

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 18/10/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Doutorado - Programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Natália Caroline Costa Coelho

**Oportunidades de controle das leishmanioses: planejamento,
síntese, caracterização e bioconjugação de peptídeos a agentes
leishmanicidas**

Araraquara

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Doutorado - programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Natália Caroline Costa Coelho

**Oportunidades de controle das leishmanioses: planejamento,
síntese, caracterização e bioconjugação de peptídeos a
agentes leishmanicidas**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” para obtenção do
título de Doutora em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.**

Orientadora: Prof.^a. Dra. Márcia A S Graminha.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara

2022

-
- C673o** Coelho, Natália Caroline Costa.
Oportunidades de controle das leishmanioses: planejamento, síntese, caracterização e bioconjugação de peptídeos a agentes leishmanicidas / Natália Caroline Costa Coelho. – Araraquara: [S.n.], 2022.
172 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
- Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha.
Coorientadora: Eduardo Maffud Cilli.
1. Bioconjugação. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3. Leishmaniose. 4. Terapias. 5. Membrana celular e design de moléculas. I. Graminha, Márcia Aparecida Silva, orient. II. Cilli, Eduardo Maffud, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Oportunidades de controle das leishmanioses: planejamento, síntese, caracterização e bioconjugação de peptídeos a agentes leishmanicidas

AUTORA: NATÁLIA CAROLINE COSTA COELHO

ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

COORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE CARDOSO (Participação Virtual)
Centro de Parasitologia e Micologia / Instituto Adolfo Lutz - IAL - São Paulo

Profa. Dra. PAULA ABOUD BARBUGLI (Participação Virtual)
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. PAULO RICARDO DA SILVA SANCHES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 18 de outubro de 2022

*Dedico este trabalho a
meu marido por seu
meu companheiro de
vida e a minha família
por todo o apoio para
essa conquista.*

Agradecimento

Agradeço a Deus por ter guiado os meus passos ao longo desses 4 anos de trabalho, por ter me dado força pela muitas vezes que quis fraquejar e por dar coragem nos momentos de medo.

Ao meu marido Heberton por esses quase 13 anos juntos, por estar ao meu lado, por todo o amor, por me apoiar e por ser tão compreensivo ao longo desses 4 anos. Você presenciou meus momentos de alegria, de felicidade e de desespero e esteve ao meu lado em todos eles. Eu amo você obrigada por tudo.

A meus pais Sonia e Severino por me acreditarem mais em mim do que eu mesma, por me apoiar, me dar tanto carinho e amor, acreditar em mim e me mostrar que mesmo em dificuldades deveria lutar pelos meus sonhos, a vocês dedico todo o meu amor.

Aos meus irmãos Magda, Bruna e Vitor por serem meus amigos, companheiros, que mesmo de longe torceram e fizeram de tudo pra me ajudar e por sempre me mostrar o quanto nossa família é a base e que com ela podemos alcançar qualquer coisa.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a. Dra. Márcia Graminha pela orientação, ensinamentos, por me acolher em seu laboratório, por me fazer crescer e saber que fazer ciência de qualidade é para poucos e pôr ao longo de todo esse processo ter sido mais do que uma supervisora, ter se tornado uma amiga.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo Cilli por tantos anos de trabalho e por sempre me incentivar, me apoiar, me dar tantos conselhos e me ensinar a ser uma pessoa e profissional melhor.

Aos meus amigos de Matão, graduação e Pós Graduação por todo o carinho e parceria, em especial a Ana Cláudia, Sara por ser grandes companheiras de vida, por me ouvir, incentivar e pela amizade em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos companheiros de parasito clínica Ângela, Juliane, Gabriel, Maricely e Michele obrigada pela convivência diária, pelos açaís e risadas.

Ao Lasebio e aos amigos queridos Sara Brandão, Carol (Dolli), Letícia, Paulo, Alisson, João Victor, Mariana (Balli), Júlia Picolli, Natália B, Marina, Augusto, Norival por ser a minha casa por tanto tempo e por me fazer crescer como profissional e me tornar uma pessoa e pesquisadora melhor.

Agradeço a todos os colaboradores desse projeto: Laboratório do Professor Nailton, ao seu aluno de doutorado Victor, ao laboratório de imunologia clínica e ao seu Pós Doc Deyvis, a Dra. Paula por tanta a

ajuda nesse trabalho, ao Laboratório de biologia celular e a doutoranda Geovana Navegante.

A Unesp, Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química pela oportunidade, espaço e por todo o aprendizado.

Agradeço as funcionárias da Pós Graduação e a Coordenação do BBAF pelo auxílio e apoio.

Agradeço também a Capes -Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio- Código de Financiamento 001.

Também agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro e ao CNPQ

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. - Marthín Luther King

Resumo

As leishmanioses correspondem a um grupo de doenças causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O controle das leishmanioses depende de intervenção quimioterápica, com destaque para a anfotericina B, objeto de estudo deste trabalho. A anfotericina B é tóxica e causa severos efeitos colaterais nos pacientes. Dentro deste cenário, parte de nossos objetivos visa a modificação da anfotericina B via acoplamento de peptídeos antimicrobianos, em um processo chamado bioconjugação terapêutica. Neste estudo, peptídeos leishmanicidas das classes temporinas e histatinas foram exploradas para desenvolvimento de novos bioconjugados. Para isso os peptídeos TSHa ($IC_{50}ama=5\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>200$), TSHd ($IC_{50}ama=7,2\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS=14$) e Hist 5 ($IC_{50}ama=8\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>125$) foram funcionalizados à anfotericina B ($IC_{50}ama=0,63$ e $IS=38$), gerando os derivados Anf B*-TSHa ($IC_{50}ama=1,6\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>645$), Anf B (RC)-TSHa ($IC_{50}ama=0,31\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>3225$), Anf B *-TSHd ($IC_{50}ama=0,95\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>1052$), Anf B-Hist 5 ($IC_{50}ama=0,4\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>2500$) foram sintetizados com alto grau de pureza. Dentre os principais achados, destaca-se a alta seletividade (IS) dos bioconjugados, os quais são pelo menos 600 vezes mais seletivos para o parasita quando comparados à célula do hospedeiro, o que pode ser atribuído a uma possível ação dos peptídeos temporinas TSHa e TSHd na membrana do parasita, quer seja pela formação de poros ou por interações do tipo detergente (carpet like), o que pode estar facilitando a permeação da anfotericina B nos macrófagos, promovendo sua atividade anti-amastigota. Diferentemente para o bioconjugado Anf B-Hist 5, verificou-se que houve menor permeabilização desses na membrana do parasita, isto foi observado através dos ensaios de citometria de fluxo e de microscopia de fluorescência. Os dados de microscopia de fluorescência confocal indicaram uma melhor compartimentalização do peptídeo Anf B-Hist 5 na mitocôndria, sugerindo um mecanismo de ação dual inerente de cada molécula associado à atividade biológica aqui caracterizada: a ação da anfotericina B na membrana do parasita facilitando a entrada do peptídeo Anf B-Hist 5 e assim atividade do mesmo sobre a mitocôndria. Adicionalmente, a fim de sintetizar novos peptídeos leishmanicidas, foi planejado e sintetizado um dímero composto pelos peptídeos TSHa, denominado (TSHa)₂K ($IC_{50}ama=0,58\mu\text{mol L}^{-1}$ e $IS>1724$), cuja potência e seletividade aumentou cerca de dez vezes em relação ao peptídeo TSHa. Paralelamente, a partir de estudos de modelagem molecular para obtenção da estrutura do canal mitocondrial de cálcio MCU de *Leishmania*, estudos de docagem molecular foram realizados para planejamento de peptídeos inéditos capazes de interferir seletivamente no influxo de cálcio para a mitocôndria do parasita com base na interação destes com a região do filtro de seletividade DIME, os quais deverão ser sintetizados e validados em estudos no parasita *Leishmania*. Com a presente pesquisa podemos concluir a bioconjugação com Anf B e o design racional de peptídeos são estratégias interessantes para o desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento da leishmaniose, focando no aumento da seletividade e diminuição da toxicidade.

Palavras chave: Bioconjugação, Peptídeos antimicrobianos, Leishmaniose, terapias, membrana celular e design de moléculas.

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The control of leishmaniasis depends on chemotherapeutic intervention, with emphasis on amphotericin B, object of study in this work. Amphotericin B is toxic and causes severe side effects in patients. Within this scenario, part of our objectives is the modification of amphotericin B via coupling of antimicrobial peptides, in a process called therapeutic bioconjugation. In this study, leishmanicidal peptides of the temporine and histatin classes were explored for the development of new bioconjugates. For this, TSHa ($IC_{50}ama=5\mu mol L^{-1}$ and $IS>200$), TSHd ($IC_{50}ama=7.2\mu mol L^{-1}$ and $IS=14$) and Hist 5 ($IC_{50}ama=8\mu mol L^{-1}$ and $IS>125$) peptides were functionalized to amphotericin B ($IC_{50}ama=0.63\mu mol L^{-1}$ and $IS=38$), generating Anf B*-TSHa derivatives ($IC_{50}ama=1.6\mu mol L^{-1}$ and $IS>645$), Anf B (RC)-TSHa ($IC_{50}ama=0,31\mu mol L^{-1}$ and $IS>3225$), Anf B *-TSHd ($IC_{50}ama=0.95\mu mol L^{-1}$ and $IS>1052$), Anf B-Hist 5 ($IC_{50}ama=0.4\mu mol L^{-1}$ and $IS>2500$) were synthesized with a high degree of purity. Among the main findings, the high selectivity (IS) of the bioconjugates stands out, which are at least 600 times more selective for the parasite when compared to the host cell, which can be attributed to a possible action of the temporal peptides TSHa and TSHd in the parasite membrane, either by pore formation or by detergent-like interactions (carpet like), which may be facilitating the permeation of amphotericin B in macrophages, promoting its anti-amastigote activity. Differently for the bioconjugate Anf B-Hist5, it was verified that there was less permeabilization of these in the membrane of the parasite, this was observed through the flow cytometry and fluorescence microscopy assays. Confocal fluorescence microscopy data indicated a better compartmentalization of the peptide Anf B-Hist 5 in the mitochondria, suggesting an inherent dual mechanism of action of each molecule associated with the biological activity characterized here: the action of amphotericin B on the parasite membrane, facilitating the entry of the parasite. Anf B-Hist 5 peptide and thus its activity on mitochondria. Additionally, in order to synthesize new leishmanicidal peptides, a dimer composed of TSHa peptides, called (TSHa)₂K ($IC_{50}ama=0.58\mu mol L^{-1}$ and $IS>1724$) was designed and synthesized, whose potency and selectivity increased by about ten times that of the TSHa peptide. In parallel, from molecular modeling studies to obtain the structure of the mitochondrial calcium channel MCU from *Leishmania*, molecular docking studies were carried out to design novel peptides capable of selectively interfering with the influx of calcium into the parasite's mitochondria based on the interaction of these with the DIME selectivity filter region, which should be synthesized and validated in studies on the *Leishmania* parasite. With the present research we can conclude that bioconjugation with Anf B and the rational design of peptides are interesting strategies for the development of new molecules for the treatment of leishmaniasis, focusing on increasing selectivity and decreasing toxicity.

Keywords: Bioconjugation, Antimicrobial peptides, Leishmaniasis, therapies, cell membrane and molecule design.

