

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

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^ª. 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 Campus 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 Adauto, 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 Lilnc, 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 Lilnc 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 Lilnc apresentaram índice referente a 15,9 e 24, respectivamente. Para o modelo murino, o controle apresentou índice de 36,7, enquanto Li1 e Lilnc 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 Lilnc, 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 Lilnc, 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 Lilnc 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 biotinilado, 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 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 4,7 minutos	64
Figura 15 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1nc biotinilado 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 saudáveis, 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 saudáveis, 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 saudáveis, 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	Glicosfingolípido
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> <i>spp.</i>	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</i> <i>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-Garcia *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.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

A pesquisa referente às doenças tropicais negligenciadas (DTNs), como as leishmanioses, apresenta desafios relacionados às doenças investigadas, falta de infraestrutura, cultura, sistemas socioecológicos, políticas de saúde conflitantes e requisitos éticos (Boelaert, 2016). O Brasil possui a maior população vivendo com uma ou mais DTNs do Hemisfério Ocidental. Apesar dos avanços, a elevada ocorrência dessas infecções exige uma melhor coordenação entre as atividades de pesquisa e desenvolvimento e os programas de saúde pública (Fonseca *et al.*, 2020).

O gênero *Leishmania* compreende dezenas de espécies descritas, das quais mais de 20 são reconhecidas como patogênicas ao ser humano. As leishmanioses têm ampla ocorrência, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Ásia, África e mediterrâneo (PAHO, 2024; Weld *et al.*, 2022). A forma cutânea da doença afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas, com cerca de 2 milhões de novos casos relatados anualmente, sendo endêmica em quase 100 países e colocando cerca de 350 milhões de pessoas em risco (De Vries; Schalling, 2022).

As principais formas clínicas da leishmaniose são cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). Além disso, a apresentação clínica depende de fatores principalmente associados à espécie infectante, virulência do parasita e à resposta imunológica individual (Mokni, 2019). Na LC, uma pápula geralmente aparece no local da inoculação, progredindo para um nódulo que se úlcera progressivamente. Cerca de 88% dos casos dessa forma são registrados no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Peru e República Árabe da Síria. A LC é causada pelas espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* e *Leishmania tropica*. A LMC é caracterizada pela destruição dos lábios, palato e septo nasal, podendo levar à perfuração do septo nasal ou da laringe. 90% dos casos dessa forma são registrados na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. A LMC é causada por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, também conhecido como complexo *Leishmania braziliensis*. A LV resulta da disseminação sistêmica do parasita para a medula óssea e órgãos como o fígado e o baço. Indivíduos afetados por essa manifestação apresentam anorexia, perda de peso, tosse, palidez, sudorese noturna, organomegalia, linfadenopatia e febre. Se não for tratada, a LV é fatal em mais de 95% dos casos, geralmente dentro de dois anos devido a sepse, doença multissistêmica ou anemia grave. Mais de 89% de todos os casos são descritos no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão

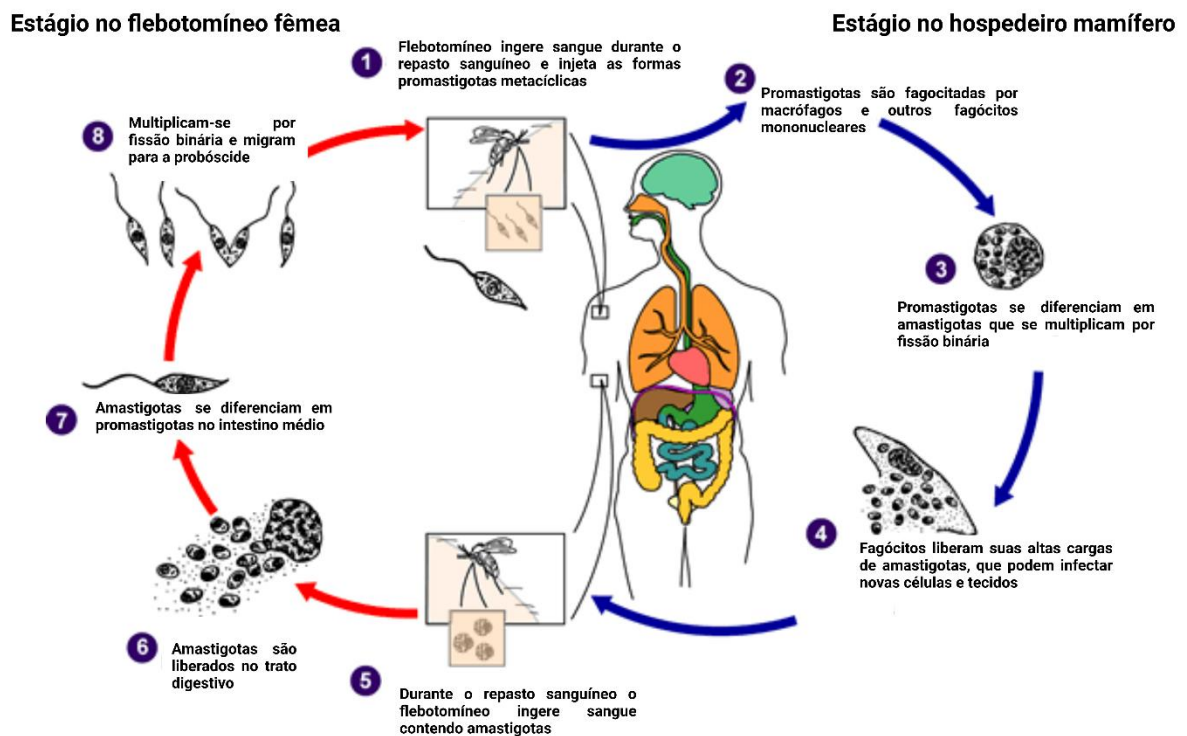
e Sudão do Sul. A LV é causada pelas espécies *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania donovani* (Gurel *et al.*, 2020; Kaushal *et al.*, 2023).

Essas manifestações clínicas estão associadas diretamente ao ciclo biológico de *Leishmania* no hospedeiro mamífero, relacionadas especialmente às formas amastigotas.

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Como um organismo heteroxênico, durante seu ciclo biológico a *Leishmania* parasita tanto o vetor flebotômíneo invertebrado quanto um hospedeiro mamífero (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: adaptado de CDC, 2024.

Durante o ciclo biológico, o parasita *Leishmania* apresenta duas formas celulares principais: a forma promastigota (procíclica, nectomona, leptomona e metacíclica) e a forma amastigota. A forma promastigota mede de 14 a 20 μm de comprimento e 1,5 a 4 μm de largura, possuindo uma aparência fusiforme ou em forma de pêra, com uma extremidade posterior mais fina. Apresenta um flagelo que emerge da porção anterior da célula, tendo um corpo celular flexível e alta mobilidade (Rey, 2008). As formas promastigotas procíclica, nectomona,

leptomona e metacíclica se desenvolvem no trato digestivo do vetor flebotomíneo. A forma procíclica é altamente replicativa e se multiplica por fissão binária no intestino médio do flebotomíneo, logo após a ingestão de fagócitos infectados, oriunda de amastigotas recentemente adquiridos no repasto sanguíneo (Sunter; Gull, 2017). A forma nectomona desenvolve-se posteriormente, é mais alongada e móvel, facilitando a migração para a porção anterior do vetor (Gossage *et al.* 2003). Leptomona é a forma intermediária para a metacíclica (Bates, 2007). A metaciclogênese resulta na forma metacíclica, infectante para o hospedeiro vertebrado mamífero (Handman; Bullen, 2002; Mann, 2021). Após o repasto sanguíneo, a forma metacíclica regurgitada é então fagocitada e se diferencia na forma amastigota intracelular. A forma amastigota se multiplica por divisão binária e, quando a carga parasitária se torna alta, a célula hospedeira se rompe liberando-as no ambiente extracelular. Logo, as amastigotas podem infectar novas células e sítios teciduais. Essa forma possui um comprimento médio de 2 a 6 μm e uma largura de 1,5 a 3 μm , com formato elíptico ou oval. Apresenta uma invaginação da membrana celular na região anterior denominada bolsa flagelar, onde encontra-se o flagelo. O ciclo se inicia quando durante o repasto sanguíneo, em um mamífero infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere as formas amastigotas (Rey, 2008; Kaye; Scott, 2011).

Como veremos a seguir, o processo de desenvolvimento das formas promastigotas e a migração pelo tubo digestivo do flebotomíneo são acompanhados por transformações morfológicas e moleculares imprescindíveis para o sucesso parasitário de *Leishmania*, culminando no desenvolvimento de formas metacíclicas altamente móveis, não divisórias e infectantes (Davies *et al.*, 1990)

2.3 METACICLOGÊNESE

A metaciclogênese está associada principalmente a mudanças na morfologia, expressão gênica e alterações estruturais de algumas moléculas, como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa (GP63) (Davies *et al.*, 1990; Chaves *et al.*, 2003). Essas mudanças resultam no desenvolvimento de formas promastigotas com um glicocálice denso e espesso, resistentes à lise mediada por complemento e altamente infectantes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bates; Tetley, 1993; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002; Ouakad *et al.*, 2011). A metaciclogênese pode ser avaliada por diferentes critérios, incluindo o tamanho do promastigota (análise morfométrica e citometria de fluxo), modificações de superfície (perda da ligação de lectinas ou anticorpos monoclonais, resistência ao sistema complemento) e infectividade para macrófagos humanos (Da Silva Jr *et al.*, 2015). Quanto às alterações morfológicas, as formas metacíclicas apresentam um corpo celular curto (8 μm) e estreito (1,5 μm), com um flagelo

duas vezes ou mais o comprimento do corpo celular. Essas alterações também variam de acordo com a espécie, por exemplo, em *L. major*, o flagelo aumenta até 2,4 vezes em comparação com 1,8 vezes em *L. donovani* (Bandyopadhyay *et al.*, 1991; Zakai *et al.*, 1998; Saraiva *et al.*, 2005).

Na interface entre as mudanças morfológicas e moleculares, demonstrou-se que as formas metacíclicas apresentam maior concentração de proteínas e menor teor de carboidratos em comparação às formas procíclicas. Esse perfil parece estar relacionado, nas formas metacíclicas, à maior expressão de proteínas estruturais — especialmente flagelares — além de proteases de superfície (Bandyopadhyay *et al.*, 1991). Curiosamente, uma avaliação proteômica usando espectrometria de massas revelou que as moléculas envolvidas na síntese de proteínas são menos abundantes nos promastigotas metacíclicos, enquanto moléculas envolvidas na motilidade, incluindo a proteína do bastão paraflagelar 1D, α -tubulina e β -tubulina, são mais abundantes. Além disso, enzimas mitocondriais, como a subunidade β da succinil-CoA sintetase e a subunidade IV do citocromo c oxidase, são diferencialmente expressas em ambas as fases do ciclo de vida. A regulação negativa das vias relacionadas às sínteses de algumas proteínas estruturais nas promastigotas metacíclicas apoia a ausência de divisão celular nesta fase, enquanto a regulação positiva das proteínas relacionadas à motilidade deve estar de acordo com o esperado para esse estágio (Mojtahedi *et al.*, 2008). Para corroborar as diferenças químicas entre os promastigotas das fases logarítmica e estacionária, outro estudo utilizou espectroscopia de ressonância magnética nuclear para determinar quais metabólitos são mais alterados entre as fases estacionária e logarítmica, revelando o ácido citracônico, ácido isopropílico, L-leucina, ornitina, ácido caprílico, ácido cáprico e ácido acético. Essas descobertas são significativas porque esses metabólitos e suas vias podem auxiliar na exploração dos mecanismos associados à metaciclogênese (Arjmand *et al.* 2016).

Quanto ao desenvolvimento das formas infectantes no vetor, sabe-se que a expressão de GP63 e LPG é maior durante e após à metaciclogênese. Curiosamente, por meio de análises imuno-histoquímicas utilizando um anticorpo monoclonal específico para GP63 e outros reconhecendo epítomos específicos de LPG em promastigotas procíclicas e metacíclicas, verificou-se uma clara expressão de ambas as moléculas aos 2 e 7 dias após o repasto sanguíneo, respectivamente. Também foi observado que o desenvolvimento da molécula LPG muda à medida que os parasitas migram pelo trato digestivo do flebotomíneo rumo a região anterior, além do depósito de grandes quantidades de LPG livre nas células epiteliais da parede intestinal (Davies *et al.*, 1990). O LPG quimicamente caracterizado por cromatografia e análise quantitativa de fragmentos gerados por fosfolipase C específica para fosfatidilinositol apresenta

duas diferenças estruturais entre as fases procíclica e metacíclica. Foi observado um aumento estrutural no glicoconjugado da forma metacíclica devido a um maior número de suas unidades de sacarídeo fosforiladas, juntamente com uma sutil mudança na composição dessas unidades. Todavia, a ancoragem lipídica do fosfatidilinositol é conservada durante o desenvolvimento (Sacks *et al.*, 1990). Evidentemente, a estrutura dessa molécula é modificada durante a diferenciação para a forma metacíclica. O LPG consiste em cadeias lineares de unidades de oligossacarídeos fosforilados repetitivos ancoradas à membrana por uma âncora glicolípídica de fosfatidilinositol em ambas as fases. No entanto, durante a metaciclogênese, há um aumento aproximado no número médio de unidades de oligossacarídeos fosforilados por molécula, de 14 para 30 (McConville *et al.*, 1992).

A proteína de membrana cinetoplastídea 11 (KMP-11) é uma molécula presente em todos os protozoários cinetoplastídeos. É encontrada associada a estruturas de membrana na superfície celular, bolsa flagelar e vesículas intracelulares, como veremos nas seções seguintes. Sua expressão é aumentada nas formas metacíclicas e amastigotas intracelulares, indicando estar relacionada a interações com o hospedeiro (Matos *et al.*, 2010). Proteínas como a pequena proteína hidrofílica associada ao retículo endoplasmático (SHERP) e a proteína hidrofílica acilada de superfície (HASP) também são positivamente reguladas durante a fase metacíclica (Muskus; Villa, 2002). As proteínas HASP são expressas apenas em parasitas infectantes e, juntamente com SHERP, são essenciais para a diferenciação do parasita no vetor flebotomíneo (Doehl *et al.*, 2017). No entanto, HASP é liberada da superfície dos parasitas metacíclicos para os macrófagos durante a fagocitose, mas sua expressão é mantida nos amastigotas intracelulares. Assim, essa molécula pode ser uma proteína de função dual, eliminada pela forma metacíclica infectante, mas retida internamente quando a *Leishmania* é fagocitada pelos macrófagos (Maclean *et al.*, 2012). Curiosamente, sabe-se que a exclusão dos genes HASP e SHERP em *L. major* interrompe a metaciclogênese no flebotomíneo, mas não em cultura *in vitro*. Mutantes deficientes usados para investigar o papel na metaciclogênese, transmissão do parasita e estabelecimento da infecção apresentaram interrupção da metaciclogênese *in vivo*, e da produção do gel secretório de promastigotas (PSG), além de menor acúmulo de parasitas no intestino médio torácico e não colonização da válvula estomodeal, resultando na ausência de transmissão do parasita para um novo hospedeiro mamífero (Doehl *et al.*, 2017).

Sabe-se que o transportador LABC2 tem um papel na exposição de fosfatidilserina (PS), virulência e resistência a antimoniais. Curiosamente, foi descoberto que a geração de parasitas mutantes nulos de *L. major* para os genes Δ LABC1-2 resulta em parasitas na fase

de crescimento estacionário que sofrem menos metaciclogênese e apresentam diferenças na composição de LPG na membrana plasmática (Manzano *et al.*, 2017). Também foi encontrado que a superexpressão do gene do transportador de ATPase de cálcio (*lmaa1*) em *L. amazonensis* leva a um aumento da infectividade em macrófagos *in vitro* e em camundongos *in vivo*. Além disso, os isolados cultivados apresentam maior sobrevivência durante a fase estacionária. Assim, acredita-se que a proteína *Lmaa1* possa desempenhar um papel essencial na metaciclogênese (Rodriguez *et al.*, 2002). Devido à importância dos processos de sinalização na proliferação e diferenciação, a via da adenilato ciclase da proteína quinase A (PKA) em *L. amazonensis* foi estudada para verificar sua correlação com a metaciclogênese. A atividade de PKA nas frações solúveis e nas frações ricas em membranas de promastigotas não infectantes e infectantes foi analisada e experimentos foram realizados na presença de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e um inibidor de PKA. Foi encontrado que a atividade de PKA é significativamente mais alta (cerca de duas vezes) nas SF de promastigotas com alta concentração de formas metacíclicas em comparação com promastigotas não infectantes, sugerindo uma associação dessa atividade com o processo de metaciclogênese (Genestra *et al.*, 2001). Curiosamente, a atividade da citrato sintase (CS), isocitrato desidrogenase específica para NADP (ICDH), succinato desidrogenase (SDH), L-malato desidrogenase (MDH) e malato desidrogenase (ME), que são as principais enzimas regulatórias na maioria dos sistemas energéticos, foi medida durante o crescimento e a metaciclogênese de duas linhagens de *L. infantum* oriundas de CL e VL. Ambas as linhagens apresentaram níveis mais altos de CS, ICDH e MDH e atividades mais baixas de SDH e ME em uma maior densidade de metacíclicas. No entanto, em VL, essas mudanças estavam paralelas a um aumento no consumo de glicose, enquanto em CL, essas mudanças coincidiam com a hiperprodução de NH₃. Portanto, infere-se que o metabolismo energético durante o crescimento e a metaciclogênese é afetado pelas enzimas reguladoras dos sistemas energéticos, que provavelmente devem responder a mudanças no meio devido aos níveis de glicose e aminoácidos (Louassini *et al.*, 1999).

