusão de *L. amazonensis* como modelo experimental permitiu investigar a ação do Li1nc em um contexto biológico e imunopatológico diverso, revelando que a interação do peptídeo com moléculas de superfície do parasito é mantida mesmo diante de diferenças estruturais entre espécies. Esses dados ampliam o entendimento sobre o espectro de ação do Li1, reforçam sua especificidade funcional e destacam seu potencial como ferramenta promissora em abordagem de tratamento profilático frente à leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, T.; HARBECKE, D.; ILG, T. Proteophosphoglycan, a major secreted product of intracellular *Leishmania mexicana* amastigotes, is a poor B-Cell antigen and does not elicit a specific conventional CD4 + T-Cell response. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5379–5385, out. 1999.
- AIKAWA, M. et al. Interactions between macrophagelike cells and *Leishmania braziliensis* in vitro. **The American Journal of Pathology**. 1982 Jul;108(1):50-9. PMID: 7091302; PMCID: PMC1916017.
- ALFALEH, M. A. et al. Phage display derived monoclonal antibodies: From bench to bedside. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-37, 28 ago. 2020.
- ALMEIDA, L. Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* e potenciais mecanismos de ação. 2017. 130 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2017.
- ANTONIA, A. L. et al. Pathogen evasion of chemokine response through suppression of CXCL10. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 7 ago. 2019.
- AO, F. The classification of the morphological forms of flagellates in the family Trypanosomatidae. **Parazitologiya**, v. 28, n. 4, p. 261–269, jul. 1994.
- ARJMAND, M. et al. Metabolomics-based study of logarithmic and stationary phases of promastigotes in *Leishmania major* by 1 H NMR spectroscopy. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 2, p. 77–83, 2016.
- ASSIS, R. R. et al. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1543, 28 fev. 2012.
- BAEK, K.-H. et al. Infectivity and drug susceptibility profiling of different *Leishmania*-host cell combinations. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 393, 20 maio 2020.
- BANDYOPADHYAY, P. et al. Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: Species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 411–411, 1 jun. 1991.
- BANDYOPADHYAY, P. et al. Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: Species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 411–411, 1 jun. 1991.
- BAO, X. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of anisatin in mouse blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **BioMed Research International**, v. 2020, n. 1, jan. 2020.
- BASMENJ, E. R. et al. Engineering and design of promising T-cell-based multi-epitope vaccine candidates against leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 8 nov. 2023.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.

BATES, P. A.; TETLEY, L. *Leishmania mexicana*: Induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. **Experimental Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 412–423, jun. 1993.

BEETHAM, J. K. et al. Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17360–17366, 1 jul. 1997.

BELLO, A. R. et al. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 24, p. 11442–11446, 22 nov. 1994.

BERBERICH, C. et al. The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1442, n. 2-3, p. 230–237, nov. 1998.

BHATTACHARYA, A.; BISWAS, A.; DAS, P. K. Identification of a protein kinase A regulatory subunit from *Leishmania* having importance in metacyclogenesis through induction of autophagy. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 548–564, 4 jan. 2012.

BOELAERT, M. Clinical research on neglected tropical diseases: Challenges and solutions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 1-11, 3 nov. 2016.

BRITTINGHAM, A. et al. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4477–4484, 1 set. 1999.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102–3111, 15 set. 1995.

BURGGRAF, R.; ALBERT, M. In-vivo cross-linking of biotinylated peptide ligands to cell surface receptors. **Methods in Molecular Biology**, p. 217–230, 30 nov. 2023.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Tietz: fundamentals of clinical chemistry. 5th. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 1091 p.

BUXBAUM, L. U. *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 9 maio 2013.

CARRILLO, E. et al. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1902–1911, mar. 2008.

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. **Scanning**, v. 2018, n. 9603051, p.1-10, jun. 2018.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 07 abr. 2025.

CHA, S. J. et al. Identification of GAP DH on the surface of *Plasmodium* sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 10, p. 2099–2112, 19 set. 2016.