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ácido trifluoracético: TFA

Anfotericina B incompleta: Anf B*

Anfotericina B: Anf B

1- [Bis (dimetilamino) metileno] -1H-1,2,3-triazolo [4,5-b] piridínio 3-óxido
 hexafluorofosfato-Chemtech do inglês **H** exafluorofosfato **A**zabenzotriazol **T**etrametil
U rônio: HATU

Carboxifluoresceína:CF

Cell and Tissue Adhesive: Cell-Tak

Colesterol: COL

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: CLAE

Dicroísmo circular: CD

Dímero TSHa: (TSHa)₂K

3,6-dioxa-1,8-octanedithiol: DODT

Fosfatidilserina: POPS

2-(1H-**b**enzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylurônio **h**exafluorophosphate: HBTU

Hexafluorofosfato de **b**enzotriazol-1-il-**o**xi-tris-(dimetilamino)**p**hosphonium-
 Chemtech: BOP

Histatina 5: Hist 5

Índice de seletividade: IS

Iodeto de propídio: PI

Lisofosfatidilcolina: LPC

Membrana mitocondrial interna: IMM

Mitochondrial Calcium Uniporter: MCU

PAM: Peptídeo antimicrobiano

1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina: POPC

Protein Data Bank: PDB

Reação colateral: RC

Tampão fosfato salino: PBS

Triisopropilsilano: TIS

2,2,2-Trifluoroetanol: TFE

Vesículas unilamelares :LUVs

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo biológico do parasita <i>Leishmania</i>	21
Figura 2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	25
Figura 3. Esquema da bioconjugação dos peptídeos deste trabalho com a Anf B	28
Figura 4. Estrutura do complexo MCU em seres humanos e em tripanossomatídeos	33
Figura 5. Padrão de bandas características para determinação de estruturas secundárias de peptídeos antimicrobianos	38
Figura 6. Esquema para a formação das vesículas unilamelares	43
Figura 7. Espectro de massas referente ao peptídeo TSHa conjugado à Anf B	48
Figura 8. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B*-TSHa	49
Figura 9. Perfil cromatográfico do peptídeo puro Anf B*-TSHa	50
Figura 10. Análise de CLAE para avaliação do processo de acoplamento da anfotericina B ao peptídeo TSHa em pequena escala do qual foi utilizado o agente ativador HATU e o acoplador DIPEA	51
Figura 11. Análise de espectrometria de massas do acoplamento em solução de TSHa e Anf B	52
Figura 12. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B-TSHa com o agente acoplador HATU e o ativador DIPEA	52
Figura 13. Perfil do peptídeo puro Anf B (RC) -TSHa a partir do aumento de escala com os agentes ativadores DIPEA e o agente acoplador HATU	53
Figura 14. Espectro de massas do peptídeo Anf B (RC)-TSHa resultante da reação de acoplamento com agente ativador HATU e o acoplador DIPEA	54
Figura 15. Espectro de massas do peptídeo Anf B-TSHa resultante da estratégia de acoplamento com o agente acoplador BOP e o ativador DIPEA	55
Figura 16. Perfil cromatográfico do peptídeo Anf B (completo)-TSHA por CLAE modo analítico	55
Figura 17. Espectro de massas referente ao Dímero (TSHa) ₂ -K	57

Figura 18. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Dímero (TSHa) ₂ -K_____	57
Figura 19. Perfil do peptídeo puro Dímero (TSHa) ₂ -K_____	58
Figura 20. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B*-TSHd_____	59
Figura 21. Perfil cromatográfico do peptídeo puro Anf B*-TSHd_____	59
Figura 22. Espectro de massas do peptídeo conjugado Anf B*-TSHd_____	60
Figura 23. Espectro de massas do peptídeo (Anf B) ₂ -TSHd_____	61
Figura 24. Perfil cromatográfico do peptídeo (Anf B) ₂ -TSHd_____	59
Figura 25. Perfil do peptídeo puro Anf B-Hist 5_____	62
Figura 26. Espectro de massas referente ao peptídeo Anf B-Hist 5_____	63
Figura 27. Espectros de CD do peptídeo TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	66
Figura 28. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	67
Figura 29. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	67
Figura 30. Espectros de CD do peptídeo dimerico (TSHa) ₂ K em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	68
Figura 31. Espectros de CD da Anf B em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	68
Figura 32. Espectros de CD do peptídeo TSHd em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	69
Figura 33. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHd f B em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	70
Figura 34. Espectros de CD do peptídeo Hist 5 em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	71
Figura 35. Espectros de CD do peptídeo Anf B-Hist 5 em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%_____	71
Figura 36. Efeito <i>in vitro</i> Anf B*-TSHa X Anf B (RC)- TSHa X (TSHa) ₂ K X TSHa X Anf B_____	77
Figura 37. Efeito <i>in vitro</i> Anf B-Hist 5 X Hist 5 X Anf B e Anf B*-TSHd xTSHd em amastigotas intracelulares de <i>L. mexicana</i> _____	78

- Figura 38.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos TSHa e Anf B*-TSHa em vesículas de POPC:COL (5:1) _____ 78
- Figura 39.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos TSHa e Anf B*-TSHa em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) _____ 82
- Figura 40.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Anf B (RC)-TSHa em vesículas de POPC:COL (5:1) e POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) _____ 84
- Figura 41.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo (TSHa)₂K em vesículas de POPC: COL (5:1) e POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) _____ 84
- Figura 42.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo composto Anf B em vesículas de POPC:COL (5:1) e POPC:POPS:Ergosterol (1:13:3) _____ 85
- Figura 43.** Gráfico da liberação de CF pelo composto peptídeo TSHd em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF _____ 86
- Figura 44.** Gráfico da liberação de CF pelo composto Anf B*-TSHd em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior _____ 86
- Figura 45.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Hist 5 e bioconjugado Anf B-Hist 5 em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF _____ 88
- Figura 46.** Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Hist 5 e bioconjugado Anf B-Hist 5 em vesículas de POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF _____ 88
- Figura 47.** Análise de dano de membrana por citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* dos peptídeos TSHa e bioconjugados com Anf B _____ 90
- Figura 48.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com iodeto de propídio (PI) frente aos tratamentos com Anf B, TSHa, Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e (TSHa)₂K _____ 91
- Figura 49.** Análise de dano de membrana por citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* do peptídeo TSHd e bioconjugado com Anf B _____ 93
- Figura 50.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com iodeto de propídio (PI) frente aos tratamentos com Anf B, TSHd, Anf B*-TSHd _____ 94

- Figura 51.** Análise de dano de membrana por Citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* do peptídeo Hist 5 e bioconjugados com Anf B ____ 96
- Figura 52.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com PI frente aos tratamentos com Anf B, Hist 5, Anf B- Hist 5 ____ 97
- Figura 53.** Ensaio de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 24 horas ____ 98
- Figura 54.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHa por 24 horas ____ 100
- Figura 55.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHa por 2 horas ____ 101
- Figura 56.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC) -TSHa por 24 horas ____ 102
- Figura 57.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC) -TSHa por 2 horas ____ 103
- Figura 58.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com iodeto de propídio (PI) pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, TSHa, Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e (TSHa)₂K nas concentrações $1,25$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento ____ 104
- Figura 59.** Ensaio de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 24 horas para o experimento com o peptídeo TSHd e Anf B*-TSHd ____ 105
- Figura 60.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHd por 24 horas ____ 106
- Figura 61.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHd por 2 horas ____ 107
- Figura 62.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com PI pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, TSHd, Anf B*- TSHd, nas concentrações $1,25$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento ____ 105
- Figura 63.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 por 24 horas ____ 106

Figura 64. Promastigotas de <i>L. mexicana</i> na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 por 2 horas _____	107
Figura 65. Porcentagem de parasitas de <i>L. mexicana</i> na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com PI pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, Hist 5, Anf B- Hist 5, nas concentrações $1,25$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento _____	109
Figura 66. Ensaio de microscopia confocal com promastigotas de <i>L. mexicana</i> na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 5 horas de incubação _____	113
Figura 67. Ensaios de microscopia confocal com promastigotas de <i>L. mexicana</i> na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação _____	115
Figura 68. Promastigotas de <i>L. mexicana</i> na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B*-TSha $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal _____	116
Figura 69. Promastigotas de <i>L. mexicana</i> na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B-Hist 5 na concentração de 2 e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal _____	118
Figura 70. Análise da similaridade das estruturas proteicas da proteína MCU com a sequência de <i>L. mexicana</i> _____	122
Figura 71. Análise da similaridade das sequências das proteínas de MCU de <i>L. mexicana</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>C. elegans</i> e <i>C. europaea</i> _____	123
Figura 72. Estrutura da proteína MCU <i>C. elegans</i> (5ID3) _____	124
Figura 73. Modelo por homologia da proteína MCU de <i>L. mexicana</i> _____	124
Figura 74. Dados resultantes da otimização energética realizada através do método semiempírico PM7 _____	125
Figura 75. Gráfico de Ramachandran da estrutura otimizada do MCU a partir do template do 5ID3 _____	128
Figura 76. Estrutura da proteína MCU <i>C. europaea</i> (6DNF) e do modelo por homologia da proteína MCU de <i>L. mexicana</i> _____	127
Figura 77. Dados resultantes da otimização energética realizada através do método semiempírico PM7 com o programa MOPAC _____	128

Figura 78. Gráfico de Ramachandran da estrutura otimizada do MCU a partir do template do 5ID3	129
Figura 79. Estrutura do Modelo por homologia MCU com docking do inibidor mitoxantrona	131
Figura 80. Estrutura do Modelo por homologia MCU com docking do inibidor tetraciclina	131
Figura 81. Peptídeo linear Ala-Trp-Pro-His-His ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de <i>C. elegans</i>	133
Figura 82. Peptídeo linear Ala-Trp-Pro-His-His ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de <i>C.elegans</i>	132
Figura 83. Peptídeo cíclico Phe-Arg-Pro-Val ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de <i>C.elegans</i>	134
Figura 84. Peptídeo cíclico Tyr-Cys-Leu-Val ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de <i>C.elegans</i>	134
Figura 85. Peptídeo linear Trp-Tyr-His-Pro ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU humana (PDB:6O58)	135

Lista de tabelas

Tabela 1. Rendimento dos de síntese dos peptídeos TSHa e Anf B-TSHa_____47

Tabela 2. Dados do processo de purificação dos peptídeos TSHa, Anf B*TSHa, Anf B (RC)-TSHa, (TSHa)2K, TSHd, Anf B*-TSHd, Hist 5 e Anf B- Hist 5_____64

Tabela 3. Dados dos ensaios biológicos realizados com *L. mexicana*: ensaios anti-promastigota, anti- amastigota_____73-75.