As calpaínas são proteínas pertencentes à família multigenética das cisteíno peptidases dependentes de cálcio. Curiosamente, os ortólogos de calpaína estão diversificados no genoma dos tripanossomátidos, como por exemplo em *L. braziliensis*, onde foram identificados 34 genes semelhantes a calpaínas. Após avaliar a estrutura do domínio durante a metaciclogênese *in vitro*, a reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa revelou cinco genes com expressão aumentada na fase procíclica e um gene aumentado na fase metacíclica. Eventualmente, o inibidor de calpaína MDL28170 foi utilizado para estudos funcionais,

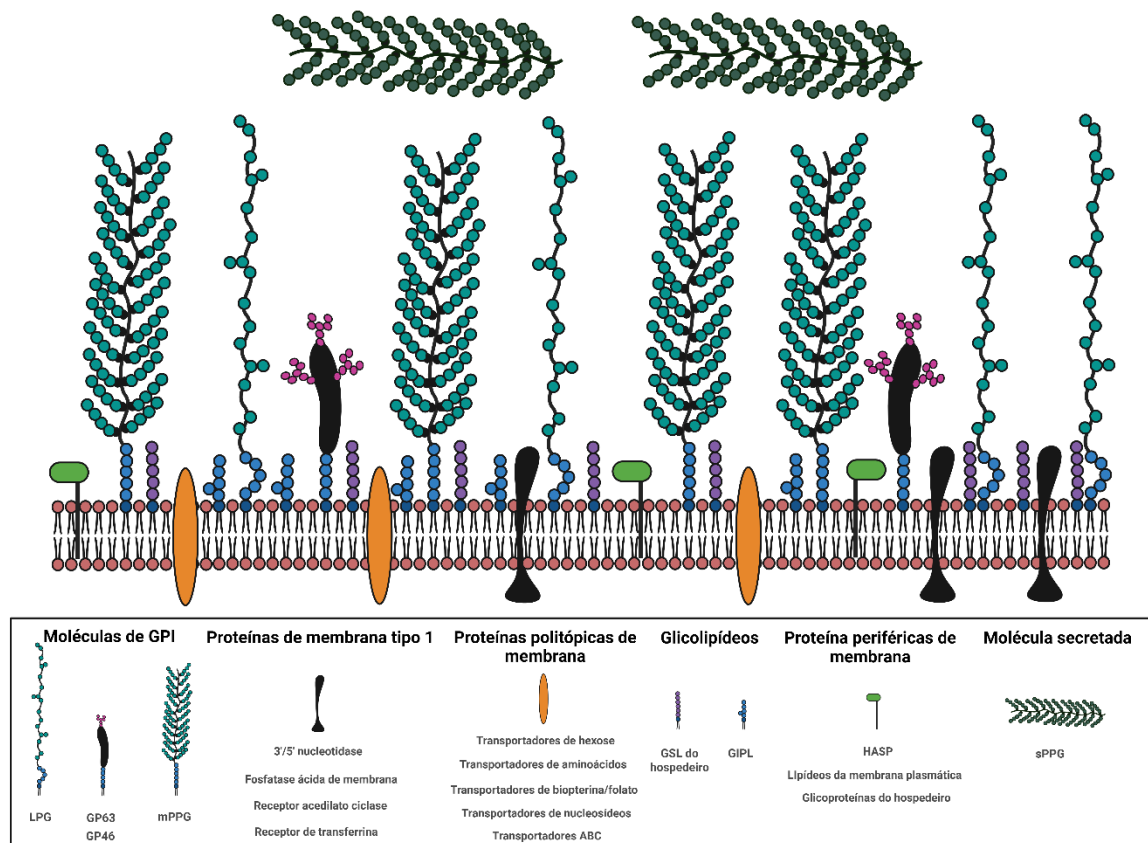
revelando aumento na expressão do fator de virulência GP63, indicando que variações na expressão dos ortólogos de calpaína podem influenciar a metaciclogênese (Ennes-Vidal *et al.*, 2019). A pteridina redutase 1 (PTR1) é uma enzima essencial para o metabolismo de pteridinas e folatos em *Leishmania* (Bello *et al.*, 1994). Curiosamente, foi encontrado que a degradação da PTR1 durante a fase de crescimento estacionário é mediada pelo proteassomo, o que resulta em níveis mais baixos de H4-biopterina, favorecendo a metaciclogênese e o desenvolvimento de formas altamente infectantes (Kumar *et al.*, 2007). Uma subunidade regulatória da proteína quinase dependente de cAMP (Ldpkar1) foi identificada em *L. donovani*, homóloga à subunidade regulatória da PKA de mamíferos. Embora as enzimas sintetizadoras e degradadoras de cAMP já tenham sido caracterizadas, nenhuma molécula efetora de cAMP havia sido identificada até então. Verificou-se que Ldpkar1 interage com as subunidades catalíticas da PKA e inibe sua atividade. Além disso, a superexpressão de Ldpkar1 acelera a metaciclogênese e a autofagia, enquanto o silenciamento dessa proteína retarda a indução da autofagia, revelando pela primeira vez uma molécula efetora funcional de cAMP em *Leishmania*, importante para eventos citológicos que afetam a metaciclogênese (Bhattacharya *et al.*, 2012). Interessantemente, foi identificado o desenvolvimento de um mecanismo de evasão imune à medida que os promastigotas de *Leishmania* amadurecem em formas infectantes. A interleucina-12 (IL-12) é um fator importante para a geração e proliferação de células Th1. Foi encontrado que os promastigotas metacíclicos de *L. major* são fracos indutores de IL-12 *in vitro*, reforçando que a capacidade desse patógeno de induzir IL-12 e outras citocinas é modulada pelo processo de metaciclogênese, especialmente considerando que os promastigotas procíclicos induzem IL-12, interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-10. Assim, ao induzir uma resposta fraca, os promastigotas metacíclicos favorecem a sobrevivência dos parasitas internalizados (Sartori *et al.*, 1997; Trinchieri, 2003).

Em resumo, a metaciclogênese é um processo imprescindível para o sucesso parasitário, o aumento do flagelo e a regulação positiva de proteínas associadas à motilidade garantem maior mobilidade às formas infectantes. Além disso, a alta expressão de moléculas de superfície auxilia na proteção contra a lise mediada pelo complemento e espécies reativas degradativas. Finalmente, a maior expressão de fatores de virulência de superfície promove a interação com receptores em células hospedeiras e a infecção (Bandyopadhyay *et al.*, 1991; Bates & Tetley, 1993; Silva *et al.*, 2002; Ouakad *et al.*, 2011; Sacks *et al.*, 1989).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE SUPERFÍCIE – DETERMINANTES PARA A INTERAÇÃO *Leishmania*-CÉLULA HOSPEDEIRA

Muitas moléculas de superfície (Figura 2) são fatores de virulência essenciais para *Leishmania* e estão associadas à interação parasita-hospedeiro. Como veremos, essas moléculas atuam na ligação à superfície das células (Brittingham *et al.*, 1999), na resistência ao sistema complemento (Russel, 1987; Spath *et al.*, 2003), na resistência ao óxido nítrico (NO) (Quintela-Carvalho *et al.*, 2022) e na modulação das respostas Th1 e Th2 (Estrada-Figueroa *et al.*, 2018). Essas moléculas de superfície podem interagir com receptores importantes, como os receptores do tipo *Toll* (TLRs), TLR-2 e TLR-4 (Soto-Olguín *et al.*, 2023; Srivastava *et al.*, 2013), receptores do complemento (CRs), como CR1 e CR3 (Paixão *et al.*, 2021), receptores de fibronectina (Rizvi *et al.*, 1988), entre outros. Esses fatores de superfície são essenciais em diferentes estágios do desenvolvimento do parasita, desempenhando papel importante desde a primeira interação do flagelo com a célula hospedeira (Zenian *et al.*, 1979), subsequente evasão e infecção (Ueno; Wilson, 2012; Silveira *et al.*, 2022) e posterior diferenciação e manutenção das formas amastigotas (Sen *et al.*, 2022).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da membrana plasmática de *Leishmania* spp.



Fonte: criado pelo autor em <https://BioRender.com>, adaptado de Naderer *et al.*, 2004 e Kaushal *et al.*, 2023.

As seções a seguir apresentam e discutem o papel dos principais fatores de virulência de superfície, componentes que influenciam a patogênese e o curso da infecção no hospedeiro vertebrado mamífero (Elmahallawy; Alkhaldi, 2021; Kaushal *et al.*, 2023).

2.4.1 Componentes do glicocálice de superfície

2.4.1.1 Lipofosfoglicano (LPG)

O LPG é o principal glicoconjugado de superfície celular em *Leishmania*, encontrado abundantemente nas formas metacíclicas. Esta molécula heterogênea tem um peso molecular de 9 kDa e é composta por unidades fosforiladas de di-, tri- e tetrasacarídeos, contendo principalmente arabinose, manose e galactose, que estão ligadas à superfície celular por âncoras de 1-O-alkil-2-lyso-fosfatidilinositol. Estruturalmente, de forma geral, existem 16 unidades de açúcar dispostas linearmente, conectadas por ligações α -glicosídicas no LPG (Turco, 1988). Durante o desenvolvimento de *Leishmania*, ocorrem modificações estruturais na expressão dessa molécula. Como descrito anteriormente, na forma metacíclica o LPG apresenta uma estrutura mais complexa, com resíduos de arabinose ligados à galactose, além de mudanças no número de repetições de fosfoglicanos (Sacks, 1989; Spath & Beverley, 2001).

O LPG confere aos promastigotas metacíclicos de *L. donovani* a capacidade de inibir a biogênese do fagolisossomo. Essa inibição está relacionada ao acúmulo de F-actina periférica ao redor do fagossomo formando uma barreira física que impede que os fagossomos interajam com os endossomos iniciais e lisossomos tardios. Assim, os promastigotas capturam o citoesqueleto da célula hospedeira no início do processo de infecção e o utilizam na formação do vacúolo parasitóforo (Lodge; Descoteaux, 2005). O recrutamento fagossomal da proteína de membrana associada ao lisossomo 1 (LAMP-1) ocorre durante o desenvolvimento do fagossomo. Curiosamente, verificou-se que *L. braziliensis* pode prejudicar o recrutamento de LAMP-1 associado a expressão de LPG (Vieira *et al.*, 2019). Parasitas mutantes que não expressam LPG na superfície celular sobrevivem por períodos mais curtos em compartimentos fagocíticos em comparação com os parasitas que a expressam constitutivamente. Na ausência dessa molécula os promastigotas fagocitados são mais suscetíveis ao NO, sugerindo um papel protetor do LPG contra espécies oxidativas intracelulares e o ambiente lítico do fagolisossomo (Quintela-Carvalho *et al.*, 2022).

Verificou-se que as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes curados de Kala-Azar proliferam e produzem IFN- γ *in vitro* em resposta ao LPG isolado de *L. major* (Kemp *et al.*, 1991). Os glicolipídios da superfície celular são importantes nas interações parasita-fagócito, estimulando respostas imunes mediadas por células T. Ensaios de imunização com fragmentos de LPG mostraram que a estimulação de células T está associada à estrutura central dessa molécula, e não à estrutura repetitiva dos lipídios ou fosfoglicanos. Logo, determinou-se que a estimulação dos linfócitos está associada ao componente proteico do LPG, e não à porção glicana (Jardim *et al.*, 1991). Um dos alvos do LPG são os TLRs, que são proteínas transmembrana que funcionam como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), responsáveis por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Eles são componentes-chave na ativação da imunidade inata e na aquisição de imunidade adaptativa através das interações PRR-PAMP (Kumar *et al.* 2011). Algumas proteínas estão relacionadas aos TLRs, como o locus de progressão tumoral 2 (TPL2), uma quinase importante na transdução de sinais inflamatórios. Verificou-se que o parasita *Leishmania* controla a sinalização de TLR-2 via TPL2 quando estimulado pela interação LPG-TLR2. Um exemplo notável é a inoculação de *L. mexicana* ou LPG puro na derme de camundongos BALB/c, o que leva à proliferação de células T, entre outros fatores, estimulada pela interação LPG-TLR2 (Gosh *et al.*, 2023).

Verificou-se que o LPG ativa outro receptor, o TLR-4 (Nogueira *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2019). Promastigotas interagem estimulando o TLR-4 para fagocitar o parasita. Para confirmar o papel do TLR-4 na internalização, em um recente estudo o silenciamento desse receptor em macrófagos reduziu a taxa de infecção, destacando o papel crucial da interação LPG-TLR para a internalização (Soto-Olguín *et al.*, 2023). O LPG de *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*, assim como os parasitas inteiros, são capazes de induzir a produção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias como IL-32, IL-1 β e IL-6 em PBMCs humanas, e essa regulação depende dos receptores TLR-4 e NOD2 (Silveira *et al.*, 2022). Além dos macrófagos, o LPG é um componente decisivo para a interação com neutrófilos, já que parasitas *knockout* não induzem a autofagia das formas infectantes nessas células (Pitale *et al.*, 2019). Sabe-se que os neutrófilos liberam as chamadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para capturar os promastigotas. Foi recentemente descoberto que vesículas extracelulares (EVs) de *L. amazonensis* contendo LPG induzem a formação de NETs, em uma dinâmica dependente de TLRs, já que a adição de inibidores de TLR-2 e TLR-4 reduz significativamente a indução de NETs pelas EVs (Pereira-Silva *et al.*, 2024). Interessantemente, verificou-se que o LPG de

L. mexicana ativa as células T *natural killer* (NKT) pela via indireta, inicialmente com a estimulação do TLR-2 nas células dendríticas (DCs), o que leva ao aumento da expressão de TLR-2, do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) e do *cluster* de diferenciação 86 (CD86), bem como a produção de IL-12, o que leva à síntese de IFN- γ pelas células NKT durante a fase inata da infecção (Zamora-Chimal *et al.*, 2017). Tanto o LPG solúvel quanto o LPG de membrana podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em PBMCs, e curiosamente, a produção de ROS é bloqueada usando anticorpos anti-TLR-2, mas não com anti-TLR-4 (Kavoosi *et al.*, 2009). Estruturalmente, os TLRs possuem repetições ricas em leucina (LRRs) e mutações impedem a interação TLR-4-LPG, indicando que a interação LPG-*Toll* pode ser específica e restrita aos domínios LRRs. Diante disso, sugere-se que interromper a associação LRRs-LPG pode ser um fator importante na redução da internalização das formas infecciosas, e identificar os domínios no LPG responsáveis por essa interação pode contribuir para estratégias futuras (Mazumder *et al.*, 2023).

Os receptores CR1 e CR3 também são alvos do LPG (Paixão *et al.*, 2021). Verificou-se que CR3 se liga ao LPG de *Leishmania mexicana* (Van Strijp *et al.*, 1993). Apoiando essas descobertas, verificou-se que um mutante de *L. major* que não possui LPG na sua superfície e, portanto, apresenta virulência atenuada, é altamente suscetível ao sistema de complemento humano e incapaz de inibir a fusão fagossomal, tornando-se vulnerável ao estresse oxidativo. Em contraste, *L. major* que expressa LPG liga-se ao C3b do complemento, resiste ao pH baixo e às proteases do fagossomo e persiste no ambiente intracelular, ao inibir as vias de sinalização do hospedeiro (Spath *et al.*, 2003).

2.4.1.2 Proteofosfoglicano (PPG)

O proteofosfoglicano (PPG) pode ser encontrado em duas formas: a forma secretada, solúvel em água, e a forma estrutural, ancorada à membrana celular por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ilg, 2000). Esse fosfoglicano está presente na superfície tanto de amastigotas quanto de promastigotas, na bolsa flagelar, em endossomos e no lisossomo (Foth *et al.*, 2002). O PPG é secretado em grandes quantidades pelas amastigotas através da bolsa flagelar para dentro dos vacúolos parasitóforos das células hospedeiras (Ilg *et al.*, 1995). Diferentemente do LPG, essa molécula contém uma estrutura proteica composta por diferentes resíduos de aminoácidos. Em *L. major*, possui uma estrutura rica em resíduos de serina, alanina e prolina, e os resíduos de serina são glicosilados por meio de ligações fosfoéster. Os açúcares presentes nessa molécula são semelhantes aos encontrados no LPG. Além disso, a estrutura do

PPG é muito semelhante às mucinas encontradas em células de mamíferos (Ilg *et al.*, 1996; Kavooosi *et al.*, 2008). Análises desse fosfoglicano recuperado a partir de processos de extração e purificação demonstram que sua composição é de 28% de proteína, 5% de fosfato e 67% de carboidrato. Adicionalmente, descobriu-se que o PPG, por seu alto peso molecular e elevado teor de glicosilação, é resistente à degradação por proteases (Descoteaux; Turco, 1999; Kavooosi *et al.*, 2008).

Sabe-se que as formas metacíclicas produzem um gel facilitador, o PSG, que é composto principalmente de mucina filamentosa semelhante ao proteofosfoglicano (fPPG). Essa matriz gelatinosa de filamentos densos ao redor do parasita aumenta a capacidade de transmissão das formas metacíclicas, bloqueando o lúmen do intestino médio anterior e a válvula estomodeal do vetor invertebrado. Como resultado, ocorre um aumento na regurgitação das formas infecciosas e, conseqüentemente, uma maior taxa de infecção. Essa é uma estratégia importante empregada por esse protozoário na transmissão das formas infectantes (Stierhof *et al.*, 1999; Rogers, 2012). O PPG contribui para a interação *Leishmania*-célula hospedeira e para a modulação da biologia dos macrófagos durante a infecção (Piani *et al.*, 1999). Essa molécula causa a vacuolização de macrófagos peritoneais *in vitro*. A secreção desse glicoconjugado por parasitas intracelulares (aPPG) contribui para a expansão dos compartimentos fagolisossomais nas células infectadas (Peters *et al.*, 1997). Macrófagos ativados produzem IL-12 que estimula a diferenciação e proliferação de células Th1, o que leva à produção de IFN- γ que ativa os macrófagos para eliminar os parasitas com a síntese de ROS e NO. Interessantemente, verificou-se que o PPG possui efeitos repressivos sobre a produção de IL-12 e IFN- γ , pois em concentrações mais elevadas suprime esses fatores. Logo, a redução na produção de ROS e NO contribui para a sobrevivência intracelular (Kavooosi *et al.*, 2008; Ilg *et al.*, 1996).

O aPPG secretado pelos amastigotas interage com o sistema complemento para ativá-lo por meio da via da lectina, contribuindo para o desenvolvimento da infecção pelo parasita. A ativação do complemento inclui a geração dos fatores C3a, C4a e C5a, resultando na atração de monócitos infectáveis. Verificou-se que hospedeiros infectados deficientes nesses fatores apresentam desenvolvimento retardado ou ausente de lesões durante as manifestações da leishmaniose (Peters *et al.*, 1997). Curiosamente, camundongos cronicamente infectados com *L. mexicana* geralmente não produzem anticorpos ou células T específicas para o aPPG. Os títulos de anticorpos são muito baixos em camundongos vacinados com essa molécula, e células T CD4⁺ são indetectáveis. Sabe-se que o aPPG se comporta imunologicamente como

um carboidrato devido à falta de indução de células T CD4⁺ específicas. Em contraste, peptídeos recombinantes de aPPG estimulam respostas celulares, e altos títulos de anticorpos específicos são encontrados nos soros de camundongos vacinados. Além disso, descobriu-se que o aPPG nativo é altamente resistente a proteases e aparentemente não pode ser degradado por macrófagos. Finalmente, verificou-se que as células T CD4⁺ não são induzidas porque a molécula resiste ao processamento antigênico devido à sua extensa e complexa modificação de carboidratos. As cadeias glicanas complexas do aPPG provavelmente evoluíram para evitar a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro (Aebischer *et al.*, 1999). Por outro lado, o desenvolvimento de uma vacina de DNA usando o domínio N-terminal do PPG de *L. donovani* demonstrou eficácia aumentando os níveis de NO, IFN- γ , TNF- α e IL-12, fatores essenciais para o desenvolvimento de uma resposta Th1, além de reduzir os níveis do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), IL-4 e IL-10, que são determinantes para a ativação da resposta Th2. Isso indica que, dependendo da região antigênica utilizada para a produção da vacina, é possível obter uma resposta favorável para a eliminação das formas intracelulares (Samant *et al.*, 2009).

2.4.1.3 Glicofosfatidilinositol (GIPL)

Assim como muitas das macromoléculas de superfície, incluindo as principais glicoproteínas e o complexo LPG, o GIPL está ligado à membrana plasmática por ancoragens de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além disso, essa molécula também pode ser encontrada livre na membrana, não ligada a glicoproteínas ou fosfoglicanos (McConville *et al.*, 1993; McConville; Bacic, 1990). A composição e estrutura do GIPL pode variar dependendo da espécie. Em *L. tropica* a cadeia termina em α -manose, o que é estruturalmente relacionado às ancoragens de GPI tanto das proteínas de superfície quanto do LPG, enquanto em *L. major* termina em α -galactose, estando relacionado apenas a ancoragens de LPG (Schneider *et al.*, 1994). Com relação à complexidade dessa molécula, em *L. major* a análise de glicolipídios nativos e desfosforilados revelou que as porções glicosídicas consistem em 4-10 resíduos de açúcar, todos contendo manose, galactose e glucosamina não acetilada. Além disso, alguns GIPLs apresentaram glicose, resíduos monofosforilados de hexose, além da presença de uma porção de fosfolipídio inositol indicada por um único resíduo de monofosfato de mio-inositol (McConville; Bacic, 1990). O GIPL é expresso em níveis quase constantes nas formas promastigotas e amastigotas, no entanto, o perfil de GIPL em amastigotas é enriquecido com cadeias glicanas mais curtas e uma porção lipídica liso-álquil-Pi em vez de uma porção alquilacil-Pi (Schneider *et al.*, 1993).

Quanto a sua função, o glicocálix fornecido pelo GIPL pode desempenhar um papel crucial na cobertura e proteção das proteínas da membrana plasmática do parasita (transportadores, glicoproteínas, enzimas etc.), que são importantes para a manutenção e diversos processos celulares (Schneider *et al.*, 1993). Além disso, o glicocálix formado pelo GIPL em amastigotas protege o parasita internalizado contra as hidrolases lisossômicas e pode atuar como um ligante para a interação com a célula hospedeira, como descrito anteriormente (Winter *et al.*, 1994). Como documentado, em camundongos resistentes uma resposta Th1 se desenvolve após infecção com *L. major*, desencadeando a produção de IFN- γ que ativa os macrófagos para sintetizar NO. No entanto, em cepas suscetíveis o GIPL estimula a IL-4 inibindo a síntese de NO nos macrófagos, favorecendo uma resposta Th2 e a sobrevivência intracelular. A maior parte dessa atividade inibitória do GIPL foi determinada para a sua porção de alquilacilglicerol (Proudfoot *et al.*, 1995). Verificou-se que o GIPL de *L. infantum* e *L. braziliensis* induz a produção de TNF- α e NO em camundongos C57BL/6, principalmente via TLR-4 (Assis *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que a ligação de anticorpos anti-GIPL IgG durante a liberação das formas amastigotas induz a expressão de IL-10 e suprime a produção de IL-12. Isso reduz a expressão de IFN- γ nas células T e, conseqüentemente a produção de NO, contribuindo para o sucesso das formas intracelulares (Buxbaum *et al.*, 2013).