- CHA, S.-J.; MCLEAN, K. J.; JACOBS-LORENA, M. Identification of *Plasmodium* GAPDH epitopes for generation of antibodies that inhibit malaria infection. **Life science alliance**, v. 1, n. 5, p. 1-9, 18 set. 2018.
- CHAN, A. et al. The role of *Leishmania* GP63 in the modulation of innate inflammatory response to *Leishmania major* infection. **PLoS ONE**, v. 16, n. 12, p. 1-27, 1 dez. 2021.
- CHAVES, C. S. et al. Characterization of the species- and stage-specificity of two monoclonal antibodies against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 103, n. 3-4, p. 152–159, 1 mar. 2003.
- CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1–13, abr. 2010.
- COELHO, N. C. C. Oportunidades de controle das leishmanioses: planejamento, síntese, caracterização e bioconjugação de peptídeos a agentes leishmanicidas. 2022. 163 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologias Aplicadas a Farmácia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2022.
- CONIBEAR, A. C. et al. Approaches to the stabilization of bioactive epitopes by grafting and peptide cyclization. **Biopolymers**, v. 106, n. 1, p. 89–100, 14 nov. 2015.
- CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 319–342, 1 fev. 2002.
- DA SILVA JR, I. A. et al. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 1 jan. 2015.
- DAVIES, C. R. et al. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 101, n. 3, p. 337–343, dez. 1990.
- DE LIMA, J.P.S. et al. In vivo antileishmanial activity of *Annona mucosa* extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 1 jan. 2020.
- DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; CRISTINA, D. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-6, 13 out. 2015.
- DE PAULA, J. I. et al. The screen of a phage display library identifies a peptide that binds to the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and impairs their infection of mammalian cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-8, 10 mar. 2022.
- DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: A 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 23, p. 1–18, 14 set. 2022.
- DEGHANI, A. et al. Multi-epitope vaccine design against leishmaniasis using IFN- γ inducing epitopes from immunodominant gp46 and g63 proteins. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 1 mar. 2024.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1455, n. 2-3, p. 341–352, out. 1999.

DIAS-LOPES, G. et al. Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105956, 1 ago. 2021.

DOEHL, J. S. P. et al. Leishmania HASP and SHERP genes are required for in vivo differentiation, parasite transmission and virulence attenuation in the host. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1-35, 1 jan. 2017.

DOS SANTOS, J. C. et al. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World *Leishmania* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005413, 27 fev. 2017.

ELAGAMY, A. et al. Iodine-mediated synthesis of 2-(Methylthio)-4 H-chromen-4-ones and study of their halogenation reactions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 9478–9489, 16 jul. 2021.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M. Insights into *Leishmania* molecules and their potential contribution to the virulence of the parasite. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 2, p. 1–21, 1 fev. 2021.

ENNES-VIDAL, V. et al. Calpains of *Leishmania braziliensis*: Genome analysis, differential expression in metacyclogenesis and effects of MDL28170. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 7, p. 1-12, 1 jul. 2019.

ESTRADA-FIGUEROA, L. A. et al. *Leishmania mexicana* gp63 is the enzyme responsible for cyclooxygenase (COX) activity in this parasitic protozoa. **Biochimie**, v. 151, p. 73–84, 1 ago. 2018.

FADAIE, M.; ZABIHOLLAH SHAHMORADI; HOSSEIN KHANAHMAD. Immunoinformatic approach to the design of a novel multi-epitope vaccine against *Leishmania major* fused to human IgG-Fc. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 6, p. 729–745, 1 nov. 2024.

FONSECA, B. DE P.; ALBUQUERQUE, P. C.; ZICKER, F. Neglected tropical diseases in Brazil: lack of correlation between disease burden, research funding and output. **Tropical Medicine and International Health**, v. 25, n. 11, p. 1373–1384, 17 set. 2020.

FOTH, B. et al. *Leishmania major* proteophosphoglycans exist as membrane-bound and soluble forms and localise to the cell membrane, the flagellar pocket and the lysosome. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 14, p. 1701–1708, 1 dez. 2002.