Tabela 4. Peptídeos lineares planejados para inibição do MCU e organizados de acordo com a melhor pontuação de docking_____132

Tabela 5. Peptídeos cíclicos planejados para inibição do MCU e organizados de acordo com a melhor pontuação de docking_____132

Tabela 6. Peptídeos lineares planejados para inibição do MCU selecionados a partir do docagem molecular com a proteína MCU humana_____136

Tabela 7. Peptídeos cíclicos planejados para inibição do MCU selecionados a partir do docagem molecular com a proteína MCU humana_____136

Sumário

Capítulo 1	20
1. Introdução	20
1.1. Leishmanioses: novos alvos terapêuticos para estas doenças	20
1.2. Peptídeos antimicrobianos como novos agentes terapêuticos	23
1.3. O fluxo de Ca^{2+} mitocondrial: oportunidade de desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos direcionados ao complexo MCU de <i>Leishmania</i>	29
2. Objetivos	34
3. Materiais e métodos	35
3.1. Síntese dos peptídeos TSHa, TSHd e Hist 5 e dímero (TSHa) ₂ K	35
3.1.1. Bioconjugação de peptídeos à anfotericina B	36
3.2 Reação de clivagem	37
3.3 Purificação e caracterização dos peptídeos	37
3.4 Dicroísmo circular	37
3.5 Ensaio biológicos	38
3.5.1 Cultivo de <i>L. mexicana</i> e obtenção de macrófagos peritoneais	38
3.5.2 Bioensaio para avaliar a atividade anti-promastigota <i>in vitro</i>	39
3.5.3 Determinação do potencial citotóxico dos peptídeos frente a macrófagos peritoneais	40
3.5.4 Bioensaio para avaliar a atividade anti-amastigota <i>in vitro</i>	40
3.6 Estudos de mecanismos de ação	40
3.6.1. Ensaio de permeabilização de vesículas	41
3.6.2 Ensaio de danos de membrana por citometria de fluxo	42
3.6.3 Ensaio de microscopia de fluorescência e de fluorescência confocal	42

3.7 Construção do modelo por homologia da proteína MCU _____	44
3.7.1 Planejamento dos peptídeos inéditos inibidores da proteína MCU ____	44
3.8. Análise estatística _____	45
4. Resultados e Discussão _____	45
4.1 Síntese dos peptídeos _____	45
4.1.1 Peptídeo TSHa e obtenção do bioconjugado Anf B-TSHa _____	46
4.1.2 Nova estratégia de acoplamento em solução da anfotericina B e TSHa _____	49
4.1.3. Obtenção do Dímero do peptídeo TSHa _____	54
4.1.4 Peptídeo TSHd e obtenção do bioconjugado Anf B-TSHd _____	56
4.1.5 Síntese de Hist 5 e obtenção do bioconjugado Anf B - Hist 5 _____	60
4.2 Dicroísmo circular _____	62
4.2.1 Dicroísmo circular do peptídeo TSHa e bioconjugados _____	63
4.2.3 Dicroísmo circular do peptídeo TSHd e bioconjugado _____	67
4.2.4 Dicroísmo circular do peptídeo Hist 5 e bioconjugado _____	69
4.3 Ensaios biológicos: Citotoxicidade e Atividade Leishmanicida _____	70
4.4 Estudos de mecanismo de ação dos bioconjugados com Anf B _____	78
4.4.1 Ensaios de permeabilização de vesículas _____	79
4.4.1.2 Peptídeo TSHa e bioconjugados _____	79
4.4.1.3 Peptídeo TSHd e bioconjugado _____	85
4.4.1.4 Peptídeo Hist 5 e bioconjugado _____	87
4.4.2 Citometria de fluxo _____	88

4.4.2.1 Peptídeo TSHa e bioconjugados _____	89
4.4.2.2 Peptídeo TSHd e bioconjugado _____	92
4.4.2.3 Peptídeo Hist 5 e bioconjugado _____	94
4.4.3 Ensaios de microscopia de fluorescência _____	97
4.4.3.1 Peptídeo TSHa e bioconjugados _____	97
4.4.3.2 Peptídeo TSHd e Anf B*-TSH _____	104
4.4.3.3 Hist 5 e Anf B-Hist 5 _____	109
4.4.4 Microscopia fluorescência confocal dos peptídeos bioconjugados com Anf B- _____	112
4.5 Planejamento dos peptídeos inéditos inibidores do canal iônico MCU _____	120
4.5.1 Construção e validação do modelo por homologia _____	120
4.5.2 Estudo da interação do modelo por homologia de MCU de <i>L. mexicana</i> com inibidores conhecidos de MCU e planejamentos dos peptídeos inibidores de MCU _____	129
5. Conclusões _____	137
6. Referências _____	138
7. Anexos _____	154

Capítulo 1

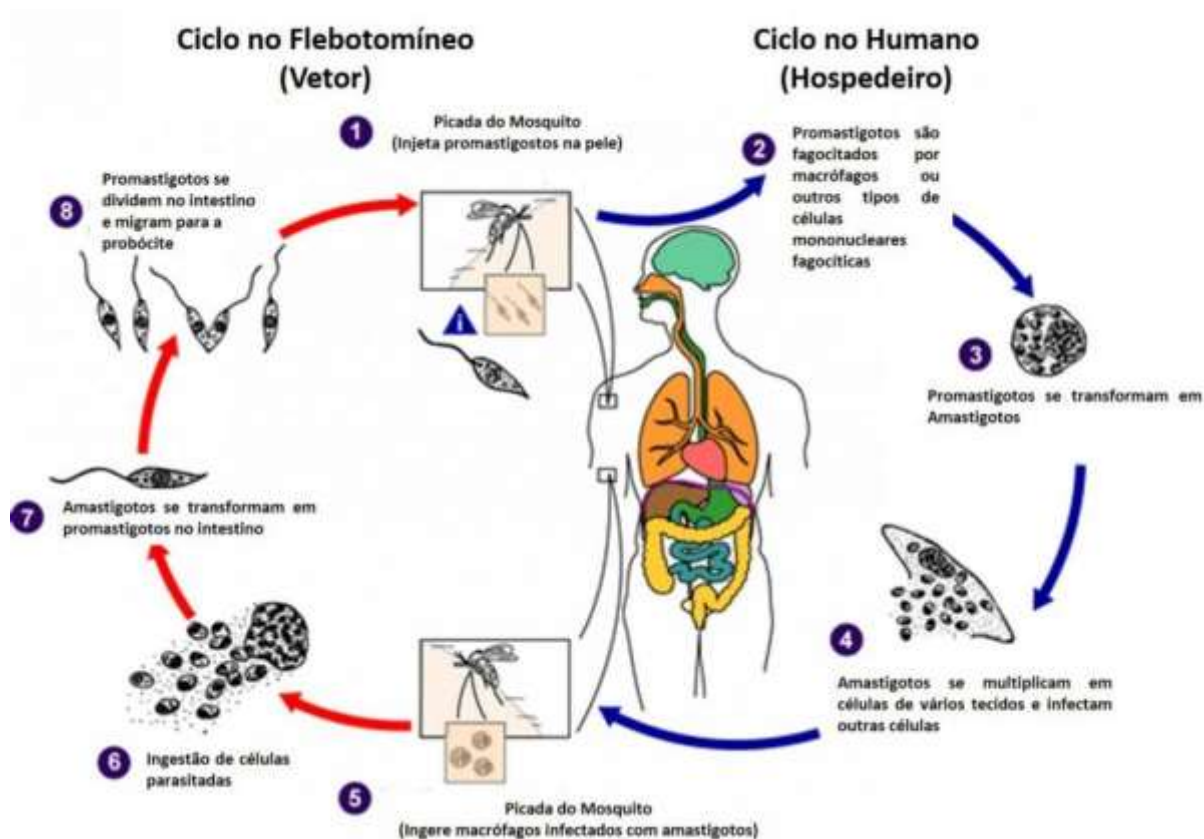
1. Introdução

1.1. Leishmanioses: novos alvos terapêuticos para estas doenças

As leishmanioses (cutânea, mucocutânea e visceral) representam um sério problema de saúde pública global, atingindo 98 países em desenvolvimento, incluindo aqueles do Sudeste Asiático, África Oriental, América Latina e Mediterrâneo (OPAS, 2020; TORRES-GUERRERO; QUINTANILLA-CEDILLO; RUIZ-ESMENJAUD; ARENAS, 2017). Anualmente, 700.000 a 1,2 milhões de pessoas são infectadas pelos parasitos do gênero *Leishmania* e 350 milhões sob risco de adquirir a doença (MANN; FRASCA; SCHERRER; HENAO-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; TORRES-GUERRERO; QUINTANILLA-CEDILLO; RUIZ-ESMENJAUD; ARENAS, 2017), levando a óbitos cerca de 70.000 pessoas por ano, se não tratadas. Nos últimos anos, o número de casos está se expandindo, principalmente devido ao aumento no número de pacientes imunossuprimidos, agravando ainda mais este problema (BAILEY; MONDRAGON-SHEM; HAINES; OLABI *et al.*, 2019; ELMAHALLAWY; ALKHALDI; SALEH, 2021).

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético composto pelas formas promastigotas (presente no inseto flebotomíneo) e amastigotas intracelulares obrigatórias (presente no hospedeiro mamífero). As formas promastigotas, residente no intestino do flebotomíneo, são transferidas para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo da fêmea (STEVERDING, 2017). Os parasitas são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, seguida por posterior transformação a amastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária, até o rompimento das células infectadas, seguido de nova infecção de macrófagos (ALBEROLA; RODRÍGUEZ; FRANCINO; ROURA *et al.*, 2004; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Figura 1: Ciclo biológico do parasita *Leishmania*, do qual a partir da picada do inseto flebotomíneo contaminando com a forma promastigota. A formas promastigota é internalizado pelos macrófagos, que se diferenciaram na forma amastigota.



Os tripanossomatídeos possuem uma série de diferenciais bioquímicos que os distinguem dos vertebrados e podem auxiliar no estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero incluindo a glicoproteína de superfície lipofosfoglicanas, a protease principal de superfície (GP63) e cisteíno protease, entre outras ((DUBIE; MOHAMMED, 2020; ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012; SPÄTH; EPSTEIN; LEADER; SINGER *et al.*, 2000) as quais foram avaliadas quanto à aplicação no controle das leishmanioses, quer seja no desenvolvimento de vacinas (DAS; ALI, 2012) ou desenho de inibidores específicos para o desenvolvimento de novas drogas anti leishmanial (CLEMENTINO; FERNANDES; PROKOPCZYK; LAURINDO *et al.*, 2021).

As manifestações clínicas das leishmanioses são determinadas pelas características do hospedeiro, da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do indivíduo infectado.

O tratamento atual para as leishmanioses requer a administração parenteral de fármacos tóxicos e pouco eficazes (FREITAS-JUNIOR; CHATELAIN; KIM; SIQUEIRA-NETO, 2012; J; M; CHANDA, 2021). Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (LINDOSO; COSTA; QUEIROZ; GOTO, 2012), fármacos desenvolvidos na década de 40 e que apresentam baixa eficácia em algumas regiões endêmicas devido ao desenvolvimento de cepas resistentes de *Leishmania* (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; DAWIT; GIRMA; SIMENEW january, 2013; MONTE-NETO; LAFFITTE; LEPROHON; REIS *et al.*, 2015; TORRES-GUERRERO; QUINTANILLA-CEDILLO; RUIZ-ESMENJAUD; ARENAS, 2017).

Na sequência, temos o polieno anfotericina B (Anf B), utilizado como fármaco de segunda escolha, mesmo causando efeitos colaterais graves nos pacientes dos quais destacamos efeitos como nefrototoxicidade e hepatotoxicidade. Alternativamente, formulações lipídicas, como o Ambisome®, Amphocil™ e Abelcit®, as quais são mais eficazes e menos tóxicas quando comparadas à Anf B (CABEZAS; LEGENTIL; ROBERT-GANGNEUX; DALIGAULT *et al.*, 2015; PATTONI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015), apresentam alto custo e necessidade de refrigeração, o que dificulta sua utilização em localidades distantes e de clima quente, apresentando baixa estabilidade em altas temperaturas (DE ALMEIDA; TERUMI FUJIMURA; DEL CISTIA; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2017).

Embora apresente eficácia variável, a pentamidina é um derivado sintético da diamidina que é usada como uma forma alternativa de tratamento das leishmanioses em casos de resistência aos antimoniais pentavalentes e no tratamento das leishmanioses viscerais (DIRO; RITMEIJER; BOELAERT; ALVES *et al.*, 2015). Entretanto, seus efeitos colaterais incluem distúrbios cardiotóxicos e metabólicos (diabetes), além de apresentar baixa eficácia e resistência ao tratamento da leishmaniose cutânea (ANDRADE-NETO; (MARTINS; MESQUITA; PINTO; COSTA-SILVA *et al.*, 2016).