2.4.1.4 Proteína de membrana cinetoplastídica 11 (KMP-11)

A KMP-11 é uma proteína de superfície abundante de 11 kDa, amplamente distribuída e conservada entre os tripanossomatídeos (Stebeck *et al.*, 1995). Essa proteína está presente tanto nas formas amastigota quanto promastigota e está associada a estruturas de membrana, particularmente à superfície celular, bolsa flagelar e a vesículas intracelulares. Além disso, é mais expressa em amastigotas, no entanto, sua expressão é aumentada durante a metaciclogênese. Especificamente, em promastigotas, essa proteína apresenta um padrão de distribuição definido no flagelo e na bolsa flagelar (Berberich *et al.*, 1998). Além da interação com o hospedeiro, a presença em amastigotas também está associada à capacidade imunoprotetora dessa molécula, como demonstrado anteriormente pelo desenvolvimento de respostas imunes humorais (Matos *et al.*, 2010).

A imunogenicidade desta proteína foi avaliada *in vivo* em cães experimentalmente infectados, estimulando a proliferação de PBMCs. Neste estudo, KMP-11 recombinante induziu a regulação positiva de IFN- γ *in vivo* e desencadeou uma resposta imune do tipo Th1 (Carrillo *et al.*, 2008). Todavia, descobriu-se que a adição dessa molécula *in vitro* durante a

infecção por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, leva ao aumento da secreção de IL-10, maior atividade da arginase e redução na síntese de NO, aumentando, conseqüentemente, a carga de amastigotas intracelulares (Lacerda *et al.*, 2012; De Mendonça *et al.*, 2015). Em um estudo recente, uma vacina de proteína quimérica recombinante (MEV-Fc) multiepitopos foi desenvolvida com base na KMP-11 e em outros fatores de virulência importantes, como a cisteína protease. Curiosamente, entre os resultados obtidos, a docagem molecular indicou interações com os receptores TLR-2 e TLR-4. Além disso, análises de simulação imunológica mostraram aumentos significativos nos níveis de anticorpos IgM e IgG após três vacinações, bem como a ativação de células B, células T auxiliares e linfócitos T citotóxicos (Fadaie *et al.*, 2024). Finalmente, verificou-se que a maioria dos soros de pacientes com leishmaniose visceral, mucocutânea e cutânea contém anticorpos IgG contra KMP-11, destacando o potencial dessa proteína como um imunógeno. No entanto, essa molécula possui reatividade cruzada pois está presente em infecções causadas por outros tripanossomatídeos, e nesse caso não deve ser utilizada para diagnóstico sorológico, especialmente em áreas onde a leishmaniose e as tripanossomíases são notificadas (Trujillo *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2010).

2.4.2 Proteases ancoradas a GPI

2.4.2.1 Glicoproteína de 63 kDa

A glicoproteína GP63 é a principal protease de superfície encontrada em *Leishmania*, altamente expressa na superfície de formas metacíclicas (Yao *et al.*, 2005). Essa molécula contém resíduos de cisteína conservados e ligantes ao zinco entre as diferentes espécies. No entanto, existem algumas variações, como nas regiões de carboidratos e na ligação da âncora GPI à membrana (Razzazan *et al.*, 2008). Também conhecida como principal protease de superfície (MSP) ou metalozincoprotease, a expressão dessa molécula aumenta 14 vezes *in vitro* da fase logarítmica para a fase estacionária. Além disso, é expressa em 10 isoformas diferentes durante o desenvolvimento das promastigotas (Yao *et al.*, 2005). Embora seja encontrada em abundância, existem diferenças entre a GP63 expressa nas duas formas celulares. Em promastigotas, essa molécula é N-glicosilada, com dois terços distribuídos na superfície celular. Em contraste, nos amastigotas, não é N-glicosilada e é encontrada no bolso flagelar, solúvel no citosol e em vesículas ou organelas. Conseqüentemente, amastigotas e promastigotas expressam isoformas variadas dessa protease, que além de diferirem bioquimicamente, estão distribuídas em diferentes estruturas do parasita (Hsiao *et al.*, 2008).

A avaliação das proteínas de superfície em amastigotas indica que a GP63 é uma das proteínas mais abundantes na superfície dessa forma (Medina-Acosta *et al.*, 1989). Como veremos, essa protease desempenha diversas atividades associadas à patogênese, incluindo interação com a matriz extracelular, evasão a lise mediada pelo complemento, facilitação da fagocitose de promastigotas e sobrevivência das formas intracelulares (Sádlová *et al.*, 2006; Yao, 2010; Chan *et al.*, 2021).

Além disso, parasitas que expressam naturalmente GP63 são rapidamente fagocitados por macrófagos, enquanto parasitas *knockout* são internalizados mais lentamente (Brittingham *et al.*, 1999). A fibronectina é uma grande glicoproteína e um dos constituintes da matriz extracelular (Rizvi *et al.*, 1988). Verificou-se que a GP63 interage com receptores de fibronectina especialmente na presença do complemento. A *Leishmania* exibe adesão moderada a macrófagos humanos e a células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com receptores de fibronectina alfa4/beta1. Todavia, a adesão é mais pronunciada na presença de componentes do complemento, sugerindo que esses receptores podem cooperar nesse processo. Descobriu-se que a rápida internalização dos parasitas que expressam essa protease depende das integrinas beta1, pois o pré-tratamento dos macrófagos com anticorpos monoclonais contra essa integrina reduz a internalização (Brittingham *et al.*, 1999). Curiosamente, promastigotas de *L. major* deficientes em GP63 se desenvolvem normalmente no vetor flebotomíneo, mas, no hospedeiro vertebrado, são suscetíveis ao complemento e apresentam um desenvolvimento retardado de lesões *in vivo* em camundongos BALB/c (Joshi *et al.*, 2002). Ainda sobre sua relação com o complemento, observou-se que essa protease se liga ao componente C3 e, conseqüentemente, a proteólise dos componentes C3b e C3bi impede a eliminação do parasita pela lise mediada pelo sistema complemento (Russel, 1987). Alguns estudos documentam que mutantes deficientes são mais suscetíveis à opsonização pelo sistema complemento em comparação com promastigotas do tipo selvagem, justamente porque não possuem ou apresentam expressão reduzida dessa molécula de superfície, o que favorece a ação do sistema complemento (Joshi *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2021). Foi descoberto que o receptor CR3 se liga a uma região contendo Arg-Gly-Asp da GP63 (Russel *et al.*, 1988). Resumidamente, promastigotas que expressam GP63 fixam componentes do complemento e se ligam aos receptores desse sistema, permitindo que o parasita explore a capacidade opsonica para aderência e evite sua atividade lítica (Brittingham *et al.*, 1995).

Exossomos derivados de promastigotas metacíclicos exibem níveis mais altos de GP63 em comparação com exossomos de promastigotas da fase logarítmica, o que pode estar

associado à patogênese (Marshall *et al.*, 2018). A GP63 desempenha um papel crucial na modulação de proteínas tirosina fosfatase (PTPs) e fatores de transcrição (FTs), sendo um componente importante na atenuação da resposta imune inata durante a infecção. Essa protease regula negativamente a síntese da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), favorecendo o estabelecimento e a manutenção das formas intracelulares (Gomez *et al.*, 2009; Gomez & Oliver, 2010; Hassani *et al.*, 2014). Um dos mecanismos para a regulação da iNOS é através da clivagem e ativação de PTPs do hospedeiro que, quando ativados, podem desfosforilar quinases importantes, como a JAK2 e a IRAK-1, que, de outra forma, poderiam produzir moléculas leishmanicidas (Hassani *et al.*, 2011). Além disso, a ativação do inflamassoma da família dos receptores do tipo NOD-like, NLRP3, é modulada por exossomos contendo GP63, que inibem a produção de IL-1 β e reduzem a geração de ROS (Shio *et al.*, 2015).

O desenvolvimento do fagossomo desempenha um papel crucial na patogênese da *Leishmania*. A proteína de membrana associada a vesículas 8 (VAMP8), que regula a montagem do fagossomo, é negativamente modulada por essa protease. A inativação da VAMP8 impede a montagem do complexo NADPH oxidase, alterando o pH e as propriedades degradativas do fagossomo. Além disso, isso inibe a apresentação de antígenos exógenos e resulta na redução da ativação de células T (Matheoud *et al.*, 2013; Matte *et al.*, 2016). Recentemente, descobriu-se que a GP63 cliva várias outras proteínas celulares, como a fosfatase-1 contendo o domínio de homologia da região 2 de Src (SHP-1), a Sinaptotagmina XI, a Syntaxina-5, entre outras, que estão envolvidas em processos como fusão de vesículas e também na formação do fagossomo (Guay-Vincent *et al.*, 2022). Além disso, a GP63 de *L. donovani* pode clivar proteínas de ligação ao poli(rC) (PCBPs), como PCBP1 e PCBP2, que atuam como chaperonas para o transporte de ferro até a ferritina. A clivagem dessas PCBPs inibe a carga de ferro na ferritina, trazendo maior disponibilidade de ferro para o desenvolvimento das formas intracelulares (Sen *et al.*, 2022).

Verificou-se que a GP63 presente em promastigotas e amastigotas intracelulares cliva o ligante 10 da quimiocina do motivo C-X-C (CXCL10) e seus homólogos que se ligam ao receptor de quimiocina C-X-C 3 (CXCR3). A CXCL10 clivada é incapaz de sinalizar através do CXCR3, prejudicando a quimiotaxia das células T (Antonia *et al.*, 2019). Além disso, observou-se que a GP63 de *Leishmania* manipula a resposta do hospedeiro a seu favor por meio da prostaglandina E2 (PGE2), um modulador da resposta imune que promove a produção de citocinas Th2 (Estrada-Figueroa *et al.*, 2018). Recentemente, uma vacina de baculovírus expressando GP63 induziu maior produção de anticorpos no soro, além de uma resposta mais

intensa das células B esplênicas, células B do centro germinativo e células T CD4⁺ e CD8⁺ culminando no desenvolvimento de memória imunológica e eliminação de formas intracelulares de *L. donovani* (Yoon *et al.*, 2024).

2.4.2.2 Glicoproteína de 46 kDa (GP46)

A GP46 é uma glicoproteína de membrana de 46 kDa, também conhecida como antígeno 2 de superfície promastigota (PSA2) (McMahon-Pratt *et al.*, 1992; Handman *et al.*, 1995). Essa protease é aproximadamente 30 vezes mais abundante na forma metacíclica em comparação com a procíclica (Rivas *et al.*, 1991; Beetham *et al.*, 1997). Esta molécula possui propriedades bioquímicas associadas aos LRRs, formados por 24-26 resíduos na região amino-terminal, uma característica importante para interações proteína-proteína. Além disso, possui resíduos de triptofano e serina próximos à região carboxi-terminal, capazes de modificações pós-traducionais (Lincoln *et al.*, 2004).

Verificou-se que as regiões LRRs da GP46 se ligam a macrófagos via CR3. Esse receptor parece ser um dos principais receptores nas células hospedeiras que interagem com *Leishmania* e, curiosamente, acredita-se que a maior resistência das formas metacíclicas ao sistema complemento, entre outros fatores, esteja associada também à maior expressão da GP46 (Kedzierski *et al.*, 2004; Lincoln *et al.*, 2004). Quanto ao potencial imunogênico dessa molécula, foi demonstrado que a imunização de camundongos com este antígeno protege contra a infecção por *L. amazonensis* (Lohman *et al.*, 1990; McMahon-Pratt *et al.*, 1993). Curiosamente, uma vacina multi-epítipo contendo fragmentos epítópicos da GP46, que são indutores de IFN- γ , foi desenvolvida e mostrou interação estável com o receptor TLR-4 (Basmenj *et al.*, 2023). Posteriormente, uma vacina foi projetada a partir de proteínas imunodominantes, incluindo a GP46 de *L. major*, para estimular linfócitos T auxiliares e citotóxicos. Neste estudo, previsões das estruturas secundária e terciária foram feitas e análises posteriores confirmaram que a construção da vacina também poderia interagir com o receptor TLR-4. Simulações imunológicas demonstraram estimulação de células T, especificamente um aumento no IFN- γ . Esses resultados *in silico* sugerem que a GP46 ou sua associação com outros antígenos pode gerar uma resposta antigênica em humanos (Dehghani *et al.*, 2024).

Conforme previamente abordado, durante o desenvolvimento do parasita ocorre a expressão coordenada de moléculas de superfície fundamentais para o estabelecimento da infecção, como as mencionadas anteriormente, LPG, PPG, GP63, GP46 e GIPL. Nesse contexto, a caracterização desses fatores torna-se uma etapa crucial para a definição de

estratégias terapêuticas eficazes, seja para o desenvolvimento de novas drogas ou vacinas (Basmenj *et al.*, 2023; Fadaie *et al.*, 2024).

2.3 PEPTÍDEOS SELECIONADOS POR *PHAGE DISPLAY* EM PROTOZOÁRIOS E *Leishmania* spp.

Nas últimas décadas, a técnica de *phage display* tem se mostrado uma ferramenta valiosa para expressar peptídeos e anticorpos na busca por novos alvos de superfície em patógenos. Essa técnica envolve a inserção de um gene em bacteriófagos que codifica a expressão de proteínas, peptídeos ou anticorpos de interesse na superfície de fagos recombinantes. Essas moléculas expressas podem, então, ser utilizadas como "iscas" para buscar interações proteína-proteína, proteína-peptídeo ou proteína-DNA, por exemplo. Posteriormente, em um processo conhecido como *biopanning* as interações podem ser amplificadas por meio de sucessivas rodadas de seleção, o que potencializa a quantidade de material selecionado pela interação. O material selecionado pode ser eluído, sequenciado e identificado (Jaroszewicz *et al.*, 2022; Ledsgaard *et al.*, 2022).

Diversos estudos demonstram o potencial de peptídeos selecionados por *phage display* na identificação de ligantes de superfície em protozoários intracelulares, como *Trypanosoma cruzi* (Sáenz-Garcia *et al.*, 2020; De Paula *et al.*, 2022) ou *Plasmodium falciparum* (Lauterbach *et al.*, 2003; Cha *et al.*, 2016). Após a identificação desses ligantes por *phage display*, os mesmos podem ser utilizados como antígenos vacinais (Khan *et al.*, 2024; Knudsen *et al.*, 2022; Cha *et al.*, 2018) ou como alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos (Pawar *et al.*, 2019; Olivier; Hassani, 2010; Olivier *et al.* 2012; Chawla; MADHUBALA, 2010), essa abordagem tem sido especialmente promissora em *Leishmania* spp., com destaque para o peptídeo Li1, identificado em um estudo anterior com *L. infantum* (Verga *et al.*, 2024).

Frente a atual emergência das DTNs, o nosso Laboratório “Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos” têm trabalhado na busca de novos alvos terapêuticos, novas drogas e vacinas frente às leishmanioses. Em uma colaboração realizada em parceria com os professores Dr. Marcelo Jacobs-Lorena e Dr. Sung-Jae Cha da *Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University* foram selecionados peptídeos que interagem com a superfície celular de *L. amazonensis* e *L. infantum*. A pesquisa realizada pela Dra. Juliane Verga selecionou peptídeos cíclicos, compostos por 12 resíduos de aminoácidos, por *biopanning* utilizando a técnica de *phage display*. Em seguida, essas moléculas foram sintetizadas quimicamente e um desses peptídeos, denominado Li1, demonstrou resultados

promissores *in vitro* ao inibir a internalização de formas metacíclicas em macrófagos. Li1 também foi eficaz *in vivo* em modelo de leishmaniose visceral, reduzindo a carga parasitária de *L. infantum* em 84,7% para o baço e 84% para o fígado (Verga *et al.*, 2024). Embora não tenha realizado a identificação do ligante em *Leishmania*, o estudo de Verga *et al.*, 2024 contribui para o preenchimento da lacuna de conhecimento sobre moléculas de superfície em *L. infantum* importantes para a internalização de formas infectantes, especialmente ao indicar que peptídeos cíclicos oriundos de *phage display* podem interagir com sítios de superfície imprescindíveis para a infecção por essa espécie. Os dados gerados por Verga *et al.*, 2024 são muito valiosos, principalmente ao considerar que *L. infantum* é o agente etiológico da leishmaniose visceral e que estratégias inovadoras, como o *phage display*, podem ser empregadas para a identificação de possíveis alvos terapêuticos frente essa importante DTN.

O uso de *L. amazonensis* como modelo experimental nesta dissertação é importante, sobretudo por seu caráter complementar aos achados de Verga *et al.*, (2024) com *L. infantum*. Enquanto aquele estudo demonstrou a eficácia do peptídeo Li1 no contexto da leishmaniose visceral, esta dissertação visa expandir o escopo da investigação ao avaliar o peptídeo frente à leishmaniose cutânea, causada por uma espécie biologicamente distinta. A escolha de *L. amazonensis* como espécie experimental é altamente justificável, pois permite explorar aspectos distintos da biologia dessa espécie, particularmente no contexto da leishmaniose cutânea. Enquanto *L. infantum* está associada a infecção sistêmica, *L. amazonensis* está associada a lesões cutâneas e resposta imune local comprometida (Nogueira *et al.*, 2016; Santarém *et al.*, 2007). Diferentemente de *L. infantum*, *L. amazonensis* apresenta variações estruturais em glicoconjugados de superfície como LPG e GP63, com implicações diretas na adesão, invasão celular e modulação da resposta imune do hospedeiro (Sacks, 1989; Späth & Beverley, 2001; Olivier *et al.*, 2010). Essas diferenças conferem a *L. amazonensis* um perfil funcional próprio, o que a torna um modelo relevante para testar a especificidade de interação de ligantes obtidos por *phage display*. Ao demonstrar que o Li1 também é capaz de interferir na infecção por *L. amazonensis*, esta dissertação contribui para ampliar a compreensão sobre o espectro de ação do peptídeo e reforça seu potencial frente às diferentes formas clínicas da leishmaniose.

Finalmente, diante da relevância dos fatores de superfície na infecção por *Leishmania* spp. e da ausência de vacinas ou tratamentos ideais para as leishmanioses, a identificação de novos ligantes com potencial terapêutico torna-se crucial. Como vimos, o uso da técnica de *phage display* permitiu a seleção do peptídeo Li1, com capacidade de se ligar à superfície de

L. infantum e interferir na infecção em modelos *in vitro* e *in vivo*. Frente a isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar funcionalmente essa interação, avaliando a atividade do peptídeo sobre promastigotas e sua eficácia na prevenção da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos *in vitro* e em modelo murino, além de investigar seus possíveis efeitos citotóxicos e bioquímicos.

3. OBJETIVO

Esta pesquisa objetivou avaliar, principalmente, a interação do peptídeo Li1 com a superfície de *L. amazonensis*, bem como, seu efeito na redução da internalização de formas infectantes *in vitro* e carga parasitária *in vivo*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter e caracterizar os peptídeos Li1, Li1nc e Li1scr.
2. Determinar a atividade antiparasitária frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica e estacionária.
3. Avaliar a citotoxicidade frente a macrófagos diferenciados de células THP-1 e peritoneais murinos.
4. Investigar a interação dos peptídeos com a superfície celular de *L. amazonensis* ensaios de localização celular.
5. Avaliar a taxa e índice de infecção *in vitro* em macrófagos expostos a formas metacíclicas tratadas com os peptídeos.
6. Determinar a eficácia dos peptídeos *in vivo* em modelo murino de leishmaniose cutânea.
7. Avaliar a toxicidade sistêmica por análise de marcadores bioquímicos hepáticos e renais dos camundongos empregados no ensaio *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE PEPTÍDICA

4.1.1 Peptídeos

Os peptídeos cíclicos em estudo, Li1 e Li1scr (Verga *et al.*, 2024) e o não cíclico Li1nc são biotinilados na região N-terminal e compostos por 12 resíduos de aminoácidos. Li1 e Li1scr possuem resíduos fixos de cisteína nas posições 2 e 11 que formam uma ligação dissulfeto, tendo-se então um *looping* de 8 aminoácidos. O peptídeo Li1nc não possui os resíduos de cisteína sendo estes substituídos por serina. São as sequências dos peptídeos cíclicos, Li1: Biotina-EC[KRARSAPN]CN-COOH (1572,8 g/mol) e Li1scr: Biotina-AC[RKNRESNA]CP-COOH (1572,8 g/mol). Os colchetes indicam o *looping* de oito resíduos de aminoácidos formado pela ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína de ambos os peptídeos. O peptídeo linear, Li1nc, possui sequência: Biotina-ESKRARSAPNSN-COOH (1542,6 g/mol).