GENESTRA, M. et al. Protein Kinase A of *Leishmania amazonensis* as a potential target for methoxy-amidine. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 11, p. 920–923, 26 dez. 2001.

GOGULAMUDI, V. R. et al. Downregulation of host tryptophan–aspartate containing coat (TACO) gene restricts the entry and survival of *Leishmania donovani* in human macrophage model. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 13 out. 2015.

GOMEZ, M. A. et al. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. **Science Signaling**, v. 2, n. 90, p. ra58–ra58, 29 set. 2009.

- GÓMEZ, M. A.; OLIVIER, M. Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction: Paving the road for pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 4, p. 314–318, jul. 2010.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 1 set. 2003.
- GOUJON, A. et al. Streptavidin interfacing as a general strategy to localize fluorescent membrane tension probes in cells. **Chemical Science**, v. 10, n. 1, p. 310–319, 2019.
- GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v.130, n.1, p.27–35, mar. 2005.
- GUAY-VINCENT, M. M. et al. Revisiting *Leishmania* GP63 host cell targets reveals a limited spectrum of substrates. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 10, 1 out. 2022.
- GUINET, F. et al. Accurate quantitation of *Leishmania* infection in cultured cells by flow cytometry. **Cytometry**, v. 39, n. 3, p. 235, 1 mar. 2000.
- GUREL, M. S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in Dermatology**, v. 38, n. 2, p. 140–151, mar. 2020.
- HANDMAN, E. et al. The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 189–200, 1 nov. 1995.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, ago. 2002.
- HASSANI, K. et al. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95007, 15 abr. 2014.
- HASSANI, K. et al. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e18724, 3 maio 2011.
- HEIDLER, P.; LINK, A. N-Acyl-N-alkyl-sulfonamide anchors derived from kenner's safety-catch linker: Powerful tools in bioorganic and medicinal chemistry. **ChemInform**, v. 36, n. 20, 19 abr. 2005.
- HERRERA, L. et al. Antileishmanial activity of a new chloroquine analog in an animal model of *Leishmania panamensis* infection. **International Journal for Parasitology Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 56–61, 15 ago. 2020.
- HORTON, D. A.; BOURNE, G. T.; SMYTHE, M. L. Exploring Privileged Structures: The Combinatorial Synthesis of Cyclic Peptides. **ChemInform**, v. 34, n. 30, 10 jul. 2003.
- HSIAO, C-H. C. et al. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 148–159, 1 fev. 2008.
- ILG, T. et al. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21583–21596, ago. 1996.

- ILG, T. et al. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. **European Journal of Cell Biology**, v. 66, n. 2, p. 205–15, 1 fev. 1995.
- ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 489–497, nov. 2000.
- JARDIM, A. et al. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan T lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 10, p. 3538–3544, 15 nov. 1991.
- JAROSZEWICZ, W. et al. Phage display and other peptide display technologies. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 2, 21 out. 2021.
- JOO, S. H. Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 2012.
- JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 33–40, 2002.
- KAUSHAL, R. S. et al. *Leishmania* species: A narrative review on surface proteins with structural aspects involved in host–pathogen interaction. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 102, n. 2, p. 332–356, 28 abr. 2023.
- KAVOOSI, G. et al. *Leishmania major*: Effects of proteophosphoglycan on reactive oxygen species, IL-12, IFN- γ and IL-10 production in healthy individuals. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 62–66, 5 maio 2008.
- KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1193–1199, 27 jul. 2009.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 jul. 2011.
- KEDZIERSKI, L. et al. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor. **The Journal of Immunology**, 3. v. 172, n. 8, p. 4902–4906, 15 abr. 2004.
- KEMP, M. et al. Activation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 33, n. 2, p. 219–224, fev. 1991.
- KHAN, S. et al. Targeting *Plasmodium* life cycle with novel parasite ligands as vaccine antigens. **Vaccines**, v. 12, n. 5, p. 484, 2024.
- KHANRA, S. et al. In vivo experiments demonstrate the potent antileishmanial efficacy of repurposed suramin in visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008575–e0008575, 31 ago. 2020.
- KNUDSEN, A. S. et al. Enhancing neutralization of *Plasmodium falciparum* using a novel monoclonal antibody against the rhoptry-associated membrane antigen. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 23 fev. 2022.

- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, jan. 2011.
- KUMAR, P.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Degradation of pteridine reductase 1 (PTR1) enzyme during growth phase in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 182–189, jun. 2007.
- LACERDA, D. I. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 238–245, 1 mar. 2012.
- LAUTERBACH, S. B.; LANZILLOTTI, R.; COETZER, T. L. Construction and use of *Plasmodium falciparum* phage display libraries to identify host parasite interactions. **Malaria Journal**, v. 2, p. 1-4, 17 dez. 2003.
- LEDSGAARD, L. et al. Advances in antibody phage display technology. **Drug Discovery Today**, v.27, n. 8, p. 2151-2169, maio 2022.
- LINCOLN, L. M. et al. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 185–189, 1 set. 2004.
- LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3, p. 256–265, mar. 2005.
- LOHMAN, K. L.; LANGER, P. J.; MCMAHON-PRATT, D. Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8393–8397, nov. 1990.
- LOUASSINI, M. et al. Activity of key enzymes in glucose catabolism during the growth and metacyclogenesis of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 85, n. 4, p. 300–306, 17 fev. 1999.
- LUDOLF, F.; RAMOS, F. F.; COELHO, E. A. F. Immunoproteomics and phage display in the context of leishmaniasis complexity. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1112894, ago. 2023.
- M. OUAKAD et al. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1392–1399, 8 ago. 2011.
- MACEDO, C. S. et al. Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis, **Biochimie** 85, 465–472, 2003.
- MACLEAN, L. M. et al. Trafficking and release of *Leishmania* metacyclic HASPB on macrophage invasion. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 740–761, maio 2012.
- MALDE, A. K. et al. Crystal structures of protein-bound cyclic peptides. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 17, p. 9861–9914, 2 maio 2019.
- MANN, S. et al. A Review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p.1–12, 17 mar. 2021.

- MANZANO, J. I. et al. Leishmania LABC1 and LABC2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: Functional linkage with autophagy. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 2-12, 30 maio 2017.
- MARSHALL, S. et al. Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 19 jun. 2018.
- MATHEOUD, D. et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 1, p. 15–25, jul. 2013.
- MATOS, D. C. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 341–347, maio 2010.
- MATTE, C. et al. *Leishmania major* promastigotes evade LC3-associated phagocytosis through the action of GP63. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005690, 9 jun. 2016.
- MAZUMDER, S. et al. *Leishmania* LPG interacts with LRR5/LRR6 of macrophage TLR4 for parasite invasion and impairs the macrophage functions. **Pathogens and Disease**, v. 81, p. 1-14, 1 jan. 2023.
- MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3593–3600, out. 1992.
- MCCONVILLE, M. J. et al. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15595–15604, 1 jul. 1993.
- MCCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The glycoinositolphospholipid profiles of two *Leishmania major* strains that differ in lipophosphoglycan expression. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 57–67, jan. 1990.
- MCMAHON-PRATT, D. et al. Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 151–160, 1 jan. 1992.
- MCMAHON-PRATT, D. et al. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania infection*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 8, p. 3351–3359, 1 ago. 1993.
- MEARS, E. R. et al. A review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** v. 9, n. 9, p. e0003889–e0003889, 3 set. 2015.
- MEDINA-ACOSTA, E. et al. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 263–273, 1 dez. 1989.

- MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-6, abril. 2012.
- MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **Biochemistry**, v. 3, n. 9, p. 1385-1390, set. 1964.
- MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 422-429, jul. 2008.
- MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 146, n. 3, p. 232-246, mar. 2019.
- MOREIRA, V. P. et al. Novel selective and low-toxic inhibitor of LmCPB2.8 Δ CTE (CPB) one important cysteine protease for *Leishmania* virulence. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1903, 19 dez. 2022.
- MUSKUS, C. E.; MARÍN VILLA, M. Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. **Biomédica**, v. 22, n. 2, p. 167-177, 1 jun. 2002.
- MUTING, D.; KAISER E. On quantitative determination of alpha-amino nitrogen in biological material using the ninhydrin reaction. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 332, p. 276-281, 1963.
- MUTISO, J. M. et al. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a combination therapy of diminazene and artesunate against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 3, p. 129-132, jun. 2011.
- NADERER, T.; VINCE, J. E.; MCCONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 649-665, 31 ago. 2004.
- NOGUEIRA, P. M. et al. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1-17, 10 ago. 2016.
- NOGUEIRA, P. M. et al. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004848, 10 ago. 2016.
- NWANESHIUDU, A. et al. Introduction to confocal microscopy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 12, p. 1-5, dez. 2012.
- O'KEEFFE, A. et al. Development of an in vitro media perfusion model of *Leishmania major* macrophage infection. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219985-e0219985, 24 jul. 2019.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. **Immunologic Research**, v. 41, n. 2, p. 123-136, 4 abr. 2008.
- OLIVEIRA, B. L.; GUO, Z.; BERNARDES, G. J. L. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 16, p. 4895-4950, 2017.

OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 1 dez. 2012.

OLIVIER, M.; HASSANI, K. Protease inhibitors as prophylaxis against leishmaniasis: new hope from the major surface protease gp63. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 539–542, 1 abr. 2010.

PACHER, G. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis using FTIR spectroscopy and machine learning: An animal model study. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 467–474, 8 jan. 2024.

PAHO - Pan American Health Organization. **World Health Organization (WHO)**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 07 abr. 2025.

PAIXÃO, A. R. et al. Investigating the phagocytosis of *Leishmania* using confocal microscopy. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2021, n. 173, p. 1-15, 1 jul. 2021.

PAWAR, S. V. et al. Synthesis and anti-leishmanial activity of TRIS-glycine- β -alanine dipeptidic triazole dendron coated with nonameric mannoside glycocluster. **Carbohydrate Research**, v. 485, p. 107815, nov. 2019.

PEREIRA-SILVA, G. C. et al. *Leishmania amazonensis*-derived extracellular vesicles (EVs) induce neutrophil extracellular traps (NETs). **Journal of Leukocyte Biology**, v. 117, n. 1, 6 set. 2024.

PETERS, C.; STIERHOF, Y. D.; ILG, T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 783–786, 1 fev. 1997.

PETERS, W. The little sister—a tale of Arabia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p.179–184, oct. 1988.

PIANI, A. et al. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 8, p. 589–599, jul. 1999.

PICCHI, D. G. et al. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1262–1277, 2009.

PINTO-DA-SILVA, L. H. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 1371–1377, 1 out. 2002.

PITALE, D. M. et al. *Leishmania donovani* induces autophagy in human blood-derived neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 4, p. 1163–1175, 15 fev. 2019.

PROBST, C. M. et al. A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, 9 fev. 2012.

PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 3, p. 745–750, mar. 1995.