Dentre os tratamentos para a leishmaniose, alguns deles foram desenvolvidos a partir da estratégia de reposicionamento de fármacos (do inglês, drug repositioning ou drug repurposing). Esta estratégia é extremamente interessante e pode acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos. Isto porque são compostos cujas

características farmacocinéticas (absorção, metabolização, distribuição e excreção) e toxicológicas já estão bem estabelecidas (OPREA; BAUMAN; BOLOGA; BURANDA *et al.*, 2011)

Com base nisso a paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado por via tópica ou parenteral no tratamento da leishmaniose cutânea ou visceral, respectivamente (Scott *et al.* 1992).

A alquilfosfocolina miltefosina, originalmente descrita para o tratamento de câncer de mama, foi reposicionada para o tratamento oral das leishmanioses (DORLO; BALASEGARAM; BEIJNEN; DE VRIES, 2012), embora no Brasil, seu uso esteja restrito para fins veterinários (ANDRADE; TOLEDO; PINHEIRO; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

A limitada disponibilidade de fármacos com especificidade para o tratamento da leishmaniose, somado à diversidade de efeitos colaterais e o surgimento de cepas resistentes, justificam as pesquisas realizadas por grupos de pesquisa, as quais têm explorado nos últimos anos, produtos naturais (SANTOS; REGASINI; NOGUEIRA; PASSERINI *et al.*, 2012; VELÁSQUEZ; RIBEIRO; VENN; CASTELLI *et al.*, 2017), a fim de identificar novas moléculas leishmanicidas. Recentemente, em colaboração com o grupo do Prof^o.Dr. Eduardo Maffud Cilli, acrescentamos ao portfólio de compostos, os peptídeos antimicrobianos (COSTA; PICCOLI; SANTOS-FILHO; CLEMENTINO *et al.*, 2020).

1.2. Peptídeos antimicrobianos como novos agentes terapêuticos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam diferentes propriedades biológicas, incluindo a modulação imunológica em diversos organismos a fim de protegê-los contra o estabelecimento de patógenos, além de apresentarem outros mecanismos de ação (LIU; SHI; TONG; JIA *et al.*, 2021) tendo sido descritos e caracterizados até o momento mais de cinco mil PAMs (HUAN; KONG; MOU; YI, 2020; SEO; WON; KIM; MISHIG-OCHIR *et al.*, 2012), as quais apresentam diversas atividades biológicas incluindo atividades antimicrobiana, anticancerígena,

antifúngica, antiparasitárias, entre outras (Seo et al., 2012; Aoki e Ueda, 2013; Lewies et al., 2015).

PAMs podem apresentar um número variável de resíduos de aminoácidos (de 5 a 50) e classificados de acordo com a estrutura secundária: folha- β , α -hélice ou não-estruturados (Seo et al., 2012). Além disso, os PAMs possuem outra propriedade dependente das características estruturais, como a cationicidade e hidrofobicidade, propriedades importantes para sua ação na membrana das células (LIU; SHI; TONG; JIA et al., 2021).

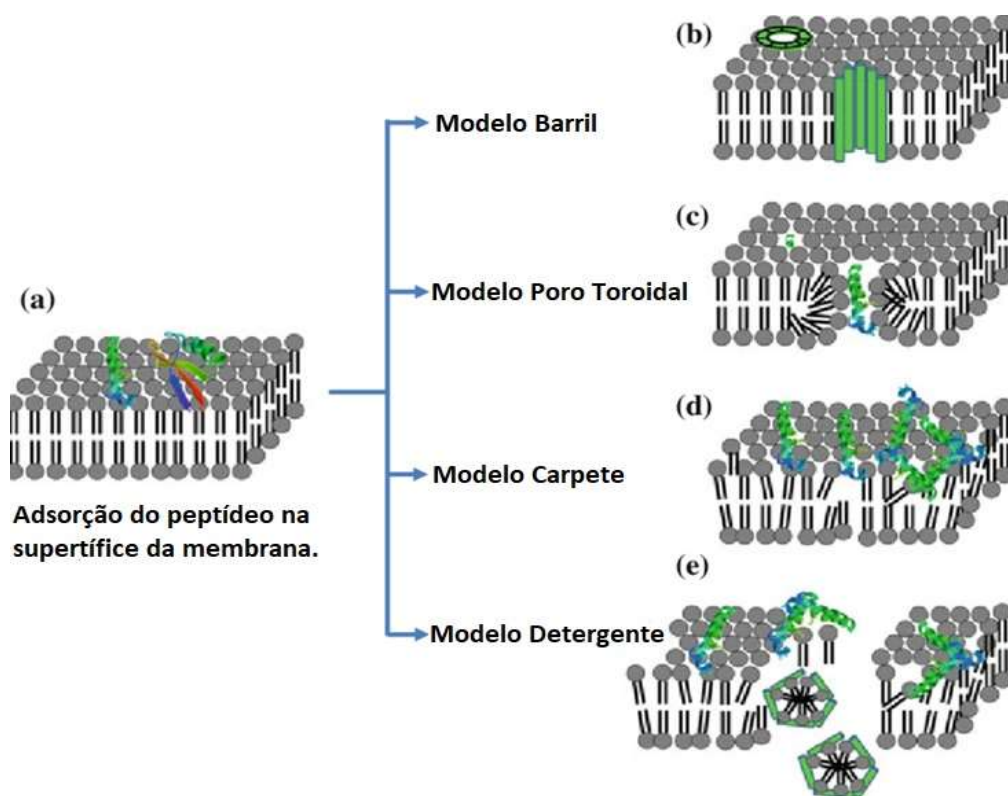
Apesar de existirem desafios para a aplicação dessas moléculas, como potencial toxicidade, susceptibilidade a proteases, alto custo de produção, entre outros, (Bahar e Ren, 2013), estes podem ser contornados pela possibilidade de ser possível promover modificações químicas na estrutura dos PAMs e, assim, alterar especificidade e estabilidade frente a proteases, entre outros (Yang et al., 2016).

O principal mecanismo de ação dessas moléculas vinculado à capacidade de interagir, permear e desestruturar membranas celulares é dependente de diversos fatores, incluindo a estrutura secundária, a carga líquida total, o tamanho e o equilíbrio entre as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Lewies et al., 2015).

Em bactérias, por exemplo, a ação antibacteriana baseia-se, principalmente, na atração entre forças eletrostáticas entre PAMs catiônicos e a superfície negativamente carregadas da membrana bacteriana (Mahlapuu et al 2016).

Como já mencionado anteriormente, um dos principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos é a membrana celular, do qual a membrana celular da *Leishmania* é formada principalmente por fosfolipídios de carga negativa sendo os principais fosfatidilinositol, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, dos quais estes são ancorados ao glicocálice. Outro ponto importante é que a morfologia desta membrana varia de acordo com a morfologia do parasita e o seu estágio de desenvolvimento, além disso este é um alvo terapêutico seletivo já que a constituição da membrana celular de mamíferos é diferente da parasitária e menos negativa, o que permite que os PAMs tenham uma ação mais seletiva (CABEZAS; LEGENTIL; ROBERT-GANGNEUX; DALIGAULT et al., 2015).

Figura 2: Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos que tem por principal mecanismo a ação na membrana celular seja por formação de poros ou de desestabilização da mesma, com mecanismos do tipo barril, poro toroidal, tapete e detergentes, entre outros.



Fonte: Modificado de Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents, 2016.

O mecanismo de ação dos PAMs inicialmente se dá a partir de uma interação com a membrana parasitária carregada negativamente para aumentar a permeabilidade da membrana e levar à lise da membrana celular e à liberação do conteúdo celular. Existem dois fatores importantes para esta interação com a membrana, a estrutura conformacional do peptídeo e a razão peptídeo-lipídio (ZHANG; YAN; MENG; HONG *et al.*, 2021).

Dados mostram que os PAMs α -helicoidal se ligam à membrana lipídica aniônica e transformam sua estrutura desordenada em solução aquosa na estrutura anfifílica α -helicoidal para facilitar a interação com a membrana, já os peptídeos estruturados em folha β não sofrem uma grande transição conformacional ao interagir com a membrana devido à presença de ligação dissulfeto estável (ZHANG; YAN; MENG; HONG *et al.*, 2021).

Os principais mecanismos de interação dos peptídeos com a membrana são:

- Modelo barril: há aumento de ligações de peptídeos com a membrana ocorrendo agregação e modificação conformacional, o que causa deslocamento local dos grupos de cabeça fosfolipídica e afinamento da membrana, a partir disso as regiões hidrofóbicas helicoidais dos peptídeos α -helicoidais e peptídeos de folha β estão próximas às regiões hidrofóbicas dos fosfolipídios da membrana, enquanto as regiões hidrofílicas das hélices peptídicas estão para dentro, e múltiplas helicoidais moléculas são dispostas em paralelo para formar o lúmen central.
- Poro toroidal: Neste mecanismo as hélices peptídicas se inserem na membrana e se ligam aos lipídios para formar complexos de poros toroidais. Os PAMs acumulados localmente em altas concentrações induzem a deformação da flexão nas moléculas lipídicas, permitindo assim que os peptídeos e os grupos de cabeça lipídica sejam incorporados dentro do centro hidrofóbico lipídico.
- Modelo de carpete: Neste modelo as altas concentrações de PAM são necessárias para formar micelas e destruir a membrana microbiana. Quando a concentração de peptídeo atinge o limiar, os PAMs cobrem a membrana em aglomerados e causam a ruptura da membrana de maneira semelhante ao surfactante.
- Modelo agregado: os PAMs se ligam à membrana citoplasmática aniônica, forçando os peptídeos e lipídios a formar uma micela complexa de peptídeo-lipídio. Há o extravasamento de lipídios e água levando à morte celular. Esse mecanismo pode esclarecer que PAMs não tem apenas como alvo a membrana citoplasmática, podendo atravessar a membrana para o citoplasma e atuar em alvos intracelulares.

Vale ressaltar que a membrana de protozoários apresenta uma composição de fosfolipídios que contribui para uma carga líquida total negativa, constituindo-se, desta forma, um ponto de ataque quimioterápico bastante interessante (Lewies et al., 2015). Adicionalmente, os PAMs podem interferir no metabolismo e em processos celulares

críticos do patógeno, incluindo a síntese da parede celular (Bechinger e Gorr, 2017; Kumar et al., 2018). Além das membranas celulares os peptídeos antiparasitários podem ter alvos intracelulares que incluem mecanismos como: indução de processos de necrose e apoptose-like, podem inibir a síntese de ATP na mitocôndria interferir na bioenergética do parasita.

Dentre as PAMs, a classe denominada de temporinas, se destacam por apresentar amplo espectro de ação frente a bactérias (Gram-positivas/ Gram-negativas), fungos e parasitas (AGARWAL; SHARMA; DANG; GUPTA *et al.*, 2016; MOHANRAM; BHATTACHARJYA, 2016).

As temporinas são moléculas pequenas (13-14 resíduos de aminoácidos), de carga líquida positiva variando de 0 a +3, com estrutura em alfa-hélice em meios apolares ou em miméticos de membrana. Apresentam uma região N-terminal altamente conservada que auxiliam na ancoragem do peptídeo às membranas celulares, uma região C-terminal, hipervariável e amidada, que pode estar envolvida na seletividade e especificidade destas moléculas (MANGONI; SAUGAR; DELLISANTI; BARRA *et al.*, 2005; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017).