4.1.2 Síntese de peptídeos

A síntese peptídica foi realizada no Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas (LASEBIO) em parceria com o professor Dr. Eduardo Maffud Cilli (IQ-UNESP), sob supervisão da Dra. Natália Coelho (FCF-UNESP). Os peptídeos foram sintetizados manualmente por síntese em fase sólida (SPPS) de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Merrifield, 1964), utilizando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila). O método e estratégia empregados baseiam-se no acoplamento sequencial de resíduos da cadeia peptídica - que está ligada covalentemente pelo seu aminoácido carboxi-terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido insolúvel (resina) – por meio da desproteção dos grupos α -amino dos fmoc-aminoácidos (Coelho, 2022).

Empregou-se a resina Fmoc-Asn (Trt)-Wang (aapptec) com grau de substituição de 0,51 mmol/g para a síntese dos peptídeos Li1 e Li1nc, esta resina permite que ao final da síntese obtenha-se peptídeos com as extremidades C-terminal carboxiladas. Os aminoácidos (aapptec) utilizados para a síntese foram: Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ser(Tbu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH e Fmoc-L-Glu(Otbu). Foi utilizada a escala de 0,1 mmol com 4x de excesso, logo, com equivalência de 0,4 para os aminoácidos e agentes acoplantes. A solvatação da resina com N,N-Dimetilformamida (DMF) (NEON) foi realizada durante as reações de desproteção e acoplamento para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Para a desproteção e

retirada do grupo Fmoc base-lábil foi utilizada uma solução de 20% de 4-metilpiperidina em DMF. Para o acoplamento dos resíduos referentes ao peptídeo Li1 foi realizada a ativação dos grupos carboxila dos Fmoc-aminoácidos com uso do agente supressor de racemização 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (61,25 mg) (aapptec) e agente ativador e acoplante N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (76 µL) (Oakwood Chemical), também utilizando a escala de 0,1 mmol e excesso de 4x para ambos os reagentes e, quando estes não foram eficientes, utilizou-se o agente ativador e acoplante Hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil isotiourônio (HATU) (152 mg) (aapptec) a 0,1 mmol e excesso de 4x e a base N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) (139 µL) (oakwoodchemical) a 0,1 mmol e excesso de 8x. Para o acoplamento dos resíduos do peptídeo Li1nc empregou-se o HOBt (61,25 mg) (aapptec) e o DIC (62 µL) (oakwoodchemical) a 0,1 mmol e excesso de 4x. O teste de ninidrina foi empregado para confirmar a desproteção – retirada do grupo base-lábil Fmoc - do grupo α-amino, bem como, o acoplamento dos resíduos de aminoácidos (Muting; Kaiser, 1963).

4.1.3 Biotinilação peptídica

Para o acoplamento da biotina (Sigma) foi utilizada a escala de 0,1 mmol com 2x de excesso, logo, com equivalência de 0,2 para biotina e agentes acoplantes (48 mg de biotina). O acoplamento da biotina foi realizado com uso do par de reagentes acoplantes HOBt (30,62 mg) e DIC (38 µL). O teste de ninidrina foi empregado para confirmar a desproteção do grupo α-amino do resíduo -Glu, bem como, o acoplamento da biotina (Muting; Kaiser, 1963). A solvatação da resina com DMF foi realizada entre a reação de desproteção e acoplamento, para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

4.1.4 Reação de clivagem peptídica, precipitação e extração

Efetuuou-se a clivagem dos peptídeos utilizando 94% de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma) e 2,5% de água ultrapura, além de supressores de reações colaterais, sendo 1% de Triisopropilsilano (TIS) (oakwoodchemical) e 2,5% de 3,6-dioxa-1,8-octanedithiol (DODT) (Sigma) (v:v:v:v), em frasco de cintilação durante duas horas, sob agitação branda (90 rpm) e em temperatura ambiente (27 °C), na proporção de 1 mL de solução para 100 mg de peptídeo. Em seguida, procedeu-se a precipitação com éter etílico (NEON) gelado adicionando ao conteúdo (resina+peptídeo) cerca de 10 mL do referido solvente (dois tubos tipo falcon), seguido de 4 ciclos de agitação em vórtex e sonicador com conseguinte centrifugação a 6.000 rpm, o sobrenadante foi reservado e descartado após avaliação do perfil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR). O conteúdo peptídeo-resina foi seco

à temperatura ambiente (27 °C) e prosseguiu-se com a extração, para isto, empregou-se o mesmo método adotado na precipitação com substituição do éter por 0,045% de TFA em água ultrapura e 0,036% de TFA em acetonitrila (1:1), após a centrifugação (6000 rpm) os sobrenadantes contendo os peptídeos foram liofilizados e o conteúdo mantido sob refrigeração (-20).

4.1.5 Reação de oxidação e ciclização peptídica

Utilizou-se o método oxidação por iodo, amplamente empregado (Elagamy *et al.*, 2021; Wani *et al.*, 2021) seguindo o protocolo disponibilizado por Sigma Aldrich (2024), oxidação por iodo de peptídeos com grupos tiol livres (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/chemistry-and-synthesis/peptide-synthesis/fmoc-spps-cysteine-peptides>). O peptídeo Li1 foi solubilizado (0,1 mg/mL) sob agitação em 500 mL de água ultrapura (mili-q), a temperatura ambiente (27 °C). Após completa solubilização foi adicionado “gota a gota” uma solução de iodo (0,06 M) em metanol até o aparecimento da cor “amarelo” conspícuo. Em consequente, adicionou-se uma solução de ácido ascórbico (1M) “gota a gota” até a completa neutralização do iodo (solução incolor). Em seguida, o conteúdo foi levado ao liofilizador (LIOTOP®) pelo período de 120 horas a -100 °C e 190 µHg, após foram mantidos sob refrigeração (-20 °C). Em seguida foi avaliada a avaliação do perfil do peptídeo ciclizado por CLAE-FR. Para a cromatografia uma amostra do peptídeo foi adicionada em tubos tipo eppendorf seguido de 200 µL de solução A (0,045% de TFA em água ultrapura) e mesmo volume de solução B (0,036% de TFA em acetonitrila), a amostra foi solubilizada e filtrada em filtro tipo milipore (22 µm). Após, o conteúdo foi analisado por CLAE-FR analítico Waters®, equipado com detector na faixa ultravioleta e operando com comprimento de onda a 220 nm. A coluna cromatográfica utilizada foi a *XBridge*® C18 com diâmetro interno de 4,6 mm, 150 mm de comprimento e partículas de 5 µm. A análise foi realizada em variação gradativa com solução B de 5% a 95% ao longo de 30 minutos.

4.1.6 Purificação dos peptídeos

Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Para a purificação o conteúdo de peptídeos brutos foi solubilizado em solução contendo 5% de solução B (0,036% de TFA em acetonitrila) e 95 % de solução A (0,045% de TFA em água ultrapura) (5 mL ao total), o conteúdo foi filtrado com filtro milipore 22 µm e injetado em CLAE-FR semi-preparativo Shimadzu® equipado com detector na faixa ultravioleta e operando com comprimento de onda a 220 nm. A coluna cromatográfica utilizada

foi a Jupiter® C18300A com diâmetro interno de 10 mm, 250 mm de comprimento e partículas de 10 µm. A análise foi realizada em variação gradativa de 2-20% de solução B em 90 min para o peptídeo Li1nc e 5-40% de solução B em 90 min para o peptídeo Li1. O grau de pureza das frações foi determinado em CLAE-FR analítico Waters® equipado com detector na faixa ultravioleta operando com comprimento de onda a 220 nm. A coluna cromatográfica utilizada foi a SEPAX® GP-C18 com diâmetro interno de 4,6mm, 250mm de comprimento e partículas de 5 µm. A análise foi realizada em variação gradativa com solvente B de 10-30% ao longo de 30 minutos. As frações dos peptídeos foram liofilizadas e posteriormente armazenadas sob refrigeração a -20 °C.

4.1.7 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) foi realizada em aparelho Thermo LCQ-*fleet*, com configuração ESI-IT-MS, com analisador *ion trap* em modo *eletrospray* positivo (M+H) na faixa de 200-2000 g/mol. Com esta técnica analisa-se a razão massa/carga (m/z) do peptídeo sintetizado, permitindo a comparação entre as massas do produto da síntese e do material de interesse. Dessa forma, pela razão teórica e experimental foi confirmada a síntese dos peptídeos.

4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* cepa (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) em pH 7,5 [Cloreto de sódio (Synth) 4 mg/mL; Cloreto de potássio (Sigma) 0,4 mg/mL; Fosfato de sódio bibásico (Synth) 8 mg/mL; Dextrose (Synth) 2 mg/mL; Tryptose (Fluka Analytical) 5 mg/mL, *Liver Infusion Both* (Interlab) 5 mg/mL] suplementado com 13,4 µg/mL de penicilina (Sigma); 0,2 mg/mL de estreptomicina (Sigma) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Thermo) inativado em incubadora a 27 °C por cerca de 10 dias.

4.2.2 Determinação da curva de crescimento de *L. amazonensis*

Para isto, 2×10^5 promastigotas foram adicionados em meio de cultura LIT. A curva de crescimento foi determinada analisando alíquotas de cultura de *L. amazonensis* em um mesmo horário do dia pelo período de oito dias. Alíquotas com volume de 10 µL foram analisadas em câmara de Neubauer (KASVI) (fator de correção: 10^4) para a determinação da densidade de *Leishmania* em cultura e, conseqüente construção da curva de crescimento.

4.2.3 Purificação de formas metacíclicas por gradiente de densidade de ficoll

Para a purificação das formas metacíclicas utilizou-se o protocolo descrito por Spath e Beverley (2001). Este protocolo baseia-se na purificação de formas infectivas por gradiente de concentração de ficoll. Para isso, a cultura de *L. amazonensis* em fase estacionária foi centrifugada durante 10 min a 2000 rpm e 4 °C, em consequente, o conteúdo celular foi suspenso em 2 mL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 1X e reservado a 4 °C. Em um tubo tipo falcon foi adicionado 2 mL de uma solução de ficoll 40% em meio PBS, em consequente, adicionou-se 2 mL de meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Cultilab) contendo 20% de ficoll, posteriormente, foi adicionado o mesmo volume de PBS contendo 10% de ficoll e finalmente, a suspensão de promastigotas em PBS. O tubo falcon contendo os estratos de ficoll e promastigotas foi centrifugado a 1300 g por 10 min a 4 °C, após, as camadas inferior, intermediária e superior foram coletadas e coradas por Giemsa a 7,5% (v/v). Em seguida, cada estrato foi analisado quanto à morfologia característica de forma metacíclica (corpo celular estreito e flagelo cumprido geralmente 2 vezes o tamanho do corpo) em câmara de Neubauer por microscopia óptica (MO) (aumento de 600 x). A camada intermediária foi determinada como a enriquecida com metacíclica.

4.2.4 Cultivo, adesão e diferenciação de célula THP-1

Utilizou-se a metodologia descrita por Gogulamudi *et al.*, (2015) e Singh *et al.*, (2015), com modificações. Células THP-1 (linhagem celular humana imortalizada derivada de leucemia monocítica) foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Thermo) a 10% (v/v) e 13.4 µg/mL de penicilina (Sigma) e 0,2 mg/mL de estreptomicina (Sigma) por no máximo duas semanas observando os critérios: presença ou ausência de contaminação, aparência e contorno da membrana celular, formação de *clusters* e densidade celular. Manteve-se as culturas em garrafas de cultivo celular em incubadora à temperatura de 37 °C, com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Após 4 dias de crescimento, realizou-se a contagem da cultura em câmara de Neubauer por MO (600 x). 1x10⁶ células THP-1 que foram ressuspensas em meio (RPMI-1640) contendo 100 nM PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Sigma) e semeadas (100 µL) em placas de 96 poços estéreis para diferenciação e adesão. As placas foram incubadas em BOD por 96 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.2.5 Obtenção e adesão de macrófago murino peritoneal

Para obtenção dos macrófagos murinos peritoneais 1 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco) foram inoculados no peritônio de camundongos swiss machos com 4 a 8 semanas de idade, para estimulação e migração de macrófagos à região peritoneal. Após 3 a 4 dias da estimulação, os animais foram eutanasiados segundo os procedimentos adotados pelo comitê de ética local (parecer nº 03/2019). Após eutanásia e assepsia do abdômen com álcool 70°, o peritônio foi exposto, realizando-se a retirada do exsudado peritoneal, seguindo a metodologia descrita por Velásquez *et al.*, 2017. Em seguida, foi realizada a contagem (como descrito no item 3.11) da cultura e 1×10^6 macrófagos murinos foram ressuspensos em meio RPMI-1640 completo e semeados em placas de 96 poços estéreis para a adesão. Incubou-se as placas por 4 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.2.6 Avaliação da atividade antipromastigota

A atividade antipromastigota dos peptídeos foi determinada pelo método de viabilidade celular por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) de acordo com protocolo utilizado por Velásquez *et al.*, (2017). Alíquotas na concentração de 1×10^7 promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica e estacionária, separadamente, foram adicionadas em placas de 96 poços estéreis para a interação com os peptídeos em concentrações crescentes de 0,5 a 1 mg/mL em 100 µL de meio LIT. As placas foram levadas incubadora (BOD) à temperatura de 27 °C por 72 horas. Utilizou-se como controle o meio com ou sem os peptídeos, na presença ou ausência do parasita. Foi empregado como fármaco padrão a anfotericina B (12,5 a 0,19 µg/mL) (Cristália). Após incubação, foi adicionado 10 µL da solução de MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL e PMS 0,2 mg/mL, PMS = metassulfato de fenazina) em todos os poços seguido de nova incubação ao abrigo da luz por 75 min a 27 °C. Para a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível (Tecan®) a 570nm os cristais de formazan foram dissolvidos com a adição de 100 µL de etanol e 100 µL de isopropanol + PBS em uma razão de 1:1. As absorbâncias foram analisadas obtendo-se o percentual de células viáveis nas diferentes concentrações avaliadas:

$$\text{Células viáveis (\%)} = (Gp / Gc) \times 100$$

Sendo:

Gc: corresponde a quantidade de parasito/mL viáveis nos poços de controle sem a substância.

Gc = Ac - Am, em que: Ac é o valor da absorbância dos poços com *Leishmania* sem o composto e Am representa a absorbância do controle sem o parasito e o composto. Gp: corresponde ao

número de parasito/ml viáveis em diferentes concentrações da substância. $G_p = A_p - A_{pm}$, em que: A_p é a absorbância do poço de interesse e A_{pm} é a absorbância do poço controle de mesma concentração da substância. Esse ensaio foi realizado em triplicata, com os dados validados por experimentos independentes.

Subsequentemente, percentuais de viabilidade inferiores a 50% foram analisados utilizando o *software* BioEstat 5.3 para determinar o IC_{50} (concentração inibitória para 50% das células viáveis) por meio de regressão polinomial quadrática.

4.2.7 Avaliação da citotoxicidade frente macrófagos peritoneais murinos e diferenciados de células THP-1

A citotoxicidade dos peptídeos foi determinada pelo método de viabilidade celular por MTT de acordo com protocolo utilizado por Velásquez *et al.*, (2017), com modificações. 1×10^6 células THP-1 foram ressuspensas em meio RPMI-1640 completo contendo 100 nM PMA (*Sigma*) e semeadas (100 μ L) em placas de 96 poços estéreis para diferenciação e adesão, as placas foram incubadas em BOD por 96 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . 1×10^6 macrófagos murinos foram ressuspensos também em meio RPMI-1640 e semeados (100 μ L) em placas de 96 poços para adesão, incubou-se as placas por 4 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Decorrido o tempo de adesão/diferenciação, os macrófagos foram incubados com peptídeos em concentrações crescentes de 0,5 a 1 mg/mL em 100 μ L de meio. As placas foram incubadas novamente em BOD à temperatura de 37 °C por 24 horas. Utilizou-se como controle negativo o meio na presença dos macrófagos. Foi empregado como fármaco padrão a anfotericina B (300 a 4,68 μ g/mL). Após incubação, foi adicionado 10 μ L da solução de MTT/PMS em todos os poços seguido de nova incubação ao abrigo da luz por 75 min a 37 °C e 5% de CO_2 . Para a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 570nm os cristais foram dissolvidos com a adição de 100 μ L de etanol e 100 μ L de isopropanol + PBS em uma razão de 1:1. As absorbâncias foram analisadas obtendo-se o percentual de células viáveis nas diferentes concentrações avaliadas segundo a fórmula descrita no item anterior. Esse ensaio foi realizado em triplicata, com os dados validados por experimentos independentes

Subsequentemente, percentuais de viabilidade inferiores a 50% foram analisados utilizando o *software* BioEstat 5.3 para determinar o CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células viáveis) por meio de regressão polinomial quadrática. Esse experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes

4.2.8 Avaliação do efeito dos peptídeos frente o índice e taxa de infecção de *L. amazonensis* *in vitro*

Para o ensaio de infecção adotou-se o método descrito anteriormente (Verga *et al.* 2024), com modificações. Foi utilizada uma cultura de *L. amazonensis* em fase estacionária enriquecida com formas metacíclicas, segundo o protocolo descrito por Spath & Beverley, (2001). Foram escolhidos dois modelos de macrófago, THP-1 e murino, considerando a heterogeneidade dos mesmos e as diferenças na expressão de marcadores, funções e respostas celulares (Chanput *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2003). 2×10^4 células THP-1 foram ressuspensas em meio RPMI contendo PMA e semeadas (300 μ L) sob lamínulas circulares no fundo de placas de 24 poços estéreis para diferenciação e adesão, as placas foram incubadas em BOD por 96 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. 2×10^4 macrófagos murinos foram ressuspensas em meio RPMI-1640 e semeados (300 μ L) sob lamínulas circulares no fundo de placas de 24 poços estéreis para adesão, as placas foram incubadas em BOD por 4 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. 1×10^5 formas metacíclicas de *L. amazonensis* enriquecidas foram ressuspensas em meio RPMI-1640 contendo 0,5 mg/mL dos peptídeos por 15 minutos, após esse tempo, foram adicionados nos poços 300 μ L das referidas suspensões e as placas (com o conteúdo macrófago+peptídeo+*Leishmania*) foram incubadas novamente em BOD por 2 horas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, foi feita a retirada do sobrenadante dos poços para remoção dos parasitas não internalizados e procedeu-se a fixação com adição de 300 μ L de metanol por 5 minutos e a coloração com 300 μ L de Giemsa a 7,5% (v/v), após, as lamínulas foram retiradas para secagem (24-48 h) e conseguinte montagem com Entellan. Realizou-se a leitura por MO (1000 x) 72 h após a montagem. Foi realizada a contagem de macrófagos (100 macrófagos íntegros) anotando-se o número de macrófagos infectados e parasitas internalizados. Esse ensaio foi realizado em duplicata, com os dados validados por experimentos independentes. O índice de infecção foi determinado de acordo com a fórmula (Velásquez *et al.*, 2017):

$$I_{inf} = M_{inf} \times A_{int}$$

Sendo:

M_{inf} = número médio/porcentagem de macrófagos infectados.

A_{int} = número médio de amastigotas internalizados/macrófago

Em consequente, determinou-se também a taxa de infecção (VERGA *et al.*, 2024, com modificações) de acordo com a fórmula:

$$\text{Infecção (\%)} = 100 + [(N_t - N_c) / N_c] \times 100$$

Sendo:

Nt: número de parasitas do grupo teste

Nc: número de parasitas do grupo controle

4.2.9 Ensaio de localização celular

Por meio do ensaio de localização celular, utilizando microscopia confocal, foi possível verificar a interação dos peptídeos com as superfícies celulares-alvo neste estudo, sendo essa técnica amplamente empregada (Nwaneshiudu *et al.*, 2012). Inicialmente, foi realizado um estudo piloto para avaliar a ligação dos peptídeos às superfícies celulares utilizando, principalmente, diferentes tempos de incubação. As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência invertido e determinou-se o período de 8 horas para a incubação das amostras com os peptídeos. Neste ensaio, formas procíclicas e metacíclicas de *L. amazonensis*, macrófagos peritoneais murinos e diferenciados de células THP-1 foram, separadamente, fixados em paraformaldeído 4% em PBS por 20 min e bloqueados com 4% de BSA (*Bovine serum albumin*) em PBS por 30 min, segundo o método descrito por Verga *et al.*, 2024. Em consequente, os parasitas e macrófagos foram incubados por 8 horas com os peptídeos na concentração de 0,5 mg/mL. Após, foram realizadas duas lavagens com PBS para retirada do excesso de peptídeos não ligados, em seguida, os parasitas foram incubados com o fluoróforo Alexa-Fluor (Promega) conjugado a estreptavidina (excitação em 495 nm, emissão em 519 nm) para interação com a biotina por 1 h, após 45 min de incubação adicionou-se o Hoechst (Thermo) (excitação em 350 nm e emissão em 519 nm) para interação com o DNA celular, ambos fluoróforos utilizados de acordo com as instruções do fornecedor. Decorrido 1 h de incubação realizou-se duas lavagens para retirar o excesso dos fluoróforos, as lâminas foram montadas utilizando o *Corning Cell-Tak Cell and Tissue Adhesive* (Life Science) e analisadas em microscópio de fluorescência confocal Zeiss LSM800 com padrões fixos de percentual de laser e ganho. Um grupo PBS foi utilizado como controle, principalmente para descartar a fluorescência não específica. Os dados obtidos foram validados por experimentos independentes.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PEPTÍDEOS FRENTE CARGA PARASITÁRIA *IN VIVO* EM MODELO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM CAMUNDONGO BALB/C

4.3.1 Infecção com promastigotas pós-exposição aos peptídeos

O experimento foi conduzido como um estudo randomizado cego simples, os grupos adotados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos do primeiro ensaio *in vivo*

Grupo	Descrição	N.º de animais por grupo
G1	Animais sadios	5
G2	Animais controle	
G3	Animais infectados com promastigotas pós-exposição ao Li1	
G4	Animais infectados com promastigotas pós-exposição ao Li1nc	

Fonte: autoria própria.