- QUINTELA-CARVALHO, G. et al. *Leishmania infantum* defective in lipophosphoglycan biosynthesis interferes with activation of human neutrophils. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1-11, 6 abr. 2022.
- RAZZAZAN, A.; SABERI, M. R.; JAAFARI, M. R. Insights from the analysis of a predicted model of gp63 in *Leishmania donovani*. **Bioinformatics**, v. 3, n. 3, p. 114–118, 2 nov. 2008.
- REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 914 p.
- RHAIEM, R. B.; HOUIMEL, M. Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Tropica**, v. 159, p. 11–19, jul. 2016.
- RIBEIRO, J. G. et al. Evaluation of vaccinal effectiveness of preparations containing membrane antigens of *Leishmania (L.) amazonensis* in experimental cutaneous leishmaniasis model. **International Immunopharmacology**, v. 47, p. 227–230, 25 abr. 2017.
- RIGO, R. S.; RIGO, L.; HONER, M. R. Aspectos clínicos e laboratoriais na leishmaniose visceral americana. **Brazilian Journal of Nephrology (Jornal Brasileiro de Nefrologia)**, v. 31, n. 1, p. 48–54, 24 ago. 2009.
- RIVAS, L. et al. Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 235–243, ago. 1991.
- RIZVI, F. S. et al. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. **European Journal of Immunology**, v. 18, n. 3, p. 473–476, mar. 1988.
- RODRIGUEZ, N. M. et al. Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca²⁺-ATPase gene *lma1* enhances virulence. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 117–126, fev. 2002.
- ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 28 jun. 2012.
- RUSSELL, D. G. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 213–221, 1 abr. 1987.
- RUSSELL, D. G.; WRIGHT, S. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 1, p. 279–292, 1 jul. 1988.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100–103, jul. 1989.
- SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 225–233, set. 1990.
- SADLOVA, J. et al. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. **Folia Parasitologica**, v. 53, n. 2, p. 81–90, 1 jun. 2006.

- SÁENZ-GARCIA, J. L. et al. Targeting epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* with a peptide isolated from a phage display random library. **Experimental Parasitology**, v. 210, p. 107830–107830, 1 mar. 2020.
- SALGADO FILHO, N.; FERREIRA, T. M. A. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 217–221, abr. 2003.
- SAMANT, M. et al. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 470–479, 1 jul. 2009.
- SANTARÉM, N. et al. Immune Response Regulation by *Leishmania* Secreted and Nonsecreted Antigens. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2007, p. 1–10, 2007.
- SANTARÉM, N.; TAVARES, J.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. In Vitro Infections of Macrophage-Like Cell Lines with *Leishmania infantum* for Drug Screening. **Methods in Molecular Biology**, p. 265–277, 2019.
- SARAIVA, E. M. et al. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp. metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 39–47, 4 mar. 2005.
- SARTORI, A.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. *Leishmania major* metacyclogenesis modulates ability to induce IL-12. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 795, n. 1, p. 400–402, out. 1996.
- SCHNEIDER, P. et al. Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Biochemical Journal**, v. 295, n. 2, p. 555–564, 15 out. 1993.
- SCHNEIDER, P. et al. Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 2, p. 603–609, 1 dez. 1994.
- SEN, S. et al. Intracellular pathogen *Leishmania* intervenes in iron loading into ferritin by cleaving chaperones in host macrophages as an iron acquisition strategy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 12, 1 dez. 2022.
- SEPÚLVEDA, A. A. L. et al. Efficacy of photodynamic therapy using TiO₂ nanoparticles doped with Zn and hypericin in the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101676, 1 jun. 2020.
- SHALEV-BENAMI, M. et al. 2.8-Å Cryo-EM structure of the large ribosomal subunit from the eukaryotic parasite *Leishmania*. **Cell Reports**, v. 16, n. 2, p. 288–294, jul. 2016.
- SHIO, M. T. et al. PKC/ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by *Leishmania* zinc-metalloprotease during infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003868, 26 jun. 2015.
- Sigma Aldrich - Protocols for the Fmoc SPPS of cysteine-containing peptides. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/chemistry-and-synthesis/peptide-synthesis/fmoc-spps-cysteine-peptides>. Acesso em: 07 abr. 2025.