Dentre estes peptídeos, temos o TSHa (FLSGIVGMLGKLF-NH₂), o qual apresenta atividade anti- *Leishmania infantum* (IC₅₀=18 µmol L⁻¹) sete vezes menor que outro PAM, a dermaseptina B2, isolado da pele da rã *Phyllomedusa bicolor* (IC₅₀ = 2,5 µmol L⁻¹) (GALANTH; ABBASSI; LEQUIN; AYALA-SANMARTIN *et al.*, 2009). Outra temporina com atividade leishmanicida é o PAM TSHd (FLPAALAGIGGILGKLF), atuando contra diferentes espécies de *Leishmania*, tais como *L. infantum* (IC₅₀= 16,5 µmol L⁻¹), bem como os tripanossomatídeos *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, com moderada atividade, no entanto, com baixa seletividade (ABBASSI; RAJA; OURY; GAZANION *et al.*, 2013).

Outro peptídeo é a Histatina 5 (Hist 5) (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY), peptídeo derivado da saliva humana. Este foi descrito pela literatura com atividade antileishmania para *Leishmania donovani* com IC₅₀ para promastigotas e amastigotas de 7.3 µM e 14.4 µM, respectivamente (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008). Outro dado interessante é que este peptídeo também afeta a

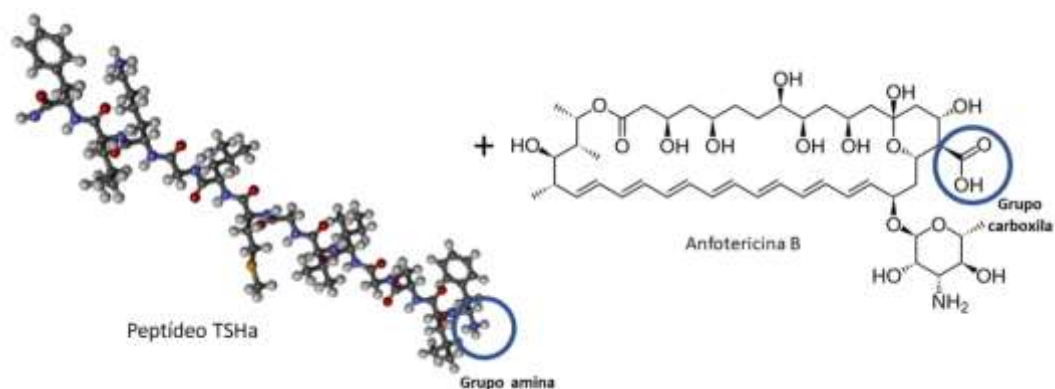
função mitocondrial da *Leishmania* pela inibição da enzima ATP sintase (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008).

Apesar do grande potencial apresentado pelos PAMs, ainda existem alguns desafios para a aplicação dessas moléculas na terapêutica em geral, tais como o potencial de toxicidade para os seres humanos, susceptibilidade a proteases, altos custos de produção, atividade e apesar de incomum, a resistência bacteriana para alguns peptídeos (Bahar e Ren, 2013).

Para contornar estes problemas, pode-se adotar a estratégia de bioconjugação. Esta abordagem consiste na junção de duas ou mais moléculas bioativas por meio de ligações covalentes, dando origem a um novo composto (Kopeček, 2013). O nosso grupo de pesquisa, tem realizado esta estratégia a fim de desenvolver compostos antimicrobianos, anti-câncer, anti fúngicos, como por exemplo, a dimerização para melhorar propriedades farmacocinéticas (Lorenzón *et al.*, 2012; Sanches *et al.*, 2015; Lorenzón *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2018).

Sendo assim, os peptídeos pertencentes à classe das temporinas TSHa e TSHd e a Hist 5 por meio do grupo carboxila livre na estrutura da Anf B na posição que permite a conjugação, do qual a bioconjugação tem por objetivo melhorar o potencial biológico destas moléculas, melhorando a sua seletividade principalmente em relação a Anf B e diminuição da toxicidade (Figura 3).

Figura 3: Esquema da bioconjugação dos peptídeos deste trabalho com a Anf B. Do qual exemplificamos o peptídeo TSHa com o seu grupo amina em destaque (Círculo azul) será ligado a região carboxila da Anf B (Círculo azul)



1.3. O fluxo de Ca^{2+} mitocondrial: oportunidade de desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos direcionados ao complexo MCU de *Leishmania*

A pesquisa por novos fármacos envolve diversas áreas como a biologia molecular, genômica, proteômica e em farmacologia e está cada vez mais apoiada em recursos computacionais hoje disponíveis (MENG; ZHANG; MEZEI; CUI, 2011). Várias etapas da pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos envolvem etapas *in silico*, que dependem de dados estruturais de proteínas disponíveis em bancos de dados especializados, como o Protein Data Bank (PDB).

As técnicas de ancoragem molecular visam prever o melhor modo de ligação correspondente de um ligante a um parceiro macromolecular (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017). Consiste na geração de um número de possíveis conformações, isto é, conformações do ligante dentro do sítio de ligação da proteína. Por essa razão, a disponibilidade da estrutura tridimensional do alvo molecular é uma condição necessária; pode ser uma estrutura experimentalmente resolvida (tal como por cristalografia de raios X ou RMN) ou uma estrutura obtida por técnicas computacionais (como modelagem de homologia) (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

Leishmania e os outros parasitas da família Trypanosomatidae possuem características bioquímicas únicas que os distinguem dos vertebrados e que podem ser explorados como alvos terapêuticos interessantes para o desenvolvimento de novos agentes anti leishmanial.

Dentro deste contexto, o planejamento de peptídeos antimicrobianos inéditos como ligantes de proteínas alvo importantes para a sobrevivência do parasito pode ser estratégico. Desta forma, componentes celulares importantes para o fluxo de Ca^{2+} e manutenção de sua homeostase podem se constituir em importantes oportunidades de intervenção terapêutica, além de contribuir para a compreensão da biologia do parasita.

O cálcio é um importante mensageiro celular, que desempenha funções importantes na sobrevivência e infectividade dos tripanossomatídeos. Este está envolvido em processos importantes como a adesão do flagelo ao corpo celular em

T. cruzi e *T. brucei*, controlando a atividade flagelar, seu processo de deslocamento, além disso desempenha um papel importante na infectividade de diversos parasitas, aumentando a sua capacidade de invadir a célula hospedeira como por exemplo em tripomastigotas em *T. cruzi* ou em amastigotas em *Leishmania amazonensis* (BENAIM; PANIZ-MONDOLFI; SORDILLO; MARTINEZ-SOTILLO, 2020; DOCAMPO; HUANG, 2015).

A sinalização por cálcio através de receptores específicos pode modular a proliferação e a diferenciação dos tripanossomatídeos, ocorre também um aumento da expressão de receptores de membrana de glicoproteínas gp35/gp82 que tem ação no processo de invasão e aderência do parasita a célula hospedeira.

O Ca^{2+} desempenha várias funções importantes em diferentes processos como o processo de invasão da célula hospedeira pelas formas tripomastigota de *T. cruzi* ou promastigotas de *Leishmania* (BENAIM; PANIZ-MONDOLFI; SORDILLO; MARTINEZ-SOTILLO, 2020), diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas em *T. cruzi* e promastigota à amastigota em *L. donovani* (Morrow et al., 1981), virulência (HUANG; BARTLETT; THOMAS; MORENO et al., 2013; HUANG; VERCESI; DOCAMPO, 2013), infectividade (DOCAMPO; HUANG, 2015), motilidade (SELVAPANDIYAN; KUMAR; MORRIS; SALISBURY et al, 2007) e secreção de proteínas tais como glicoproteínas de membrana como gp82 que é importante para o processo de adesão e invasão do parasita ao hospedeiro (BENAIM; PANIZ-MONDOLFI; SORDILLO; MARTINEZ-SOTILLO, 2020).

A regulação de várias vias de sinalização nas células eucariontes pelo Ca^{2+} pode ser descrita através de sua ligação a proteínas decodificadoras de sinal como proteínas quinases e canais iônicos (DOCAMPO; HUANG, 2015). A intrincada relação das vias de sinalização do Ca^{2+} na biologia geral dos tripanossomatídeos e seu importante papel na sobrevivência e virulência destes, torna esta via um importante alvo a ser explorado no processo de desenvolvimento de compostos, o que é corroborado pela miltefosina, cujo mecanismo de ação parece estar relacionado à alteração na homeostase do Ca^{2+} em *Leishmania* spp. (BENAIM; GARCIA, 2011; SERRANO-MARTIN; PAYARES; DE LUCCA; CARLOS MARTINEZ et al., 2009).

O Ca^{2+} também pode interferir nas cascatas de sinalização no processo de infectividade dos parasitas, sendo esta cascatas mediadas por receptores como IP3, TcIP3R e TbIP3R que, quando modulados, interferem tanto no processo de proliferação de *T.cruzi* e *T.brucei* como na diferenciação destes parasitas (DOCAMPO; HUANG, 2015; HUANG; BARTLETT; THOMAS; MORENO *et al.*, 2013).

Em *L. donovani*, foi demonstrado que a sinalização de Ca^{2+} participa da diferenciação do estágio de amastigota à promastigota (Morrow *et al.*, 1981). Também em *Leishmania donovani*, uma cisteína-protease dependente de Ca^{2+} , a caldonopaina, demonstrou ter um papel fundamental no catabolismo, processamento endógeno de proteínas, invasão celular e outras ações biológicas (BENAIM; PANIZ-MONDOLFI; SORDILLO; MARTINEZ-SOTILLO, 2020).

O acúmulo de Ca^{2+} em *Trypanosoma* pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, o que estimula a morte celular, outro dado importante é que estudo com RNAi com canais iônicos mitocondriais que transportam cálcio podem reduzir a captação do Ca^{2+} e, aumentando a razão AMP/ATP o que estimula a formação de autofagossomo, produzindo efeitos deletérios no crescimento *in-vitro* e também interfere na infectividade em camundongos na infecção por *T.cruzi* (BENAIM; PANIZ-MONDOLFI; SORDILLO; MARTINEZ-SOTILLO, 2020).

Em tripanossomatídeos, além dos acidocalcissomos e retículo endoplasmático, as mitocôndrias desempenham um papel muito importante na manutenção da homeostase do Ca^{2+} (DOCAMPO *et al.*, 2005). Os tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria cujas funções e forma variam de acordo com estágio de vida do parasita e difere do hospedeiro mamífero. Nas formas parasitárias presentes na corrente sanguínea como a amastigota, a organela mitocondrial não tem cristas e a maioria dos complexos são responsáveis pela fosforilação oxidativa, enquanto que na forma encontrada nos insetos como por exemplo a promastigota de *Leishmania*, a membrana mitocondrial interna é fortemente aumentada para formar cristas que abrigam os complexos de fosforilação oxidativos para a produção de energia. Além disso, toda a organela está aumentada formando uma rede complexa em toda a célula (JAKOB; HOFFMANN; AMODEO; PEITSCH *et al.*, 2016)

As mitocôndrias possuem capacidade de armazenar Ca^{2+} , importante mensageiro celular. A captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias é uma dinâmica altamente regulada, através de uma captação transitória de Ca^{2+} . Vale ressaltar a importância da captação desse íon pelas mitocôndrias, pois através dele ocorre a regulação da produção de energia e, seu excesso, pode levar à morte celular (GOODMAN; BUCHANAN; MCFADDEN, 2017).