Foi realizada a contagem de uma cultura de *L. amazonensis* em fase estacionária tardia, que posteriormente foi centrifugada a 2000 rpm por 10 min, como descrito anteriormente. Os promastigotas foram então ressuspensos numa densidade celular de 1×10^7 parasitas/mL em PBS e incubados com os peptídeos numa concentração de 0,2 mg/mL por 15 min. Em seguida, 100 µL da suspensão de promastigotas+peptídeos foram inoculados no dorso da pata traseira direita de camundongos BALB/c machos. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, contendo cinco animais cada, de acordo com o peso pré-determinado visando a formação de grupos heterogêneos, sendo estes: G1. Animais sadios, G2. Animais controle, G3. Animais infectados com promastigotas pós-exposição ao Li1, G4. Animais infectados com promastigotas pós-exposição ao Li1nc. Os animais foram acompanhados durante 30 dias, durante esse período foram realizadas medidas biométricas semanais, acompanhamento do peso dos animais e do crescimento da lesão utilizando paquímetro digital (*Mitutoyo*) (Verga *et al.*, 2024; Velásquez 2017).

Após 30 dias, os animais foram sacrificados, segundo as recomendações do comitê de ética local, protocolo CEUA/FCF/CAR nº 6499092515, e a derme e epiderme da região da lesão removidas para a quantificação da carga parasitária por cultivo dos parasitas por meio de biópsias das lesões em diluição limitante (Titus *et al.*, 1985). Os tecidos animais foram macerados logo após a coleta e a suspensão de parasitas foi seriamente diluída em meio LIT

completo, distribuídas em placas de 96 poços estéreis, uma placa para cada animal e em triplicata. As placas foram acompanhadas diariamente até o 9.º dia sob incubação em BOD a 27 °C, para avaliar a presença dos parasitas, o desenvolvimento das formas promastigotas (Almeida *et al.*, 2017).

4.3.2 Infecção e posterior tratamento com os peptídeos

O experimento foi conduzido como um estudo randomizado cego simples, os grupos adotados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos do segundo ensaio *in vivo*

Grupo	Descrição	N.º de animais por grupo
G5	Animais sadios	5
G6	Animais controle	
G7	Animais infectados e tratados com Li1	
G8	Animais infectados e tratados com Li1nc	
G9	Animais infectados e tratados com PBS	
G10	Animais infectados e tratados com anfotericina B	

Fonte: autoria própria.

O estudo realizado foi cego simples (Tabela 6). Foi realizada a contagem de uma cultura de *L. amazonensis* em fase estacionária tardia, que posteriormente foi centrifugada a 2000 rpm por 10 min, como descrito anteriormente. Os promastigotas foram então ressuspensos numa densidade celular de 1×10^7 parasitas/mL em PBS. Em seguida, 100 µL da suspensão de promastigotas foram inoculados no dorso da pata traseira direita de camundongos BALB/c machos. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos, contendo cinco animais cada, de acordo com o peso pré-determinado visando a formação de grupos heterogêneos, sendo estes: G5. Animais sadios, G6. Animais controle, G7. Animais infectados e tratados com Li1, G8. Animais infectados e tratados com Li1nc, G9. Animais infectados e tratados com PBS e, G10. Animais infectados e tratados com anfotericina B. Os animais foram acompanhados durante 45 dias, durante esse período foram realizadas medidas biométricas semanais, acompanhamento do peso dos animais e do crescimento da lesão utilizando paquímetro digital (Mitutoyo) (Verga *et al.*, 2024; Velásquez 2017).

Após 45 dias, os animais foram tratados por 1 semana com administração intradérmica direto na lesão de 50 μL dos tratamentos. O grupo com anfotericina recebeu uma dose diária de 2 mg.Kg^{-1} , enquanto os grupos tratados com os peptídeos receberam 3 doses diárias totalizando 36 mg.Kg^{-1} . Após o tratamento os animais foram sacrificados, segundo as recomendações do comitê de ética local, protocolo CEUA/FCF/CAR nº 6499092515. Quantificou-se a carga parasitária por diluição limitante, como descrito no item anterior (Titus *et al.*, 1985; Almeida *et al.*, 2017).

4.3.3 Parâmetros bioquímicos: biomarcadores renais e hepáticos do ensaio *in vivo*

Para as análises bioquímicas, o sangue dos animais foi coletado por pulsão cardíaca imediatamente após a eutanásia, o sangue foi armazenado em microtubos e sob refrigeração a 4 °C (Velásquez, 2017). O soro sanguíneo foi empregado para as análises bioquímicas, que foram realizadas pelo Laboratório Veterinário São José (Matão, SP). Foram avaliados os seguintes biomarcadores renais e hepáticos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), creatinina, ureia, bilirrubina total e frações direta e indireta. Foi utilizado o método colorimétrico para análises das bilirrubinas e creatinina, cinético para AST e ALT, enzimático para ureia e enzimático colorimétrico para ALP. Os biomarcadores de função hepática e renal foram avaliados com o objetivo de verificar se os peptídeos poderiam apresentar alguma toxicidade *in vivo* (Melo *et al.*, 2012).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

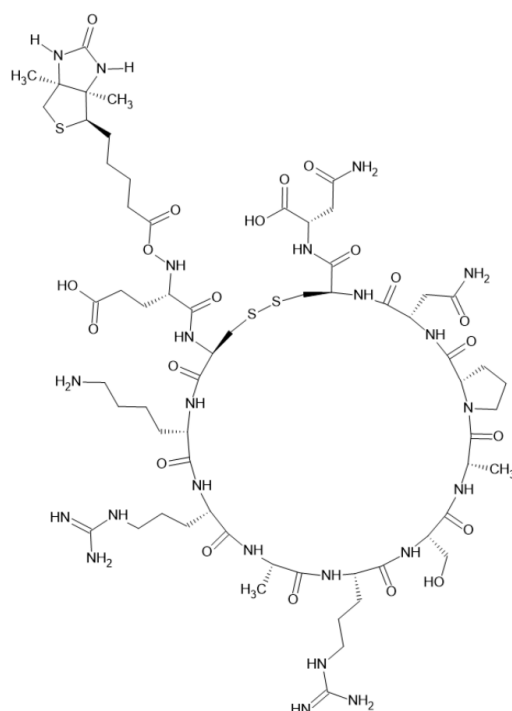
Os resultados foram analisados como média $\pm$ desvio padrão utilizando o programa estatístico *Prism 8.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Para as análises estatísticas, utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

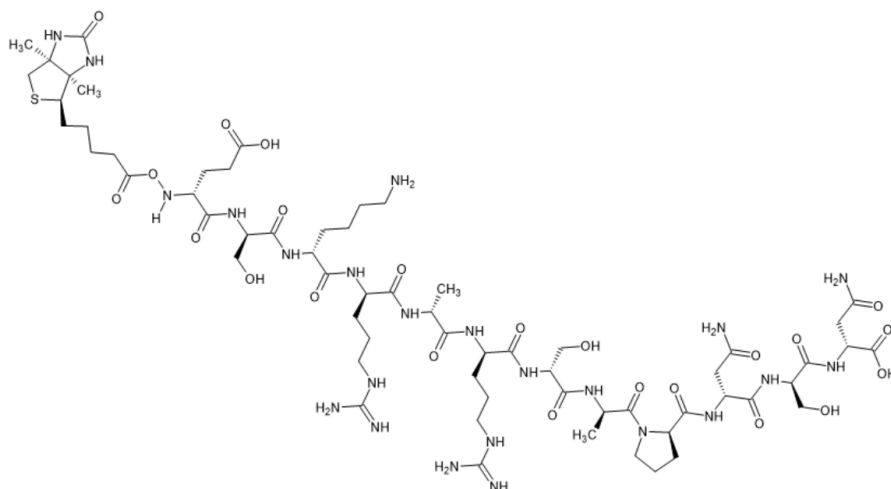
Os peptídeos Li1 e Li1nc (Figuras 3 e 4) foram sintetizados manualmente por SPFS de acordo com a metodologia descrita por Merrifield (1964) utilizando a estratégia Fmoc, com o acoplamento dos resíduos de aminoácidos pela ativação do grupo carboxila. Ao final dessa síntese obteve-se peptídeos compostos por 12 resíduos de aminoácidos com sua extremidade N-terminal biotinilada e extremidade C-terminal carboxilada.

Figura 3 - Estrutura do peptídeo Li1



Fonte: elaborado pelo autor em Software ACD/Chemsketch.

Figura 4 - Estrutura do peptídeo Li1nc



Fonte: elaborado pelo autor em Software ACD/Chemsketch.

Como podemos verificar na tabela 3, o peptídeo Li1 apresentou menor rendimento se comparado a Li1nc, o que é esperado, entre outros fatores, considerando a etapa extra de oxidação para a ciclização do peptídeo. A complexidade adicional da etapa de ciclização utilizando iodo leva a formação de sais, como iodeto de hidrogênio (HI) e a diminuição da eficiência global do processo (Picchi *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Rendimento de síntese dos peptídeos

Peptidil-resina	Massa do peptídeo bruto (mg)	Massa teórica do peptídeo bruto (mg)	Rendimento de clivagem (%)
Li1 - Biotina-EC[KRARSAPN]CN-COOH	210	351	60
Li1nc - Biotina-ESKRARSAPNSN-COOH	120	131	91

Fonte: autoria própria.

Não foi possível a realização da síntese do peptídeo Li1scr. Este peptídeo cíclico é composto pelos mesmos resíduos de Li1, incluso as cisteínas nas posições 2 e 11, porém, os

demais resíduos ocupam posições diferentes na cadeia peptídica. Anteriormente, foi documentado que a ordem dos resíduos para o Li1scr é um fator determinante para sua atividade (Verga *et al.*, 2024). Sobre a síntese do Li1scr, foram realizadas tentativas sucessivas de acoplamento utilizando diferentes abordagens, mas não foi possível desproteger a cisteína na segunda posição, como veremos a seguir.

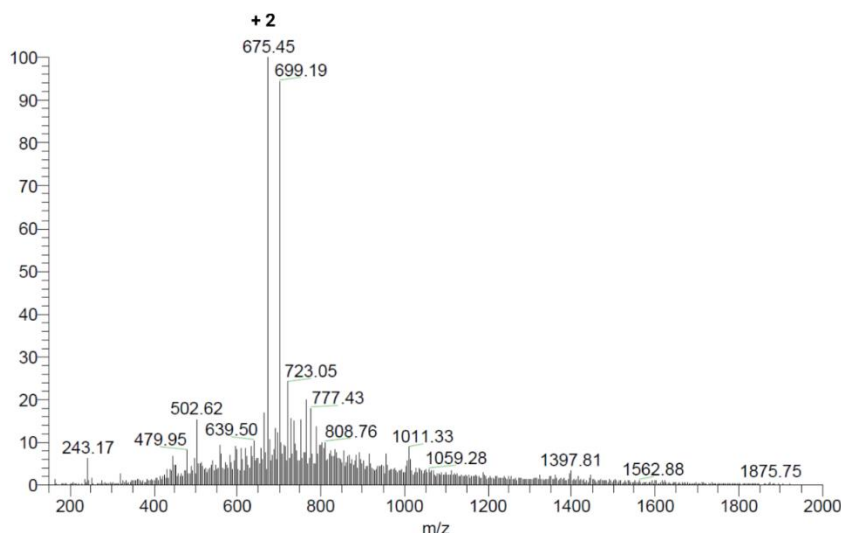
Utilizando a mesma estratégia adotada para os outros dois peptídeos, a sequência de acoplamento para esse peptídeo é Fmoc-Pro-Wang seguido do segundo resíduo Fmoc-Cys(Trt)-OH. Nesse processo a desproteção do primeiro resíduo ocorreu perfeitamente, bem como, o acoplamento do segundo resíduo, a cisteína. Porém, a partir deste último houve tentativas consecutivas e falhas de desproteção da amina terminal pela retirada do grupo base-lábil (Fmoc) com 20% de 4-metilpiperidina em DMF. Logo, adotamos uma segunda estratégia para a síntese, a resina de cloreto de 2-clorotritila com grau de substituição 0,85 mmol/g. Para tanto, realizou-se o acoplamento do primeiro resíduo a resina, pois diferentemente da Wang esta não possui o primeiro resíduo de aminoácido acoplado. O acoplamento da prolina ocorreu com uso do reagente ativador DIEA com conseguinte desproteção. Para verificar se o aminoácido inicial havia sido acoplado e desprotegido, avaliou-se o material por espectrofotometria no comprimento de onda de 290 nm depois de um processo de desproteção global que utilizou 1,1 mg de peptídeo-resina (equivalente a 1 μ mol), 2 mL de 50% de 4-metilpiperidina em DMF por 10 minutos sob agitação a 100 rpm. A absorbância da amostra foi determinada em 0,219 nm. Para verificar se a prolina acoplou ou não na resina, foram realizados os cálculos de substituição da prolina teórico e o experimental (cálculos não mostrados). O acoplamento da prolina apresentou rendimento de 16%, o que não é um resultado desejado, mas houve o seguimento com a síntese e o acoplamento da cisteína. A cisteína acoplou, mas infelizmente a desproteção da mesma não ocorreu descontinuando a síntese. Como última tentativa, a síntese foi retomada com a estratégia inicial utilizando a resina Fmoc-Pro-Wang e a cisteína de outro lote. Ainda assim, não houve sucesso na tentativa de desproteção da cisteína. Finalmente, a síntese do Li1scr foi tecnicamente inviabilizada mesmo após múltiplas abordagens e modificações na estratégia sintética, como descrito detalhadamente. Essa dificuldade se concentrou na desproteção da cisteína em posição crítica, mesmo com mudança de resina e uso de novo lote de reagentes. Esse obstáculo foi registrado de forma transparente e, portanto, configura uma limitação técnica e não conceitual.

Considerando a não atividade anteriormente documentada para o Li1scr sabemos que a ordem dos resíduos de aminoácidos é um fator importante, pois anteriormente o mesmo não foi

efetivo em reduzir a internalização de formas infectantes *in vitro* e *in vivo* (Verga *et al.*, 2024). Li1nc é um peptídeo linear composto pela mesma sequência de resíduos de aminoácidos que Li1 com exceção das cisteínas que foram substituídas nas posições 2 e 11 por serina, a única diferença entre os resíduos é que na cadeia lateral da serina há um grupamento hidroxila (-OH), já na cisteína há um grupamento sulfidril (-SH). Com o peptídeo Li1nc, que funciona como um controle negativo parcial, buscamos verificar se a ciclização é um fator crucial para a atividade do peptídeo, já que sabemos que a ordem dos demais resíduos é um fator importante.

A confirmação por EM em todos os passos da síntese é crucial, pois posteriormente os peptídeos foram empregados nas etapas seguintes de biotinylação e ciclização. Como veremos, em cada uma dessas etapas a técnica de EM é empregada para assegurar que o material obtido é o peptídeo de interesse. Após o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos uma alíquota referente a resina empregada para a síntese do peptídeo Li1 foi clivada como descrito anteriormente e avaliada por EM (Figura 5).

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)



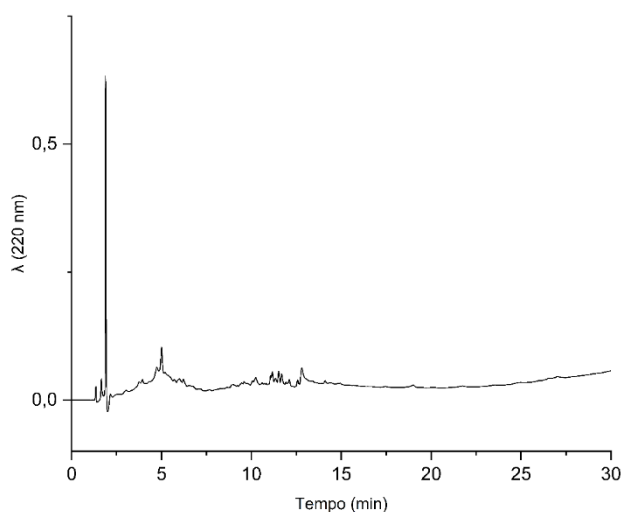
Fonte: autoria própria.

O peptídeo Li1 não biotinilado possui massa molecular referente a 1348,51 g/mol. No espectro de massas acima podemos verificar a formação da forma ionizada +2 (675,45).

Pela análise da razão massa/carga teórica (675,25) e experimental (675,45) obtida foi possível determinar que o peptídeo Li1 sintetizado é o material de interesse, sendo então empregado na etapa seguinte de biotinylação e o produto obtido avaliado por CLAE-FR (Figura

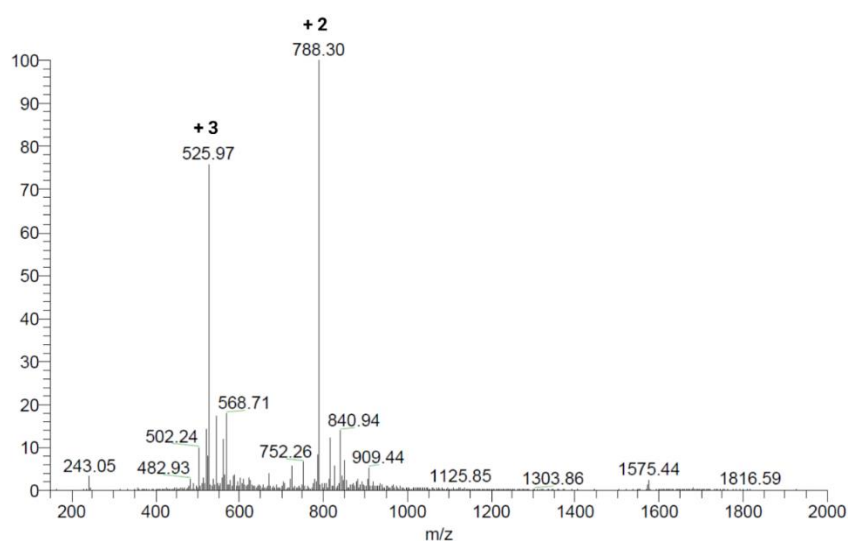
6) em um cromatógrafo Waters em coluna analítica de fase reversa C18, em gradiente de 5-95% de solvente B em 30 minutos para determinação de seu perfil e posterior comparação com a sua forma cíclica. O mesmo material também foi avaliado por EM para confirmação da biotinilação (Figura 7).

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



Fonte: autoria própria.

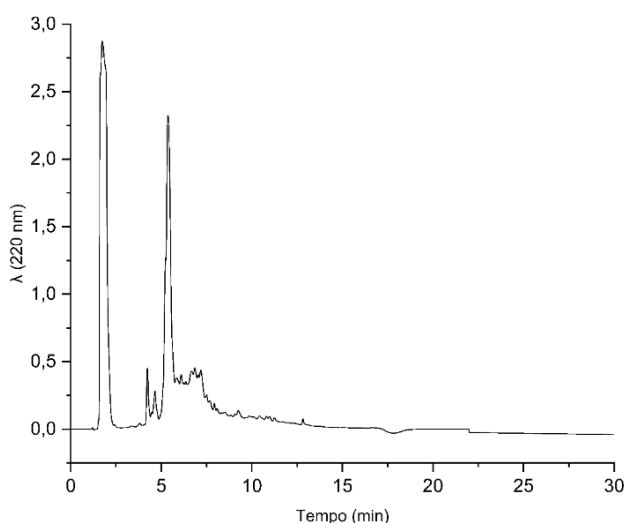
Figura 7 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1 bruto biotinilado, com destaque para os picos +2 (788,30) e +3 (525,97)



Fonte: autoria própria.