- SILVEIRA, M. B. et al. Lipophosphoglycan from dermatropic new world *Leishmania* upregulates interleukin-32 and proinflammatory cytokines through TLR4 and NOD2 receptors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 23 mar. 2022.
- SINGH, A. K. et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1853–1868, 18 fev. 2015.
- SORENSEN, A. E.; ASKIN, S. P.; SCHAEFFER, P. M. In-gel detection of biotin–protein conjugates with a green fluorescent streptavidin probe. **Analytical Methods**, v. 7, n. 5, p. 2087–2092, 2015.
- SOTO-OLGUÍN, N. et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates dermal $\gamma\delta$ T cells with participation of TLR2. **Acta Parasitologica**, v. 68, n. 1, p. 122–129, 1 mar. 2023.
- SPATH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 16, p. 9536–9541, 5 ago. 2003.
- SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 97–103, out. 2001.
- SRIVASTAVA, S. et al. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 172, n. 3, p. 403–409, 18 abr. 2013.
- STEBECK, C. E. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 1–13, abr. 1995.
- STIERHOF, Y-D. et al. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 10, p. 675–689, 1 out. 1999.
- SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p.1-13, set. 2017.
- THOMAS, J. R.; DWEK, R. A.; RADEMACHER, T. W. Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. **Biochemistry** v. 29, n.23, 12 de junho de 1990.
- TITUS, R. G. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 5, p. 545-555, 1985.
- TOM, A. et al. Interactions between *Leishmania* parasite and sandfly: a review. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p.2-14, 6 dez. 2023.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–146, 1 fev. 2003.

- TRUJILLO, C. et al. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology Letters**, v. 70, n. 3, p. 203–209, dez. 2000.
- TURCO, S. J. The lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Parasitology Today**, v. 4, n. 9, p. 255–257, set. 1988.
- UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 1 ago. 2012.
- VALIGUROVÁ, A.; KOLÁŘOVÁ, I. Unrevealing the Mystery of Latent Leishmaniasis: What Cells Can Host *Leishmania*? **Pathogens**, v. 12, p.1-22, fev. 2023.
- VAN STRIJP, J. A. et al. Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha m beta 2, Mac-1). Indirect effects of an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 6, p. 3324–3336, 15 set. 1993.
- VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7537–7545, 19 maio 2008.
- VELÁSQUEZ, A. M. A. Do *screening* ao mecanismo de ação, uma contribuição para a descoberta de ciclopalladados bioativos: a atividade leishmanicida de CP2 e seu efeito inibitório frente à DNA topoisomerase 1B de *Leishmania*. 2017. 88 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2017.
- VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. Efficacy of a binuclear cyclopalladated compound therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis* and its inhibitory effect on topoisomerase 1B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1-15, ago. 2017.
- VERGA, J. B. M. et al. Peptide selection via phage display to inhibit *Leishmania*-macrophage interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1-8, 27 fev. 2024.
- VIEIRA, T. DA S. et al. Intraspecies polymorphisms in the lipophosphoglycan of *L. braziliensis* differentially modulate macrophage activation via TLR4. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1-9, 10 jul. 2019.
- WANI, A. A. et al. Iodine catalyzed oxidative coupling of diaminoazines and amines for the synthesis of 3,5-disubstituted-1,2,4-triazoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 7659–7671, 4 jun. 2021.
- WELD, E. D. et al. Twice neglected? Neglected diseases in neglected populations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 88, n. 2, p.367–373, 9 dez. 2022.
- WINTER, G. et al. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 9, p. 2471–2482, 1 set. 1994.
- YAO, C. et al. Internal and surface subpopulations of the major surface protease (MSP) of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 139, n. 2, p. 173–183, fev. 2005.

YAO, C. et al. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: Contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. **Proteomics Clinical Applications**, v. 4, n. 1, p. 4–16, 1 jan. 2010.

YOON, K. W. et al. Vaccine efficacy induced by virus-like particles containing *Leishmania donovani* surface glycoprotein GP63. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 6, 1 jun. 2024.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, v. 116, p. 305–309, 1 jan. 1998.

ZAMORA-CHIMAL, J. et al. NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 454–462, 1 fev. 2017.

ZENIAN, A.; ROWLES, P.; GINGELL, D. Scanning electron-microscopic study of the uptake of *Leishmania* parasites by macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 39, n. 1, p. 187–199, 1 out. 1979.

ZHANG, R. et al. From nature to creation: Going around in circles, the art of peptide cyclization. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1135–1150, 1 mar. 2018.

ZORZI, A.; DEYLE, K.; HEINIS, C. Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 24–29, jun. 2017.