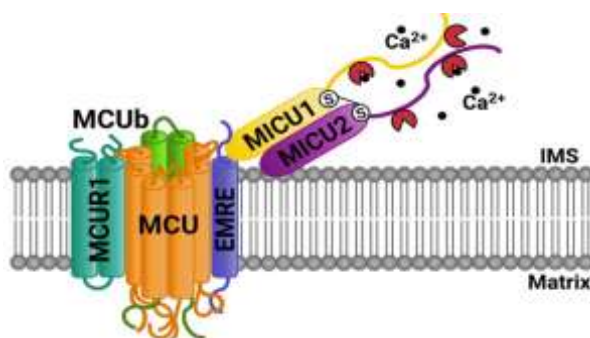
A fim de alcançar a matriz mitocondrial, o Ca^{2+} citosólico deve atravessar a membrana mitocondrial externa (OMM) e a membrana mitocondrial interna (IMM), as quais contêm canais iônicos para o transporte do Ca^{2+} . Na OMM, as proteínas do canal aniônico dependente de tensão são altamente permeáveis ao Ca^{2+} e mediam o transporte desse íon no espaço intermembranar (IMS), além de desempenharem função no metabolismo celular, transportando ATP e outros pequenos metabólitos (DELIERNEUX; KOUBA; SHANMUGHAPRIYA; POTIER-CARTEREAU *et al.*, 2020; RAMAKRISHNAN; DOCAMPO, 2018). Já a IMM é menos permeável a íons e pequenas moléculas.

Assim, o transporte de Ca^{2+} ocorre via estabelecimento de um gradiente eletroquímico através do IMM, utilizando um canal específico denominado MCU (do inglês, **M**itochondrial **C**alcium **U**niporter), formado por um complexo multimérico (MAMMUCARI; GHERARDI; RIZZUTO, 2017). O complexo MCU em tripanossomatídeos é formado por um canal unidirecional para os íons cálcio, por uma subunidade chamada de MCUB e por 3 subunidades regulatórias MCU1 e MCU2 e EMRE, dos quais este complexo se diferencia do complexo MCU de mamíferos pelo fato de que em mamíferos há uma subunidade regulatória, a MCU3, além desta também apresentar uma organização tetramérica do canal MCU em humanos e em tripanossomatídeos a proteína é pentamérica (Figura 4).

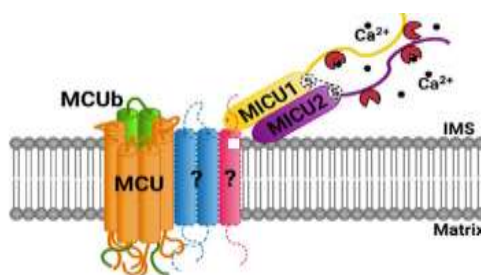
Dados da literatura indicam que o MCU tem papel fundamental na manutenção do Ca^{2+} via mitocôndria e é essencial para a sobrevivência do parasita, já que o silenciamento deste canal em *T. brucei* causa aumento na razão AMP/ATP, seguido por autofagia (LANDER; CHIURILLO; BERTOLINI; DOCAMPO *et al.*, 2018).

Figura 4: Estrutura do complexo MCU em (A) em seres humanos, a proteína MCU é um tetrâmero e o complexo MCU tem mais subunidades reguladoras e em (B) é a estrutura do completo MCU em tripanossomatídeos, do qual a proteína MCU é um pentâmero. Neste caso para Tripanossomatídeos o complexo MCU é formado que é formado por um canal iônico MCU, a subunidade MCUB e subunidades regulatórias do complexo MCU1 e MCU2 e a EMRE, diferente dos mamíferos que apresentam mais subunidades regulatórias MCU3.

a)



b)



Fonte: Adaptado de LANDER; CHIURILLO; BERTOLINI; DOCAMPO *et al.*, 2018.

A proteína MCU, de forma geral, possui regiões específicas importantes para o seu funcionamento, dentre os quais a presença de dois domínios transmembranares, separados por uma região hidrofílica e que contém aminoácidos de carga negativa, importantes para a ligação do cálcio e abertura do poro MCU e faz parte do filtro de seletividade, denominado DIME, cuja região N e C terminal encontram-se voltadas para a matriz mitocondrial, dos quais está proteína em tripanossomatídeos possui alto nível de conservação e uma organização pentamérica (LANDER; CHIURILLO; BERTOLINI; DOCAMPO *et al.*, 2018; YOO; WU; YIN; HERZIK *et al.*, 2018). Os resíduos carregados negativamente do loop DIME são

responsáveis por alterações conformacionais da proteína MCU permitindo sua abertura ocasionada pela ligação do cálcio, seguida de transporte para o interior da matriz mitocondrial. (YOO; WU; YIN; HERZIK *et al.*, 2018).

Para o funcionamento do MCU é necessário que haja um gradiente eletroquímico através do IMM, o qual gera um potencial de membrana para a captação do cálcio, outro ponto importante é que o gradiente também conta com o apoio com fontes de cálcio presentes em outras organelas como por exemplo o retículo endoplasmático (LANDER; CHIURILLO; BERTOLINI; DOCAMPO *et al.*, 2017).

Diante do exposto, e considerando a importância de MCU de tripanossomatídeos para captação do Ca^{2+} , baseado em estudos com tripanossomas, infere-se que o complexo MCU pode se constituir em um interessante alvo terapêutico (BERTOLINI; CHIURILLO; LANDER; VERCESI *et al.*, 2019; CHAUDHURI; CLAPHAM, 2014; DOCAMPO; VERCESI; HUANG, 2014), com destaque para os resíduos essenciais do motivo DIME, Asp223 e Glu226, os quais podem ser explorados em estratégias de ancoragem molecular para o desenvolvimento de inibidores do fluxo de Ca^{2+} para a mitocôndria em *Leishmania*.

2. Objetivo

Este trabalho está dividido em dois objetivos principais: (1) caracterizar a atividade leishmanicida de peptídeos da classe das temporinas e das histatinas sintéticos funcionalizados ao antileishmanial Anf B e (2) realizar modelagem molecular da proteína MCU de *Leishmania* baseado em homologia para fins de planejamento e síntese de peptídeos antileishmanial inibidores do influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria parasitária.

Objetivos específicos a serem atingidos em (1):

1. Sintetizar e caracterizar os peptídeos TSHa (FLSGIVGMLGKLF-NH₂), TSHd (FLPAALAGIGGILGKLF-NH₂) e Hist 5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY);

1.1 Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência e confirmação da Massa molecular por espectrometria de massas.

1.2 Análise da estrutura secundária das moléculas por dicroísmo circular.

2. Realizar e caracterizar a bioconjugação dos peptídeos TSHa, TSHd, e Hist 5 com Anf B e síntese do dímero (TSHa)₂K,
3. Determinar as atividades (IC₅₀) anti-promastigota, anti-amastigota e citotóxica (CC₅₀) dos peptídeos TSHa, TSHd, (TSHa)₂K, Hist 5 e bioconjugados;
4. Caracterização dos peptídeos:
 - Avaliar a capacidade dos peptídeos TSHa, TSHd e Hist 5, (TSHa)₂K e bioconjugados em permeabilizar de membrana com miméticos de membrana e ensaios de danos de membrana por citometria de fluxo.
 - Estudos de mecanismo de ação dos peptídeos e bioconjugados por microscopia fluorescência e microscopia de fluorescência confocal em *L. mexicana*

Objetivos específicos a serem atingidos em (2):

1. Construir um modelo tridimensional da proteína MCU do complexo MCU de *L. mexicana* baseado em homologia com a estrutura terciária de MCU de *Caenorhabditis elegans*;
2. Realizar análise de *docagem* molecular com inibidores de MCU (e.g. mitoxantrone), a fim de identificar quais os principais aminoácidos que se ligam aos inibidores, tornando o docagem mais precisa e permitindo assim a criação de peptídeos que inibam essa proteína.
3. Planejar os peptídeos potencialmente inibidores do poro de seletividade do MCU;

5. Conclusões

O presente trabalho encontrou algumas dificuldades para a obtenção dos compostos conjugados com Anf B, no entanto devido a uma diversidade de estratégias de síntese para acoplamento da Anf B foi possível obter algumas das moléculas e as mesmas apresentam resultados biológicos interessantes.

Os compostos bioconjugados com Anf B obtidos apresentaram atividade leishmanicida com baixa citotoxicidade, do qual destacamos o alto índice de seletividade desses compostos, mostrando que a estratégia da bioconjugação foi eficaz em combater um dos grandes problemas do tratamento leishmaniose com AnfB que é a falta de seletividade.

Outro ponto importante é que as técnicas de citometria e microscopia puderam evidenciar que o provável mecanismo de ação dos bioconjugados com Anf B derivados é a membrana e que a carga e estrutura desses peptídeos é importante para isso.

O bioconjugado Anf B-Histatina pode possuir como principal alvo a mitocôndria, a conjugação da Anf B neste peptídeo permitiu que este permeabilizasse a membrana do parasita, fazendo com que este compartimentalizasse em sua organela alvo que é a mitocôndria.

Outro ponto importante é que em relação aos estudos de docking foi possível obter a estrutura por homologia e também foi realizado um estudo com inibidores de MCU a fim de verificar as principais interações químicas e também planejar peptídeos que possam ser capazes de inibir o poro de MCU de *L. mexicana* com uma certa especificidade in-silico a partir do estudo da interação dos peptídeos com proteína MCU humana do qual selecionamos os peptídeos que não interagiam com a proteína humana.

6. Referências

ABBASSI, F.; OURY, B.; BLASCO, T.; SERENO, D. et al. Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid *Pelophylax saharica*. **Peptides**, v. 29, n. 9, p. 1526-1533, Sep 2008.

ABBASSI, F.; RAJA, Z.; OURY, B.; GAZANION, E. et al. Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 388-399, Feb 2013

ANDRÉ, S.; RAJA, Z.; HUMBLLOT, V.; PIESSE, C. et al. Functional Characterization of Temporin-SHe, a New Broad-Spectrum Antibacterial and Leishmanicidal Temporin-SH Paralog from the Sahara Frog. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 18, Sep 13 2020.

AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. **Pharmaceuticals** (Basel), v. 6, n. 8, p. 1055-81, Aug 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24276381> >.

AGRAWAL, P.; RAGHAV, P. K.; BHALLA, S.; SHARMA, N. et al. Overview of free software developed for designing drugs based on protein-small molecules interaction. **Curr Top Med Chem**, Aug 2018.

ALBEROLA, J.; RODRÍGUEZ, A.; FRANCINO, O.; ROURA, X. et al. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 2, p. 641-643, Feb 2004.

AGARWAL, S.; SHARMA, G.; DANG, S.; GUPTA, S. et al. Antimicrobial Peptides as Anti-Infectives against Staphylococcus epidermidis. **Med Princ Pract**, v. 25, n. 4, p. 301-308, 2016 2016.

ARDUINO, D. M.; WETTMARSHAUSEN, J.; VAIS, H.; NAVAS-NAVARRO, P. et al. Systematic Identification of MCU Modulators by Orthogonal Interspecies Chemical Screening. **Mol Cell**, v. 67, n. 4, p. 711-723.e717, Aug 2017.

AVCI, F. G.; AKBULUT, B. S.; OZKIRIMLI, E. Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization. **Biomolecules**, v. 8, n. 3, 08 22 2018.

BAIBEK, A.; ÜÇÜNCÜ, M.; SHORT, B.; RAMAGE, G. et al. Dyeing fungi: amphotericin B based fluorescent probes for multiplexed imaging. **Chem Commun** (Camb), v. 57, n. 15, p. 1899-1902, Feb 23 2021.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals** (Basel), v. 6, n. 12, p. 1543-75, Nov 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287494> >.