O peptídeo Li1 biotinilado possui massa molecular referente a 1574,8 g/mol. Verificou-se as formas ionizadas +2 (788,30) e +3 (525,97). Seguindo a fórmula descrita anteriormente, pela análise da razão massa/carga teórica e experimental, determinou-se que o peptídeo biotinilado obtido é o material de interesse. Logo, o peptídeo Li1 foi submetido a ciclização, e o produto bruto obtido foi avaliado por CLAE-FR (Figura 8). O peptídeo Li1 bruto biotinilado e cíclico foi analisado em cromatógrafo Waters em coluna analítica de fase reversa C18, em gradiente de 5-95% de solvente B em 30 minutos, para análise do grau de pureza e estabelecer o gradiente de solvente B para a purificação, ou seja, a porcentagem necessária de solvente B para a eluição do peptídeo, considerando o tempo após a injeção e o pico de interesse.

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



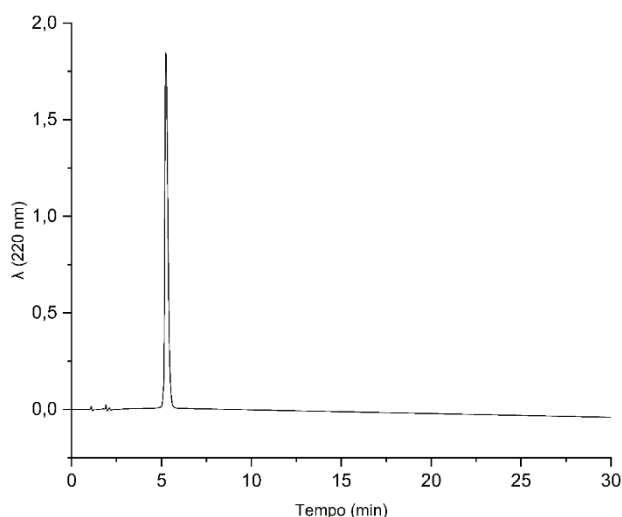
Fonte: autoria própria.

O pico relativo ao peptídeo Li1 bruto biotinilado e cíclico possui tempo de retenção por volta de 5,3 min, o que, levando em consideração o gradiente linear de 5-95% de solvente B em 30 minutos, pode-se inferir que possui eluição por volta de 16% de solvente B. Todavia, por conta da baixa solubilidade de Li1 e os sais gerados como subprodutos da ciclização, para a purificação do peptídeo foi decidido utilizar um gradiente maior, de 5-40% de solvente B em 90 minutos.

Também vale ressaltar que após a ciclização houve uma pequena mudança no tempo de retenção do pico de interesse de 5 para 5,3 minutos, ou seja, após esse processo o material de interesse passa a ter mais afinidade com a coluna se comparado a sua forma não cíclica.

A seguir, podemos verificar o perfil referente ao peptídeo puro (Figura 9). É importante ressaltar que há um pequeno deslocamento no tempo de retenção do peptídeo de 5,3 min do material bruto para 5,2 no material puro, possivelmente associado a retirada de contaminantes e subprodutos como sais gerados pela ciclização, que não são de interesse e que deveriam estar influenciando no deslocamento do pico.

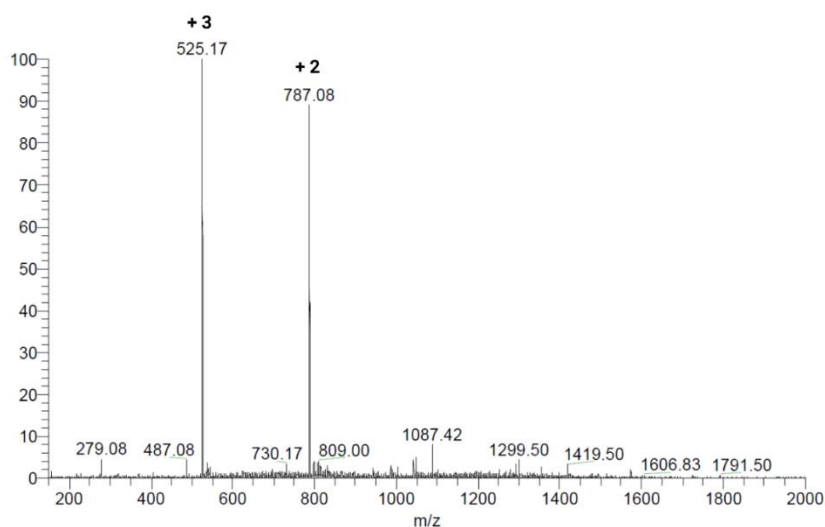
Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1 puro biotilado e cíclico obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 5,2 minutos



Fonte: autoria própria.

Finalmente, foi realizada a confirmação da síntese do material puro por EM (Figura 10).

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)

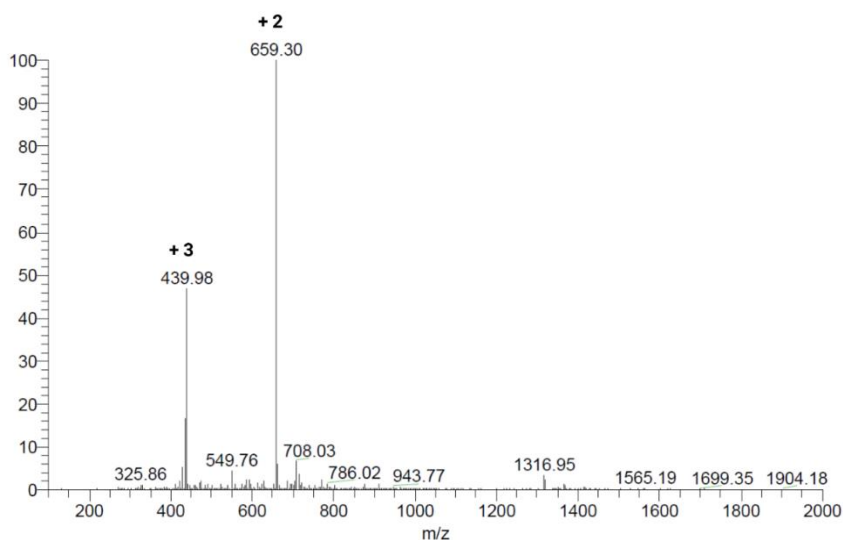


Fonte: autoria própria.

O peptídeo Li1 biotinilado e cíclico possui massa molecular referente a 1572,8 g/mol. Verificou-se as formas ionizadas +2 (787,08) e +3 (525,17). Seguindo a fórmula descrita anteriormente, pela análise da razão massa/carga teórica e experimental, determinou-se que o peptídeo Li1 purificado é o material de interesse.

Finalmente, com relação ao peptídeo Li1nc, após o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos, uma alíquota referente ao conteúdo resina-peptídeo Li1nc foi clivada, como descrito anteriormente, e avaliada por EM (Figura 11).

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)

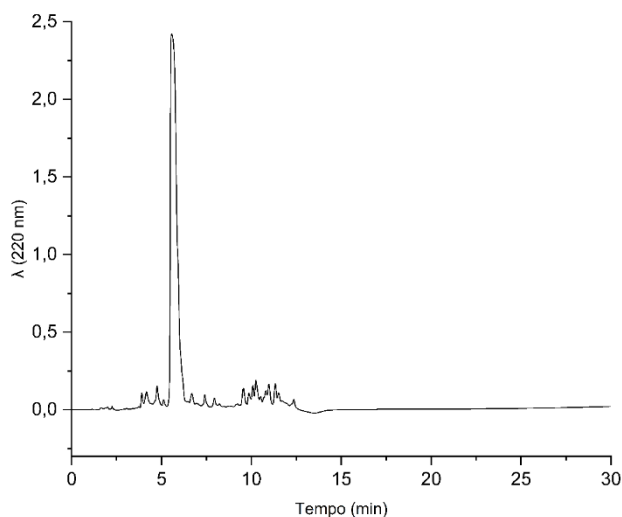


Fonte: autoria própria.

O peptídeo Li1nc não biotinilado possui massa molecular referente a 1316,38 g/mol. Verificou-se as formas ionizadas +2 (659,30) e +3 (439,98). Seguindo a fórmula descrita anteriormente, determinou-se que o peptídeo sintetizado é o material de interesse. Logo, o peptídeo foi submetido a etapa seguinte de biotinilação e o produto obtido avaliado por CLAE-FR.

O peptídeo Li1nc bruto biotinilado foi analisado em cromatógrafo Waters em coluna analítica de fase reversa C18, em gradiente de 5-95% de solvente B em 30 minutos, para análise do grau de pureza e estabelecer o gradiente de solvente B durante a purificação. O pico relativo ao peptídeo Li1 bruto biotinilado possui tempo de retenção por volta de 5,5 min (Figura 12), o que, levando em consideração o gradiente linear de 5-95% de solvente B em 30 minutos, pode-se inferir que o peptídeo possui eluição por volta de 17% de solvente B. Assim, para a purificação do peptídeo foi decidido utilizar o gradiente 2-20 % de solvente B em 90 minutos.

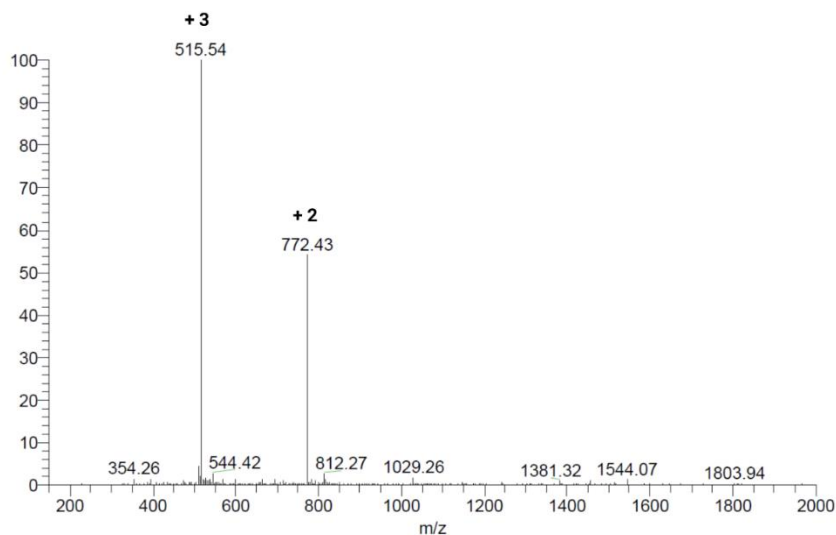
Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1nc bruto biotinilado obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 5,5 minutos



Fonte: autoria própria.

Posteriormente, foi realizada a confirmação da biotilação do peptídeo Li1nc bruto por EM (Figura 13).

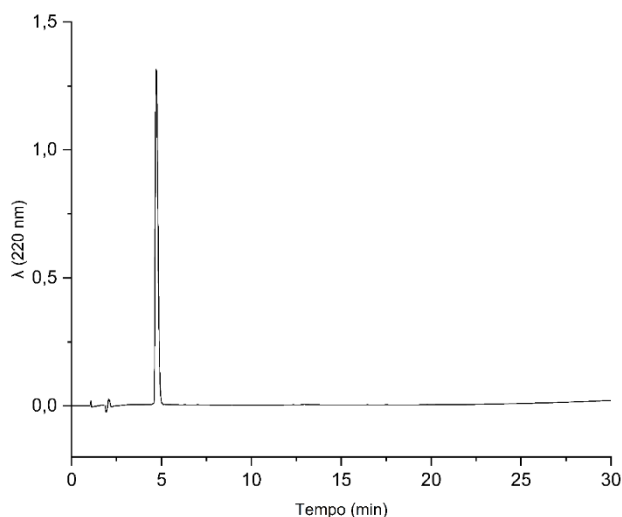
Figura 13 - Espectro de massas referente ao peptídeo Li1nc bruto biotilado, obtido por ionização positiva com destaque para o pico +2 (772,43) e +3 (515,54)



Fonte: autoria própria.

O peptídeo Li1nc bruto biotilado possui massa molecular referente a 1542,6 g/mol. Verificou-se as formas ionizadas +2 (772,43) e +3 (515,54). Seguindo a fórmula descrita anteriormente, determinou-se que o peptídeo obtido é o material de interesse sendo então purificado, como descrito anteriormente, por CLAE-FR (Figura 14).

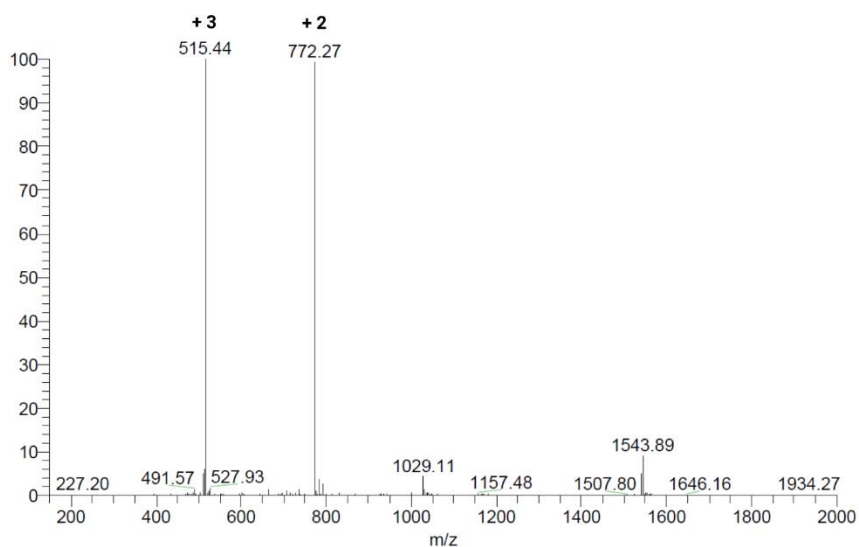
Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo Li1nc puro biotilado obtido por CLAE-FR em modo analítico em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, com tempo de retenção de 4,7 minutos



Fonte: autoria própria.

Verificou-se um pequeno deslocamento no tempo de retenção do peptídeo bruto para o puro de 5,5 para 4,7 minutos, possivelmente associado a retirada de contaminantes e subprodutos que não são de interesse e que deveriam estar influenciando no seu tempo de retenção. Finalmente, o material purificado foi avaliado por EM (Figura 15).

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)



Fonte: autoria própria.

O peptídeo Li1nc biotilado possui massa molecular referente a 1542,6 g/mol. Verificou-se as formas ionizadas +2 (772,27) e +3 (515,44). Seguindo a fórmula descrita anteriormente, determinou-se que o peptídeo Li1nc purificado é o material de interesse.

Na tabela 4 são apresentados dados referentes ao processo de purificação, como massa das frações puras (mg) e grau de pureza (%).

Tabela 4 - Dados do processo de purificação dos peptídeos

Peptídeo	Gradiente de purificação		Massa das frações puras (mg)	Pureza (%)
	CLAE-FR semi-preparativo	CLAE-FR analítico		
Li1	5-40% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min	1a - 10 mg	>95
			1b - 10 mg	> 95
Li1nc	2-20% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min	1a - 44,1 mg	> 95
			1b - 3,2 mg	> 90

Fonte: autoria própria.

A biotilação de ambos os peptídeos e a ciclização do Li1 são etapas crucias do projeto. A caracterização da interação entre os peptídeos e a superfície de *Leishmania* e dos macrófagos envolve ensaios de localização celular. A exploração da interação biotina-estreptavidina é muito usual nesses ensaios, a forte interação estabelecida entre essas moléculas permite a execução eficaz de ensaios de localização celular por microscopia de fluorescência utilizando fluoróforos conjugados a estreptavidina, como veremos nos experimentos empregados nessa pesquisa mas também como os realizados por Goujon *et al.*, 2019, Sorenson *et al.*, 2015 e mais recentemente, por Burggraf e Albert, 2024.

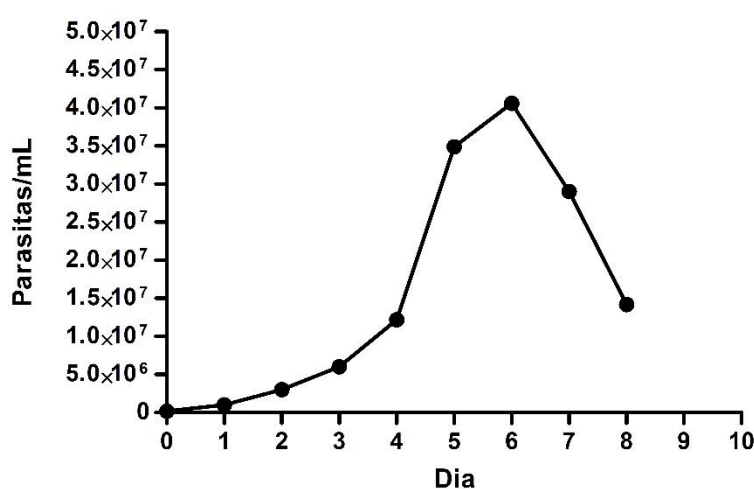
Apesar da ciclização ser responsável pela redução do rendimento na síntese peptídica e, além disso, produzir mais subprodutos indesejáveis, os peptídeos cíclicos apresentam vantagens químicas associadas à sua conformação (Oliveira *et al.*, 2017). Geralmente, os peptídeos cíclicos apresentam melhor atividade biológica em comparação com seus equivalentes lineares devido à rigidez conformacional (Horton *et al.*, 2002). A rigidez dos peptídeos cíclicos reduz o termo entrópico da energia livre de Gibbs, permitindo assim uma ligação aprimorada às moléculas-alvo ou maior seletividade por receptores. Os peptídeos cíclicos podem ser até resistentes a endopeptidases, já que sua estrutura é menos flexível do que a dos peptídeos lineares (Joo 2012). Os peptídeos cíclicos são mais estáveis, geralmente apresentam baixa

toxicidade e, além disso, maior biodisponibilidade, se comparado aos peptídeos lineares (Heidler; Link 2005; Zorzi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

Os ensaios biológicos realizados nesta pesquisa foram executados com *L. amazonensis* em diferentes fases de desenvolvimento. Para isso foi necessário estabelecer uma curva de crescimento (Figura 16).

Figura 16 - Curva de crescimento de *L. amazonensis*



Fonte: autoria própria.

A fase logarítmica ficou estabelecida entre o primeiro e quinto dia, nessa fase predominam-se as formas replicativas (procíclicas). A fase estacionária ficou estabelecida após o quinto dia, em que, predominam-se as formas não replicativas (metacíclicas).

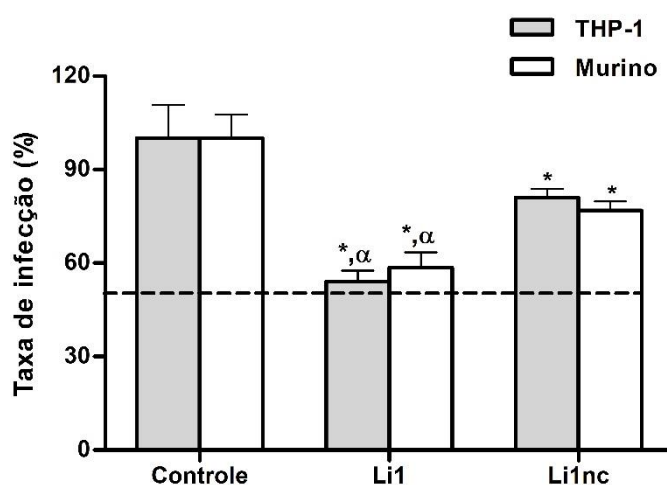
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PEPTÍDEOS FRENTE O ÍNDICE E TAXA DE INFECÇÃO DE *L. amazonensis* IN VITRO

O modelo de macrófago diferenciado de célula THP-1 tem sido amplamente empregado no estudo da interação *Leishmania*-macrófago (Verga *et al.*, 2024; Dos Santos *et al.*, 2017) em abordagens de infectividade, triagem e perfil de susceptibilidade a drogas (Santarém *et al.*, 2019; Baek *et al.*, 2020), por exemplo. O modelo de macrófago murino também tem sido empregado em estudos de infecção por *Leishmania* (O’Keeffe *et al.*, 2019) em abordagens transcriptômicas (Probst *et al.*, 2012) e para a triagem de novas drogas (Velasquez *et al.*, 2017).

De acordo com a taxa de infecção (Figura 17), o grupo pré-incubado com Li1 apresentou percentual referente a 58,5% ($\pm 4,9$) e 54,0% ($\pm 3,6$) para o modelo de infecção com macrófago

murino e diferenciado de célula THP-1, respectivamente. E Li1nc apresentou percentual referente a 76,8% ($\pm 2,9$) e 81,1% ($\pm 2,7$) para o modelo de infecção com macrófago murino e diferenciado de célula THP-1, respectivamente.

Figura 17 - Taxa de infecção de promastigotas de *L. amazonensis* em 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 de macrófago/peptídeos diferentes ($P < 0.01$). Teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.



Fonte: autoria própria.

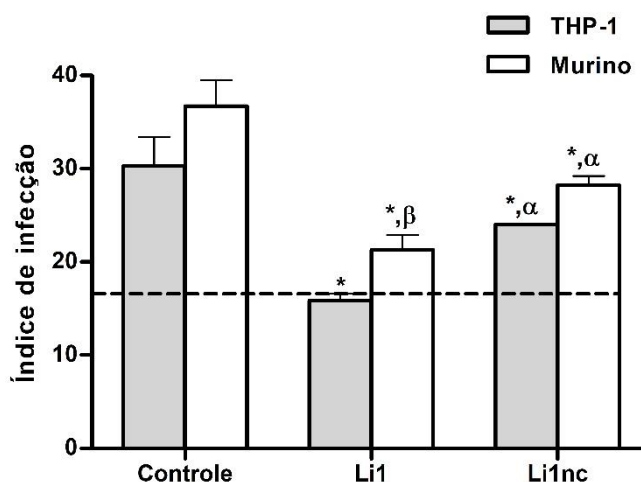
Com relação a redução da taxa de infecção, os grupos Li1 e Li1nc apresentaram redução da taxa de infecção referente a 45,9% e 76,8% respectivamente, para o modelo THP-1. Já para o modelo murino, Li1 e Li1nc apresentaram redução referente a 41,4% e 81,1% respectivamente.

Sugere-se que ambos os peptídeos são efetivos em reduzir a taxa de infecção de promastigotas metacíclicos previamente tratados se comparado aos seus respectivos controles (não tratados), de acordo com o teste estatístico. Também verificou-se que há diferenças significativas comparando-se a taxa de infecção do grupo pré-incubado com Li1 e o grupo Li1nc para ambos os modelos, então, pode-se inferir que o peptídeo Li1 possui maior capacidade de redução da taxa de infecção se comparado ao Li1nc. Não foram encontradas diferenças significativas comparando-se a atividade do mesmo tratamento em modelos diferentes, ou seja, o peptídeo Li1 é igualmente efetivo em reduzir a taxa de infecção

comparando-se os percentuais obtidos para o modelo THP-1 e murino, o mesmo é aplicado ao Li1nc.

Na figura 18, pode-se verificar o índice de infecção de $15,9 (\pm 0,7)$ e $21,3 (\pm 0,1)$ para o grupo pré-incubado com o peptídeo Li1 em modelo de macrófago THP-1 e murino, respectivamente. Também verificou-se o índice de infecção de $24 (\pm 0,1)$ e $28,2 (\pm 1,0)$ para o peptídeo Li1nc em modelo de macrófago THP-1 e murino, respectivamente. Enquanto o grupo controle apresentou índice de infecção de $30,3 (\pm 3,14)$ e $36,7 (\pm 2,86)$ para o modelo de macrófago THP-1 e murino, respectivamente.

Figura 18 - Índice de infecção de promastigotas de *L. amazonensis* 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 *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.



Fonte: autoria própria.

Com relação a redução do índice de infecção, os peptídeos Li1 e Li1nc apresentaram redução referente a 47,4% e 20,6% respectivamente, para o modelo THP-1. Já para o modelo murino, Li1 e Li1nc apresentaram redução referente a 41,8% e 23%.

De acordo com o teste estatístico, sugere-se que ambos os peptídeos são efetivos em reduzir o índice de infecção se comparado aos seus respectivos controles. Verificou-se que há diferenças significativas comparando-se o índice de infecção do grupo pré-incubado com Li1 e

o grupo Li1nc para ambos os modelos, logo, pode-se inferir que o peptídeo Li1 possui maior capacidade de redução do índice de infecção se comparado ao Li1nc. Ainda, o teste estatístico apresentou diferenças significativas comparando-se o índice de infecção do grupo Li1 para os modelos THP-1 e murino, indicando que este peptídeo é efetivo em reduzir o índice de infecção para o modelo THP-1, já Li1nc é igualmente eficiente em reduzir o índice de infecção comparando-se os percentuais obtidos para ambos os modelos.

Resumidamente, ficou evidente que a pré-incubação das formas promastigotas infectantes de *L. amazonensis* com os peptídeos tem efeito sobre a taxa e índice de infecção. Especialmente o peptídeo Li1, que apresentou maior capacidade de redução de ambos, taxa e índice, possivelmente associada à sua natureza cíclica. A ciclização reduz a flexibilidade conformacional, o que pode garantir maior estabilidade, resistência a degradação e, além disso, permitir melhor orientação de grupos funcionais e interações específicas com sítios de ligação. Peptídeos cíclicos, além das interações hidrofóbicas e de van der Waals, podem formar múltiplas ligações de hidrogênio e interações polares com proteínas, e interagir com maiores áreas de superfície em comparação com moléculas não cíclicas. Essa capacidade pode resultar em maior afinidade, seletividade e especificidade na ligação a receptores (Conibear *et al.*, 2016; Malde *et al.*, 2019).

Sabemos que a superfície de *Leishmania* é repleta de moléculas, como LPG, PPG, GP63, GP46, entre outras, que desempenham papel fundamental na interação com a célula hospedeira, infecção e curso da doença no hospedeiro mamífero (Brittingham *et al.*, 1999; Lacerda *et al.*, 2012; Winter *et al.*, 1994), a capacidade que esses fosfoglicanos ou proteases possuem de reduzir a taxa e índice de infecção, especialmente o Li1, sugere que os peptídeos podem interagir com sítios de superfície importantes para o sucesso parasitário de *L. amazonensis*.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA

A atividade antipromastigota (Tabela 5) dos peptídeos foi avaliada com o objetivo de determinar se a interação com os mesmos poderia reduzir a viabilidade celular das formas promastigotas em fase logarítmica e estacionária de crescimento, e consequentemente, para a estacionária, influenciar na taxa e índice de infecção.

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

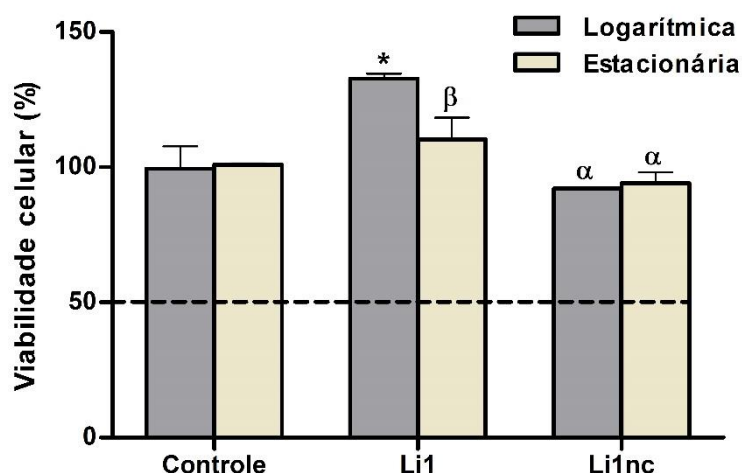
Promastigota	Concentração (mg/mL)	Viabilidade celular (%)	
		Peptídeo Li1 (Média e DP)	Peptídeo Li1nc (Média e DP)
Fase logarítmica	0,5	132,7 ± 1,8	92,1 ± 0,5
	0,7	92,0 ± 9,9	87,0 ± 0,04
	1,0	92,8 ± 2,8	68,0 ± 3,4
Fase estacionária	0,5	110,3 ± 8,0	94,0 ± 4,0
	0,7	98,0 ± 0,2	91,0 ± 7,9
	1,0	66,5 ± 3,5	88,2 ± 7,3

DP=desvio padrão

Fonte: autoria própria.

Na concentração utilizada nos ensaios de infecção (0,5 mg/mL) o percentual de viabilidade celular não é inferior a 100%, tanto para promastigotas em fase logarítmica quanto em fase estacionária, incubadas com o peptídeo Li1. Todavia, Li1nc foi capaz de reduzir a viabilidade celular de formas promastigotas em ambas as fases nas três concentrações empregadas. Os percentuais de viabilidade associados a concentração de 0,5 mg/mL foram avaliados estatisticamente e estão descritos na figura 19.

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; 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 *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.



Fonte: autoria própria.

Há diferenças significativas comparando-se os percentuais de viabilidade para os grupos tratados com Li1nc e Li1, ou seja, pode-se inferir que o peptídeo Li1nc possui maior capacidade de redução da viabilidade celular de ambas as formas se comparado a Li1 e, ainda, essa redução mesmo que diminuta não deve estar associada a redução da taxa e índice de infecção das formas metacíclicas para esse peptídeo, como veremos adiante. Não há diferenças significativas comparando-se a atividade de Li1nc entre os modelos logarítmica e estacionária. Para o peptídeo Li1, evidencia-se que o mesmo possui maior atividade frente às promastigotas em fase estacionária. Ainda, o percentual de viabilidade para ambos os peptídeos frente promastigotas em fase estacionária (fase de crescimento de *Leishmania* spp., composta predominantemente por formas metacíclicas) não foi significativo se comparado ao seu respectivo controle, indicando que não há redução da viabilidade dessas formas.

Os peptídeos não foram submetidos ao software Bioestat para determinação do IC₅₀ pois não inibiram 50% das células viáveis (IC₅₀ > 1000 µg/mL), ou seja, não foram inibitórios nas concentrações avaliadas nessa pesquisa. Todavia o controle positivo anfotericina apresentou IC₅₀ referente a 0,6 µg/mL (± 0,01) para *L. amazonensis* em fase estacionária e 0,4 µg/mL (± 0,09) para a fase logarítmica.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE MACRÓFAGOS MURINOS E THP-1

O objetivo deste ensaio foi avaliar o potencial citotóxico (Tabela 6) dos peptídeos Li1 e Li1nc frente a macrófagos murino e THP-1, com o intuito de verificar se os mesmos podem

têm impacto frente a viabilidade celular e, portanto, influência indireta sob a taxa e índice de infecção.

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

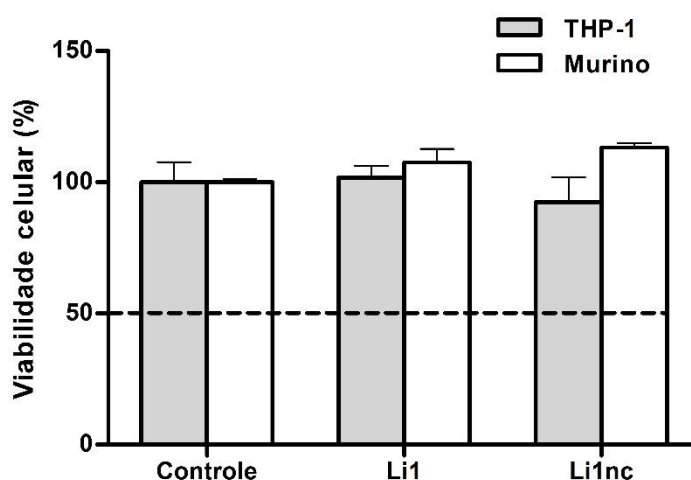
Macrófago	Concentração (mg/mL)	Viabilidade celular (%)	
		Peptídeo Li1 (Média e DP)	Peptídeo Li1nc (Média e DP)
THP-1	0,5	101,8 ± 4,5	92,4 ± 9,5
	0,7	92,1 ± 12,4	83,9 ± 10,6
	1,0	85,6 ± 7,0	79,1 ± 8,0
Murino	0,5	107,5 ± 5,2	113,3 ± 1,6
	0,7	111,2 ± 3,5	117,4 ± 0,7
	1,0	113,4 ± 3,3	117,1 ± 0,4

DP=desvio padrão

Fonte: autoria própria.

Para os grupos murino os percentuais de viabilidade não foram inferiores a 100% nas três concentrações avaliadas, para ambos os peptídeos. Já para o modelo THP-1, houve redução dos percentuais de viabilidade, especialmente para o peptídeo Li1nc. Os percentuais de viabilidade associados a concentração de 0,5 mg/mL foram avaliados estatisticamente e, verificou-se que ambos os peptídeos Li1 e Li1nc não reduzem a viabilidade celular comparando-se aos seus respectivos grupos controle (Figura 20).

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 houveram diferenças significativas para os diferentes grupos analisando-se pelo teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.



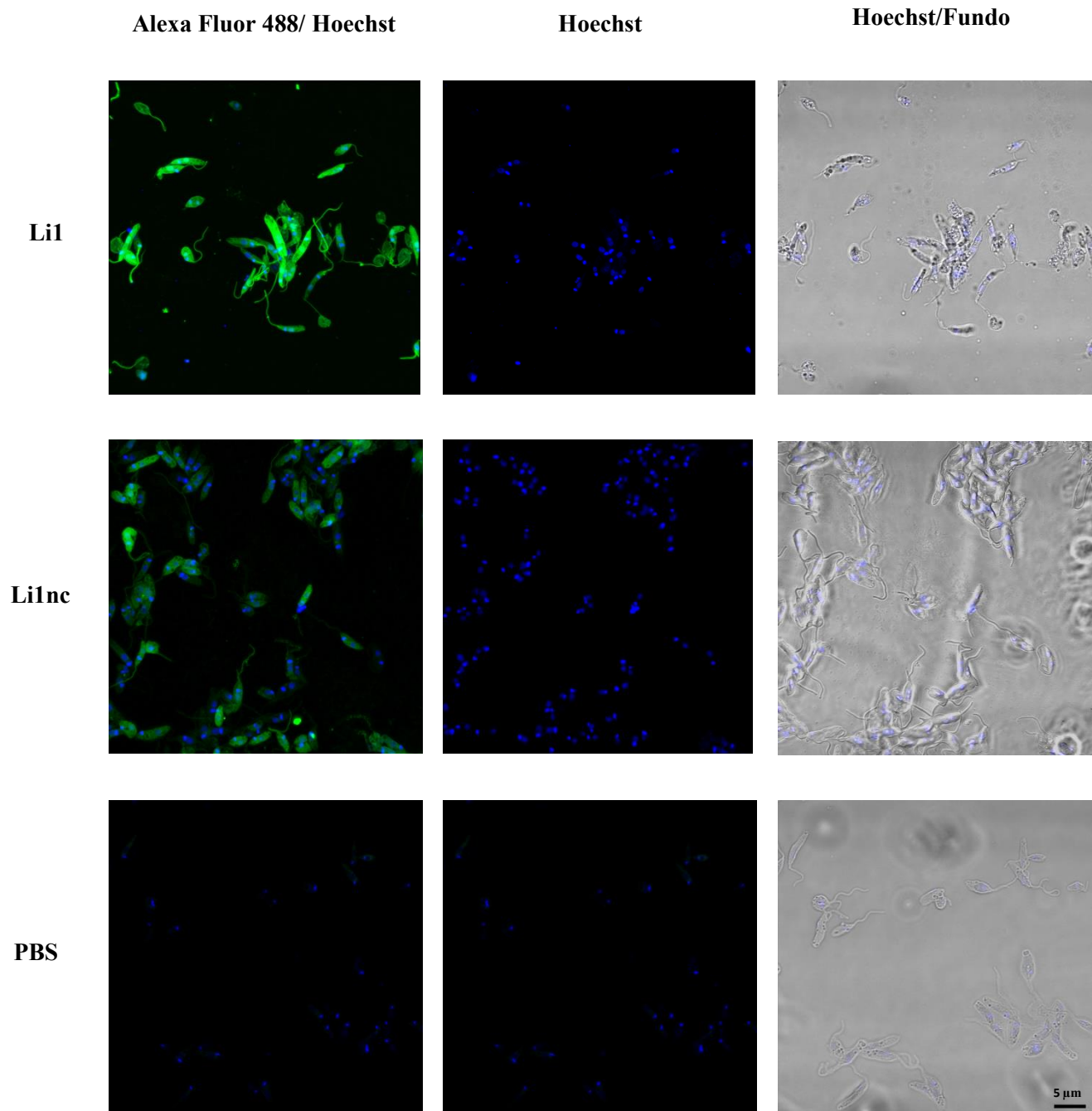
Fonte: autoria própria.

Os peptídeos Li1 e Li1nc não foram submetidos ao software *Bioestat* para determinação do CC_{50} pois não foram citotóxicos para 50% das células viáveis ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) nas concentrações avaliadas nessa pesquisa, todavia o controle positivo anfotericina apresentou CC_{50} referente a $80,1 \mu\text{g/mL}$ ($\pm 7,2$) para macrófago THP-1 e $21,3 \mu\text{g/mL}$ ($\pm 2,3$) para macrófago murino.

5.5 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR

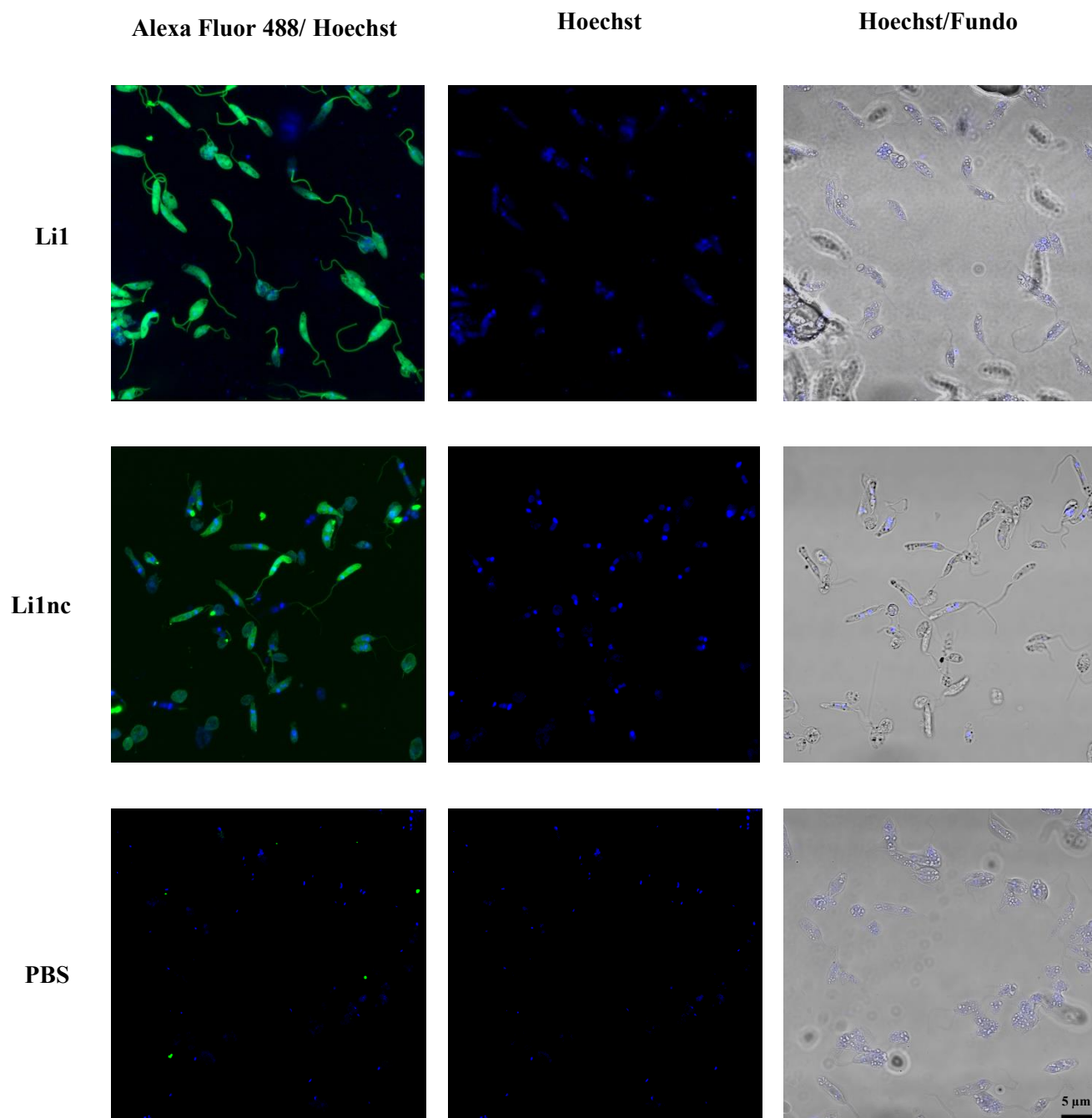
Com o ensaio de localização celular por microscopia confocal verificou-se que ambos os peptídeos, Li1 e Li1nc, interagem com a superfície de formas procíclicas (Figura 21) e metacíclicas de *L. amazonensis* (Figura 22).