BATISTA, M. N. et al. GA-Hecate antiviral properties on HCV whole cycle represent a new antiviral class and open the door for the development of broad spectrum antivirals. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14329, Sep 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30254334> >.

BAILEY, F.; MONDRAGON-SHEM, K.; HAINES, L. R.; OLABI, A. et al. Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 2, p. e0007092, Febr. 2019.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **J Dent Res**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 03 2017. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872334> >.

BELLAVITA, R.; FALANGA, A.; BUOMMINO, E.; MERLINO, F. et al. Novel temporin L antimicrobial peptides: promoting self-assembling by lipidic tags to tackle superbugs. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 35, n. 1, p. 1751-1764, Dec 2020.

BENAIM, G.; GARCIA, C. R. S. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 3, p. 471-481, Dec 2011.

BENADUCCI, T.; MATSUMOTO, M. T.; SARDI, J. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. et al. A flow cytometry method for testing the susceptibility of *Cryptococcus* spp. to amphotericin B. **Rev Iberoam Micol**, v. 32, n. 3, p. 159-163, Jul-Sep 2015.

BERTOLINI, M. S.; CHIURILLO, M. A.; LANDER, N.; VERCESI, A. E. et al. MICU1 and MICU2 Play an Essential Role in Mitochondrial Ca. **mBio**, v. 10, n. 3, May 2019.

BOUAZIZI-BEN MESSAOUD, H.; GUICHARD, M.; LAWTON, P.; DELTON, I. et al. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of *Leishmania donovani* Complex Promastigotes into Amastigotes. **Lipids**, v. 52, n. 5, p. 433-441, May 2017.

BROMLEY, E. H.; CHANNON, K. J. Alpha-helical peptide assemblies giving new function to designed structures. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 103, p. 231-275, 2011.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, Sept. 2018.

CABEZAS, Y.; LEGENTIL, L.; ROBERT-GANGNEUX, F.; DALIGAULT, F. et al. Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. **Org Biomol Chem**, v. 13, n. 31, p. 8393-8404, Aug 2015.

CASALLANOVO, F.; DE OLIVEIRA, F. J.; DE SOUZA, F. C.; ROS, U. et al. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.

CHADBOURNE, F. L.; RALEIGH, C.; ALI, H. Z.; DENNY, P. W. et al. Studies on the antileishmanial properties of the antimicrobial peptides temporin A, B and 1Sa. **J Pept Sci**, v. 17, n. 11, p. 751-755, Nov 2011.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.

CHAUDHURI, D.; CLAPHAM, D. E. Outstanding questions regarding the permeation, selectivity, and regulation of the mitochondrial calcium uniporter. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 449, n. 4, p. 367-369, Jul 2014.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, Jul. 2019.

CHAPPLE, D. S.; HUSSAIN, R.; JOANNOU, C. L.; HANCOCK, R. E. et al. Structure and association of human lactoferrin peptides with Escherichia coli lipopolysaccharide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2190-2198, Jun 2004.

CRAUWELS, P.; BANK, E.; WALBER, B.; WENZEL, U. A. et al. Cathelicidin Contributes to the Restriction of. **Front Immunol**, v. 10, p. 2697, 2019.

COSTA, N. C. S.; PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; CLEMENTINO, L. C. et al. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. **PLoS One**, 15, n. 3, p. e0228740, 2020.

CUNHA, M. A.; LEÃO, A. C.; DE CASSIA SOLER, R.; LINDOSO, J. A. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **Am J Trop Med Hyg**, 93, n. 6, p. 1214-1218, Dec 2015.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. SIMENEW, K. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 4:2 p. january, 2013.

DE ALMEIDA, L.; FUJIMURA, A.; DEL CISTIA, M.; FONSECA-SANTOS, B. et al. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis - a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, p. 117-133, 2017.

DELIERNEUX, C.; KOUBA, S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; POTIER-CARTEREAU, M. et al. Mitochondrial Calcium Regulation of Redox Signaling in Cancer. **Cells**, v. 9, n. 2, Feb 2020.

DESHPANDE, N. M.; GANGRADE, M. G.; KEKARE, M. B.; VAIDYA, V. V. Determination of free and liposomal amphotericin B in human plasma by liquid chromatography-mass spectroscopy with solid phase extraction and protein precipitation techniques. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 878, n. 3-4, p. 315-326, Feb 2010.

DÍAZ-ACHIRICA, P.; PRIETO, S.; UBACH, J.; ANDREU, D. et al. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides. **Eur J Biochem**, v. 224, n. 1, p. 257-263, Aug 15 1994.

DING, J.; LUO, A. F.; HU, L.; WANG, D. et al. Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. **Sci China Life Sci**, v. 57, n. 3, p. 269-274, Mar 2014.

DOCAMPO, R.; HUANG, G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 194-202, Mar 2015.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol Today**, v. 15, n. 11, p. 443-448, Nov 1999.

DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E.; MORENO, S. N. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 310, Pt 3, p. 1005-1012, Sep 1995.

DOS SANTOS, M. G.; MUXEL, S. M.; ZAMPIERI, R. A.; POMORSKI, T. G. *et al.* Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the *Leishmania* genus. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55604, 2013.

EDGERTON, M.; KOSHLUKOVA, S. E.; ARAUJO, M. W.; PATEL, R. C. *et al.* Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 12, p. 3310-3316, Dec 2000.

EGGIMANN, G. A.; SWEENEY, K.; BOLT, H. L.; ROZATIAN, N. *et al.* The role of phosphoglycans in the susceptibility of *Leishmania mexicana* to the temporin family of anti-microbial peptides. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2775-2785, Feb. 2015.

EL-DIRANY, R.; SHAHROUR, H.; DIRANY, Z.; ABDEL-SATER, F. *et al.* Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, Jul. 2021.

EL AMRI, C.; LACOMBE, C.; ZIMMERMAN, K.; LADRAM, A. *et al.* The plasticins: membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. **Biochemistry**, v. 45, n. 48, p. 14285-14297, Dec. 2006.

EL-FAHAM, A.; KHATTAB, S. N.; SUBIRÓS-FUNOSAS, R.; ALBERICIO, F. BOP-OXy, BOP-OBt, and BOP-OAt: novel organophosphinic coupling reagents useful for solution and solid-phase peptide synthesis. **J Pept Sci**, v. 20, n. 1, p. 1-6, Jan 2014.

ELLIOTT, A. D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. **Curr Protoc Cytom**, v. 92, n. 1, p. e68, Mar. 2020.

FERNANDEZ, D. I.; LE BRUN, A. P.; WHITWELL, T. C.; SANI, M. A. *et al.* The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. **Phys Chem Chem Phys**, v. 14, n. 45, p. 15739-15751, Dec 2012.

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in Leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 95, 2012.

GARG, V.; KIRICHOK, Y. Keeping a lid on calcium uptake. **e-Life**, v. 5, e17293, Jun. 2016.

GALANTH, C.; ABBASSI, F.; LEQUIN, O.; AYALA-SANMARTIN, J. et al. Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain. **Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 313-327, Jan 2009.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 3, May 2017. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28513415> >.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Des Devel Ther**, v. 12, p. 25-40, 2018.

Gelhaus, C.; Jacobs, T.; Andrä, J.; Leippe, M., The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic Plasmodium falciparum. **Antimicrob Agents Chemother** v. 52, n. 5, p. 1713-1720, 2008.

GOODMAN, C. D.; BUCHANAN, H. D.; MCFADDEN, G. I. Is the Mitochondrion a Good Malaria Drug Target? **Trends Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 185-193, Mar. 2017.

GUERRERO, E.; SAUGAR, J. M.; MATSUZAKI, K.; RIVAS, L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 2980-2986, Aug 2004.

HUANG, G.; BARTLETT, P. J.; THOMAS, A. P.; MORENO, S. N. et al. Acidocalcisomes of Trypanosoma brucei have an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor that is required for growth and infectivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 5, p. 1887-1892, Jan 2013.

JAKOB, M.; HOFFMANN, A.; AMODEO, S.; PEITSCH, C. et al. Mitochondrial growth during the cell cycle of Trypanosoma brucei bloodstream forms. **Sci Rep**, v. 6, p. 36565, Nov. 2016.

JANG, Y. H.; LIM, K. I. Recent Advances in Mitochondria-Targeted Gene Delivery. **Molecules**, v. 23, n. 9, Sep 2018.

JONKMAN, J.; BROWN, C. M.; WRIGHT, G. D.; ANDERSON, K. I. et al. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. **Nat Protoc**, v. 15, n. 5, p. 1585-1611, May 2020.

KELLICI, T. F.; CHATZIATHANASIADOU, M. V.; LEE, M. S.; SAYYAD, N. et al. Rational design and structure-activity relationship studies of quercetin-amino acid hybrids targeting the anti-apoptotic protein Bcl-xL. **Org Biomol Chem**, v. 15, n. 37, p. 7956-7976, Sep 2017.

KITA, K.; NIHEI, C.; TOMITSUKA, E. Parasite mitochondria as drug target: diversity and dynamic changes during the life cycle. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 23, p. 2535-2548, Dec 2003.

KODEDOVÁ, M.; SYCHROVÁ, H. Synthetic antimicrobial peptides of the halictines family disturb the membrane integrity of *Candida* cells. **Biochim Biophys Acta Biomembr**, v. 1859, n. 10, p. 1851-1858, Oct 2017.

KÜCKELHAUS, S. A. S.; AQUINO, D. S.; BORGES, T. K.; MOREIRA, D. C. et al. Phylloseptin-1 is Leishmanicidal for Amastigotes of *Leishmania amazonensis* Inside Infected Macrophages. **Int J Environ Res Public Health**, v. 17, n. 13, 4856, Jul. 2020.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility **In Vivo**. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, Jan 2018. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351202> >.

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; BERTOLINI, M. S.; DOCAMPO, R. et al. The mitochondrial calcium uniporter complex in trypanosomes. **Cell Biol Int**, v. 42, n. 6, p. 656-663, Dec 2017.

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; BERTOLINI, M. S.; DOCAMPO, R. et al. The mitochondrial calcium uniporter complex in trypanosomes. **Cell Biol Int**, 42, n. 6, p. 656-663, Jun 2018. <https://doi.org/10.1002/cbin.10928>.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**, 26, n. 4, p. 223-227, Dec 31 2009.

LEWIES, A. et al. The Potential Use of Natural and Structural Analogues of Antimicrobial Peptides in the Fight against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15392-433, Aug 2015. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26305243> >.

WHO. Fact sheets. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. acesso em: Abril de 2021.

LI, J.; KOH, J. J.; LIU, S.; LAKSHMINARAYANAN, R. et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Front Neurosci**, v. 11, p. 73, 2017.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, Jun 15 1990.

LORENZÓN, E. N. et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, Jun 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391524> >.

LORENZÓN, E. N.; PICCOLI, J. P.; CILLI, E. M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2627-31, Nov 2014. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209238> >.

LORENZON, E. N.; PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M. Dimerization of Antimicrobial Peptides: A Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Peptide Activity. **Protein Pept Lett**, v. 26, n. 2, p. 98-107, 2019.

LIU, Y.; SHI, J.; TONG, Z.; JIA, Y. et al. The revitalization of antimicrobial peptides in the resistance era. **Pharmacol Res**, v. 163, p. 105276, Jan 2021.

LU, H.; ZHONG, L.; CHANG, K.; DOCAMPO, R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in Leishmania

mexicana amazonensis amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9464-9473, Apr 1997.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; SAUGAR, J. M. et al. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania. **FASEB J**, v. 22, n. 6, p. 1817-1828, Jun 2008.

LYNN, M. A.; KINDRACHUK, J.; MARR, A. K.; JENSSEN, H. et al. Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on Leishmania major promastigote and amastigote growth: role of leishmanolysin in parasite survival. **PLoS Negl Trop Dis**, 5, n. 5, p. e1141, 2011.

MA, Y. X.; WANG, C. Y.; LI, Y. Y.; LI, J. et al. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. **Adv Sci (Weinh)**, v. 7, n. 1, p. 1901872, Jan 2020.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 194, 2016. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28083516> >.

MANGONI, M. L.; SAUGAR, J. M.; DELLISANTI, M.; BARRA, D. et al. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **J Biol Chem**, v. 280, n. 2, p. 984-990, Jan 2005.

MAMMUCARI, C.; GHERARDI, G.; RIZZUTO, R. Structure, Activity Regulation, and Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Health and Disease. **Front Oncol**, v. 7, p. 139, 2017.

MBONGO, N.; LOISEAU, P. M.; BILLION, M. A.; ROBERT-GERO, M. Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 2, p. 352-357, Feb 1998.

MCCALL, L. I.; EL AROUSSI, A.; CHOI, J. Y.; VIEIRA, D. F. et al. Targeting Ergosterol biosynthesis in Leishmania donovani: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003588, Mar 2015.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**, v. 7, n. 2, p. 146-157, Jun 2011.

MERRIFIELD, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. **Biochemistry**, v. 3, n. 9, p. 1385-1390, Sep 1964. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00897a032>>.

MILES, A. J.; JANES, R. W.; WALLACE, B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. **Chem Soc Rev**, v. 50, n. 15, p. 8400-8413, Aug 2021.

MOHANRAM, H.; BHATTACHARJYA, S. 'Lollipop'-shaped helical structure of a hybrid antimicrobial peptide of temporin B-lipopolysaccharide binding motif and mapping cationic residues in antibacterial activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1860, n. 6, p. 1362-1372, Jun 2016.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 121, 2012.

MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. **Chem Biol Drug Des**, v. 93, n. 1, p. 12-20, Jan 2019.

MURGIA, M.; RIZZUTO, R. Molecular diversity and pleiotropic role of the mitochondrial calcium uniporter. **Cell Calcium**, v. 58, n. 1, p. 11-17, Jul 2015.

NADERER, T.; DANDASH, O.; MCCONVILLE, M. J. Calcineurin is required for Leishmania major stress response pathways and for virulence in the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 471-480, Apr 2011.

NGUYEN, N. X.; ARMACHE, J. P.; LEE, C.; YANG, Y. et al. Cryo-EM structure of a fungal mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 570-574, Jul 2018.

OUALHA, R.; BARHOUMI, M.; MARZOUKI, S.; HARIGUA-SOUIAI, E. et al. Infection of Human Neutrophils With. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 153, 2019.

OKADA-JUNIOR, Celso Yassuo; MONTEIRO, Gustavo Claro; AGUIAR, Anna Caroline Campos; BATISTA, Victor Sousa; DE SOUZA, Juliana Oliveira; SOUZA, Guilherme Eduardo; BUENO, Renata Vieira; OLIVA, Glaucius; NASCIMENTO-JÚNIOR, Nailton M.; GUIDO, Rafael Victorio Carvalho; BOLZANI, Vanderlan Silva. Phthalimide Derivatives with Bioactivity against *Plasmodium falciparum*: Synthesis, Evaluation, and Computational Studies Involving bc1 Cytochrome Inhibition. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9424–9430, Aug. 2018. ISSN: 2470-1343. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsomega.8b01062>.

OLIVEIRA, I. H. R.; FIGUEIREDO, H. C. P.; REZENDE, C. P.; VERANO-BRAGA, T. *et al.* Assessing the composition of the plasma membrane of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *L. (L.) amazonensis* using label-free proteomics. **Exp Parasitol**, v. 218, p. 107964, Nov 2020.

OPAS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, dezembro 2020- Disponível em < <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-dezembro-2020>>. Acesso em: setembro 2022.

OPREA, T. I.; BAUMAN, J. E.; BOLOGA, C. G.; BURANDA, T. *et al.* Drug Repurposing from an Academic Perspective. **Drug Discov Today Ther Strateg**, v. 8, n. 3-4, p. 61-69, 2011.

OXENOID, K.; DONG, Y.; CAO, C.; CUI, T. *et al.* Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 533, n. 7602, p. 269-273, 05 2016.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophys Rev**, v. 9, n. 2, p. 91-102, Apr 2017.

PITALE, D. M.; KAUR, G.; BAGHEL, M.; KAUR, K. J. *et al.* Halictine-2 antimicrobial peptide shows promising anti-parasitic activity against *Leishmania* spp. **Exp Parasitol**, v. 218, p. 107987, Nov 2020.

PRASAD, A.; KAUR, S.; MALLA, N.; GANGULY, N. *et al.* Ca²⁺ signaling in the transformation of promastigotes to axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 224, n. 1-2, p. 39-44, 2001.

PUCADYIL, T. J.; TEWARY, P.; MADHUBALA, R.; CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 145-152, Feb 2004.

RAJA, Z.; ANDRÉ, S.; ABBASSI, F.; HUMBLLOT, V. et al. Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174024, 2017.

RAMAKRISHNAN, S.; DOCAMPO, R. Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca. **Genes** (Basel), v. 9, n. 6, Jun 2018.

RAI, A.; FERRÃO, R.; PALMA, P.; PATRICIO, T. et al. Antimicrobial peptide-based materials: opportunities and challenges. **J Mater Chem B**, v. 10, n. 14, p. 2384-2429, Apr. 2022.

REVUELTO, A.; LÓPEZ-MARTÍN, I.; DE LUCIO, H.; GARCÍA-SORIANO, J. C. et al. Small Molecule-Peptide Conjugates as Dimerization Inhibitors of. **Pharmaceuticals** (Basel), v. 14, n. 7, 689, Jul 2021.

RUSSELL, A. L.; KENNEDY, A. M.; SPUCHES, A. M.; VENUGOPAL, D. et al. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. **Chem Phys Lipids**, v. 163, n. 6, p. 488-497, Jun 2010.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 19, n. 3, p. 195-200, Jun 1986.

SANCHES, P. R. et al. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. **Amino Acids**, v. 47, n. 7, p. 1433-1443, Jul 2015. ISSN: 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25868656> >.

SAVOJARDO, C.; MARTELLI, P. L.; FARISELLI, P.; CASADIO, R. TPpred2: improving the prediction of mitochondrial targeting peptide cleavage sites by exploiting sequence motifs. **Bioinformatics**, v. 30, n. 20, p. 2973-2974, Oct 2014.

SANTOS, V. A.; REGASINI, L. O.; NOGUEIRA, C. R.; PASSERINI, G. D. et al. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **J Nat Prod**, v. 75, n. 5, p. 991-995, May 2012.

SAUGAR, J. M.; DELLISANTI, M.; BARRA, D. et al. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **J Biol Chem**, v. 280, n. 2, p. 984-990, Jan 2005.

SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-86, Oct 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079498> >.

SELVAPANDIYAN, A.; KUMAR, P.; MORRIS, J. C.; SALISBURY, J. L. et al. Centrin1 is required for organelle segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 9, p. 3290-3301, Sep 2007.

SEMINI, G.; PAAPE, D.; PATEROU, A.; SCHROEDER, J. et al. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 4, Aug. 2017.

SHIRZADI, M. R. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Res Rep Trop Med**, v. 10, p. 11-18, 2019.

SIDIK, S. M.; HORTUA TRIANA, M. A.; PAUL, A. S.; EL BAKKOURI, M. et al. Using a Genetically Encoded Sensor to Identify Inhibitors of *Toxoplasma gondii* Ca²⁺ Signaling. **J Biol Chem**, v. 291, n. 18, p. 9566-9580, Apr 2016.

SPÄTH, G. F.; EPSTEIN, L.; LEADER, B.; SINGER, S. M. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 9258-9263, Aug 2000.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, Feb 2017.

SUNDAR, S.; SINGH, B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Ther Targets**, v. 22, n. 6, p. 467-486, Jun 2018.

SHU, C.; LI, T.; YANG, W.; LI, D. et al. Amphotericin B-conjugated polypeptide hydrogels as a novel innovative strategy for fungal infections. **R Soc Open Sci**, v. 5, n. 3, p. 171814, Mar 2018.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, v. 6, p. 750, 2017. Disponível em: doi: 10.12688/f1000research.11120.1.

VICENTE, E. F.; NOBRE-PAVINATTO, T. M.; PAVINATTO, F. J.; DE OLIVEIRA JUNIOR, O. N. et al. N-terminal microdomain peptide from human dihydroorotate dehydrogenase: structure and model membrane interactions. **Protein Pept Lett**, v. 22, n. 2, p. 119-129, 2015.

VYLKOVA, S.; SUN, J. N.; EDGERTON, M. The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 1-2, p. 91-97, Mar 2007.

VELÁSQUEZ, A. M. A.; RIBEIRO, W. C.; VENN, V.; CASTELLI, S. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 8, Aug. 2017.

VELÁSQUEZ, A.; DE SOUZA, R.; PASSALACQUA, T.; RIBEIRO, A. et al. Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150360>.

Torrent, M.; Pulido, D.; Rivas, L.; Andreu, D., Antimicrobial peptide action on parasites. **Curr Drug Targets** 2012, v. 13, n. 9, p. 1138-1147.

TEIXEIRA, F.; CASTRO, H.; CRUZ, T.; TSE, E. et al. Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 7, p. E616-624, Feb 2015.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunol Res**, v. 41, n. 1, p. 15-25, 2008.

WILLIAMS, C. J.; HEADD, J. J.; MORIARTY, N. W.; PRISANT, M. G. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Sci**, v. 27, n. 1, p. 293-315, Jan. 2018.

WOODS, J. J.; NEMANI, N.; SHANMUGHAPRIYA, S.; KUMAR, A. et al. A Selective and Cell-Permeable Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) Inhibitor Preserves Mitochondrial Bioenergetics after Hypoxia/Reoxygenation Injury. **ACS Cent Sci**, v. 5, n. 1, p. 153-166, Jan 2019.

WOODS, J. J.; WILSON, J. J. Inhibitors of the mitochondrial calcium uniporter for the treatment of disease. **Curr Opin Chem Biol**, v. 55, p. 9-18, Apr. 2020.

YANG, H. et al. Structure and Bioactivity of a Modified Peptide Derived from the LPS-Binding Domain of an Anti-Lipopolysaccharide Factor (ALF) of Shrimp. **Mar Drugs**, v. 14, n. 5, May 2016. ISSN 1660-3397. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27213409> >.

YOO, J.; WU, M.; YIN, Y.; HERZIK, M. A. et al. Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter. **Science**, v. 361, n. 6401, p. 506-511, Aug. 2018.

ZHANG, Q. Y.; YAN, Z. B.; MENG, Y. M.; HONG, X. Y. et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Mil Med Res**, v. 8, n. 1, p. 48, Sep. 2021.

ZAHEDIFARD, F.; LEE, H.; NO, J. H.; SALIMI, M. et al. Comparative study of different forms of Jellein antimicrobial peptide on Leishmania parasite. **Exp Parasitol**, v. 209, p. 107823, Feb 2020.

ZHAO, H.; RINALDI, A. C.; DI GIULIO, A.; SIMMACO, M. et al. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporins B and L. **Biochemistry**, v. 41, n. 13, p. 4425-4436, Apr 2002.