Figura 21 - Ensaio de microscopia confocal com formas procíclicas de *L. amazonensis*, com destaque para o sinal acentuada para o corpo celular e flagelo do grupo Li1.



Fonte: autoria própria.

Figura 22 - Ensaio de microscopia confocal com formas metacíclicas de *L. amazonensis*, com destaque para o sinal acentuada para o corpo celular e flagelo do grupo Li1



Fonte: autoria própria.

Os resultados apresentados nas figuras 21 e 22 evidenciam que ambos os peptídeos, Li1 e Li1nc, interagem com a superfície celular de formas procíclicas e metacíclicas de *L. amazonensis*. Como os padrões de ganho e laser foram mantidos fixos em todas as capturas, pode-se inferir que o peptídeo Li1 interage com a superfície celular e flagelo das duas formas,

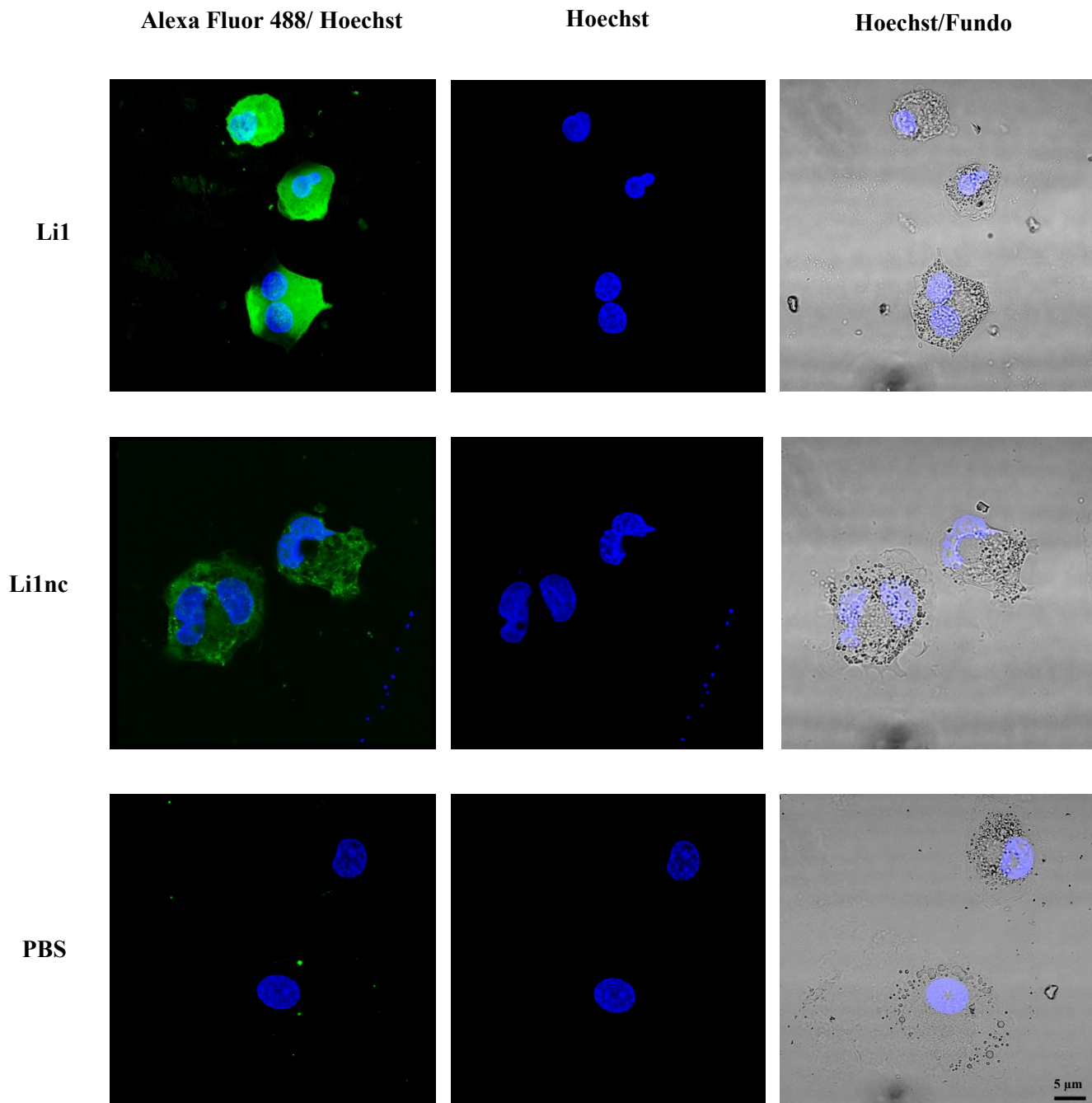
diferentemente do Li1nc que não apresenta, ou apresentou pouca fluorescência para o flagelo, também é visível, pela fluorescência, que para ambas as formas esse peptídeo apresentou menor interação com a superfície celular se comparado a Li1.

O peptídeo Li1 foi selecionado (Verga *et al.*, 2024) por interagir com a superfície de formas metacíclicas. Os resultados aqui descritos sugerem que este peptídeo não interage apenas com as formas infectivas, mas também com formas replicativas (procíclicas), isso sugere que o possível ligante deve ser encontrado em ambas as formas celulares ou que o peptídeo pode interagir com moléculas diferentes nas duas formas. A maioria das moléculas de superfície em *Leishmania*, como glicoconjugados e proteases, está associada à interação com receptores em células hospedeiras. Os níveis de expressão e complexidade dessas moléculas pode variar dependendo da fase de desenvolvimento da forma promastigota, como a GP63 que está expressa 14 vezes mais na fase estacionária em comparação com a fase logarítmica (Kaushal *et al.*, 2023; Yao *et al.*, 2005), ou LPG, que após a metaciclogênese apresenta estrutura complexa em comparação com as formas procíclicas, que possuem uma cadeia menor de dissacarídeos e ausência de arabinose, além de alterações no número de repetições de fosfoglicano (Sacks, 1989; Spath; Beverley, 2001).

Ao considerar a importância do flagelo celular para a interação com células hospedeiras nas horas iniciais da infecção, bem como a consequente internalização das formas infectantes (Zenian *et al.*, 1979; Aikawa *et al.*, 1982), os resultados podem sugerir que a interação do peptídeo Li1 com o flagelo de formas metacíclicas pode estar associada a redução da taxa de infecção para Li1, quando comparado ao Li1nc, que não interage da mesma maneira com o flagelo e, não é efetivo em reduzir a infecção. Paralelamente, quando observamos a fluorescência das populações procíclica e metacíclica, Li1 apresenta homogeneidade na superfície de ambas se comparado a Li1nc. Todavia, acreditamos que novos experimentos podem melhor corroborar essas hipóteses, especialmente ensaios de citometria de fluxo e crio-microscopia eletrônica (Shalev-Benami *et al.*, 2016; Guinet *et al.*, 2000).

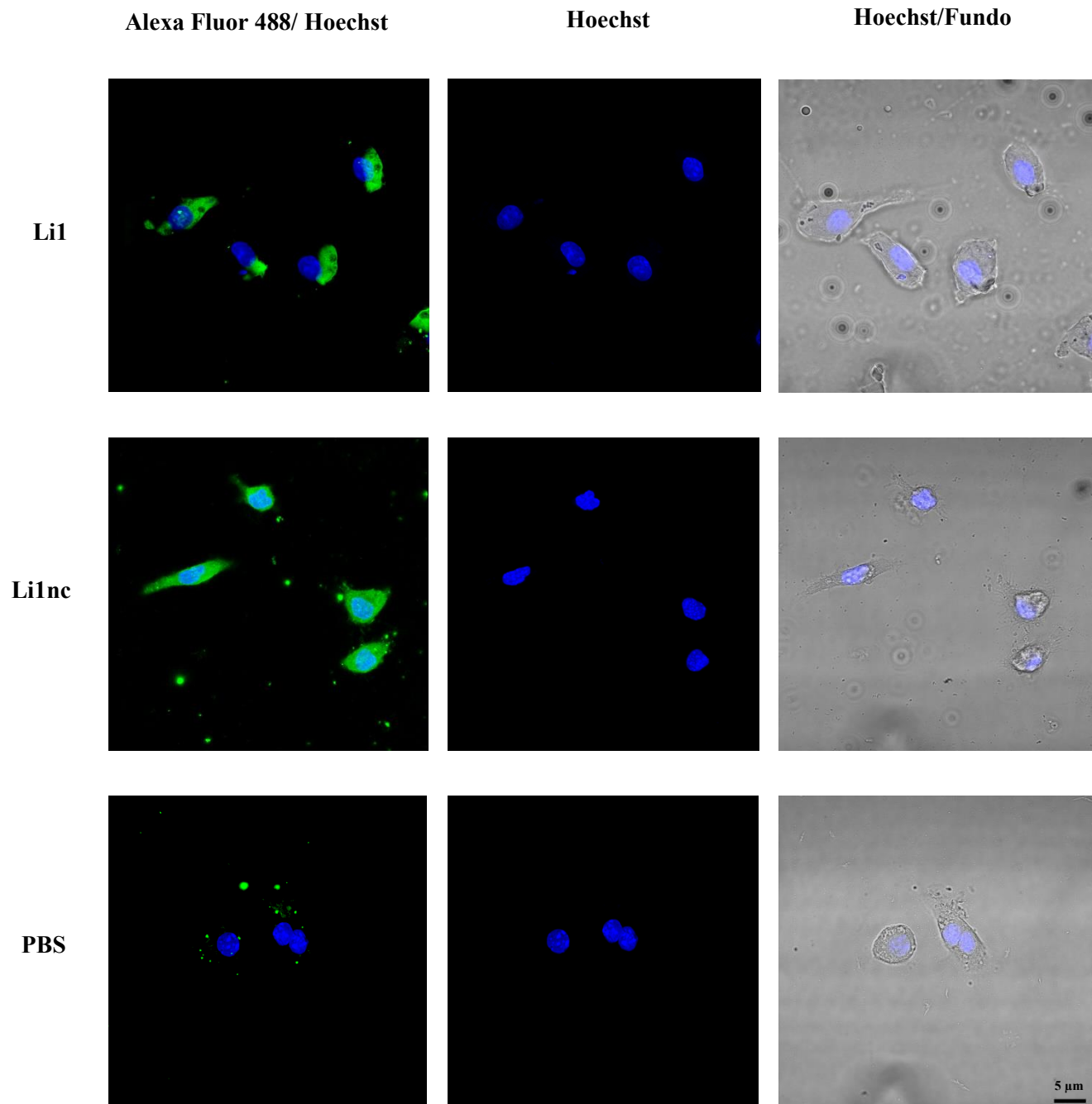
Interessantemente, foram realizados ensaios de microscopia confocal para verificar se os peptídeos interagem com a superfície de macrófagos THP-1 (Figura 23) e murino (Figura 24).

Figura 23 - Ensaio de microscopia confocal com macrófago THP-1, com destaque para o sinal acentuado do grupo Li1



Fonte: autoria própria.

Figura 24 - Ensaio de microscopia confocal com macrófago murino, com destaque para o sinal acentuado do grupo Li1nc



Fonte: autoria própria.

Frente os resultados obtidos, sugere-se que ambos os peptídeos interagem com a superfície celular de macrófagos THP-1 e murino, até então, o trabalho de Verga *et al.*, 2024 havia evidenciado interação para o peptídeo Li1 apenas com a superfície de *Leishmania*, como mencionado anteriormente. Para o modelo THP-1 observa-se um sinal acentuado do peptídeo

Li1 se comparado ao Li1nc. Para o modelo murino ambos os peptídeos apresentam sinal acentuado, embora a fluorescência indique uma distribuição restrita para o peptídeo Li1 se comparado ao Li1nc. Se os peptídeos interagem com os macrófagos, as diferenças no padrão de fluorescência mostrada para os modelos de macrófago murino e THP-1 também podem estar relacionadas aos diferentes índices e taxas de infecção obtidos.

Os resultados obtidos no ensaio confocal sugerem que os peptídeos podem interagir com uma mesma molécula presente na superfície celular dos promastigotas e macrófagos. Muitas moléculas de superfícies são conservadas entre eucariotos, como o caso dos GPIs, glicolipídios de membrana que ancoram covalentemente proteínas, polissacarídeos ou pequenos oligossacarídeos em uma variedade de organismos, incluindo células de mamíferos e protozoários (Macedo *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 1990). Igualmente, pode-se considerar que os peptídeos interagem com diferentes moléculas, ou seja, têm a capacidade de interagir com uma(s) molécula(s) presente na superfície de *Leishmania* e outra(s) presente na superfície dos macrófagos. Mesmo que muitas moléculas sejam conservadas, outras são exclusivas dos tripanossomatídeos, e a interação com a superfície de *L. amazonensis* deve estar relacionada a alguma molécula associada ao processo de infecção, como as já mencionadas GP63, GP46, PPG, LPG, dentre outras (Peters *et al.*, 1997; Spath *et al.*, 2003; Kedzierski *et al.*, 2004; SHIO *et al.* 2015), especialmente ao considerar o impacto dos peptídeos após incubação com as formas metacíclicas, frente a taxa e índice de infecção.

O achado da interação dos peptídeos com a superfície dos macrófagos amplia as perspectivas e faz novos questionamentos. Acreditamos que a extração de proteínas de superfície, seguida pelo ensaio *pull-down* e pela separação das proteínas eluídas por eletroforese bidimensional, bem como a subsequente identificação dos *spots* por espectrometria de massas, pode contribuir para a compreensão da interação dos peptídeos com a superfície de promastigotas e macrófagos. A identificação das moléculas responsáveis pela interação em ambas as superfícies pode fornecer *insights* sobre o papel das mesmas na interação *Leishmania*-hospedeiro e internalização de formas infectantes.

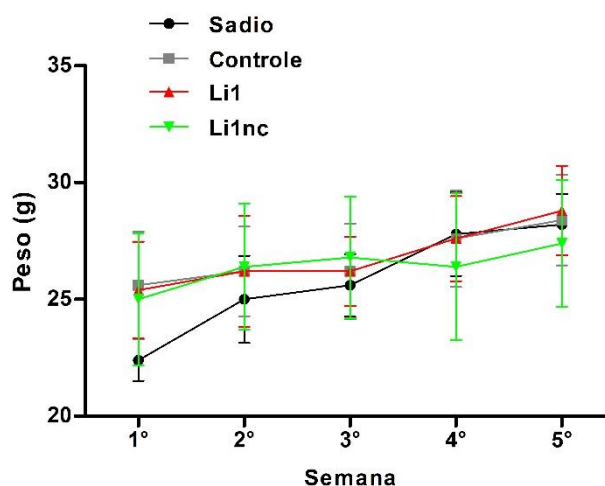
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PEPTÍDEOS FRENTE A CARGA PARASITÁRIA *IN VIVO* E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

5.6.1 Infecção com promastigotas pós-exposição aos peptídeos

Os modelos de infecção por *Leishmania* são bem estabelecidos e para a leishmaniose cutânea o modelo murino é amplamente empregado pois possui alta similaridade à resposta imune e fisiológica humana (Mears *et al.*, 2015). Para a leishmaniose cutânea tradicionalmente emprega-se o modelo de infecção em camundongo BALB/C, como já mencionado em trabalhos anteriores (Velásquez *et al.*, 2017; Sepúlveda *et al.*, 2020; Pacher *et al.*, 2024; Ribeiro *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2020).

Este *in vivo* foi realizado com o objetivo de verificar se a pós-exposição dos promastigotas de *L. amazonensis* aos peptídeos Li1 e Li1nc poderia ter impacto sobre a infecção e carga parasitária *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea, uma vez que a pré-incubação do peptídeo Li1 com promastigotas foi anteriormente avaliada frente *L. infantum* em modelo de leishmaniose visceral e obteve-se redução de mais de 80% da carga parasitária para o baço e fígado (Verga *et al.*, 2024). Resumidamente, para esse experimento camundongos BALB/c foram pesados e divididos randomicamente em quatro grupos: sadio, controle, infectado com promastigotas pós-exposição a Li1, infectados com promastigotas pós-exposição a Li1nc. Nos grupos infectados promastigotas foram inoculadas no dorso da pata traseira direita. Os animais foram acompanhados quanto ao peso (Figura 25) e o desenvolvimento das lesões foi avaliado por meio da medida da espessura da pata ao longo de 30 dias, uma vez por semana sempre no mesmo dia.

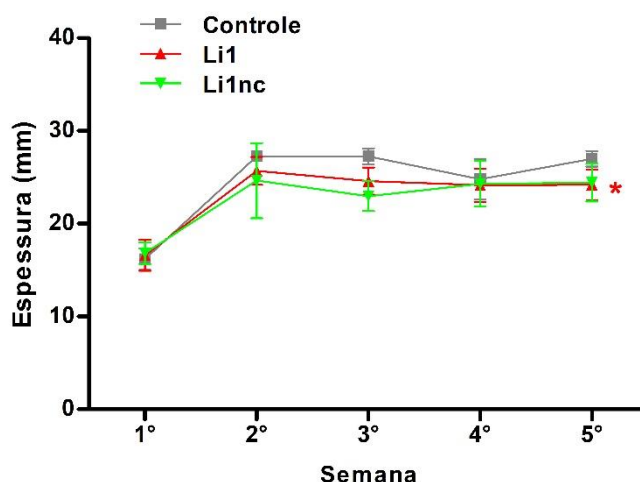
Figura 25 - Peso (g) dos animais sadios, controle, infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1 e infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo Li1nc. Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.



Fonte: autoria própria.

O peso relacionado a primeira semana corresponde a medida realizada logo após a chegada dos animais. A infecção foi realizada na segunda semana e os animais foram acompanhados até a quinta semana. No final do experimento, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o peso dos animais nos diferentes grupos. Apesar das diferenças não significativas observou-se um ganho de peso para todos os grupos após o início do experimento. Interessantemente, houve diferença significativa comparando-se a espessura das patas dos grupos que receberam promastigotas pré incubadas com o peptídeo Li1 se comparado ao grupo controle (Figura 26).

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 *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

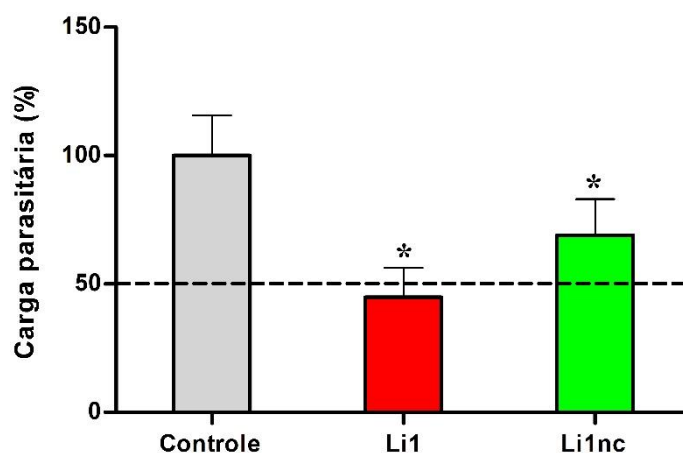


Fonte: autoria própria.

Vale ressaltar que após a infecção todos os grupos apresentaram um aumento na espessura das patas. Na literatura o modelo de infecção por *Leishmania* tem sido explorado em experimentos com diferentes tempos para a infecção e tratamento, como evidenciado nos trabalhos de De Lima *et al.*, 2020, Khanra *et al.*, 2020, Mutiso *et al.*, 2011, Velásquez *et al.*, 2017 e Moreira *et al.*, 2022, além disso, fatores como virulência e susceptibilidade dos animais devem estar associados a resposta ao parasita.

Após 30 dias a carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985; ALMEIDA 2017). O grupo Li1 apresentou carga parasitária (Figura 27) referente a 44,8% ($\pm 11,5$) e o grupo Li1nc referente a 68,9% ($\pm 14,1$) reduzindo 55,2% e 31,1% da carga parasitária, respectivamente.

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 *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.



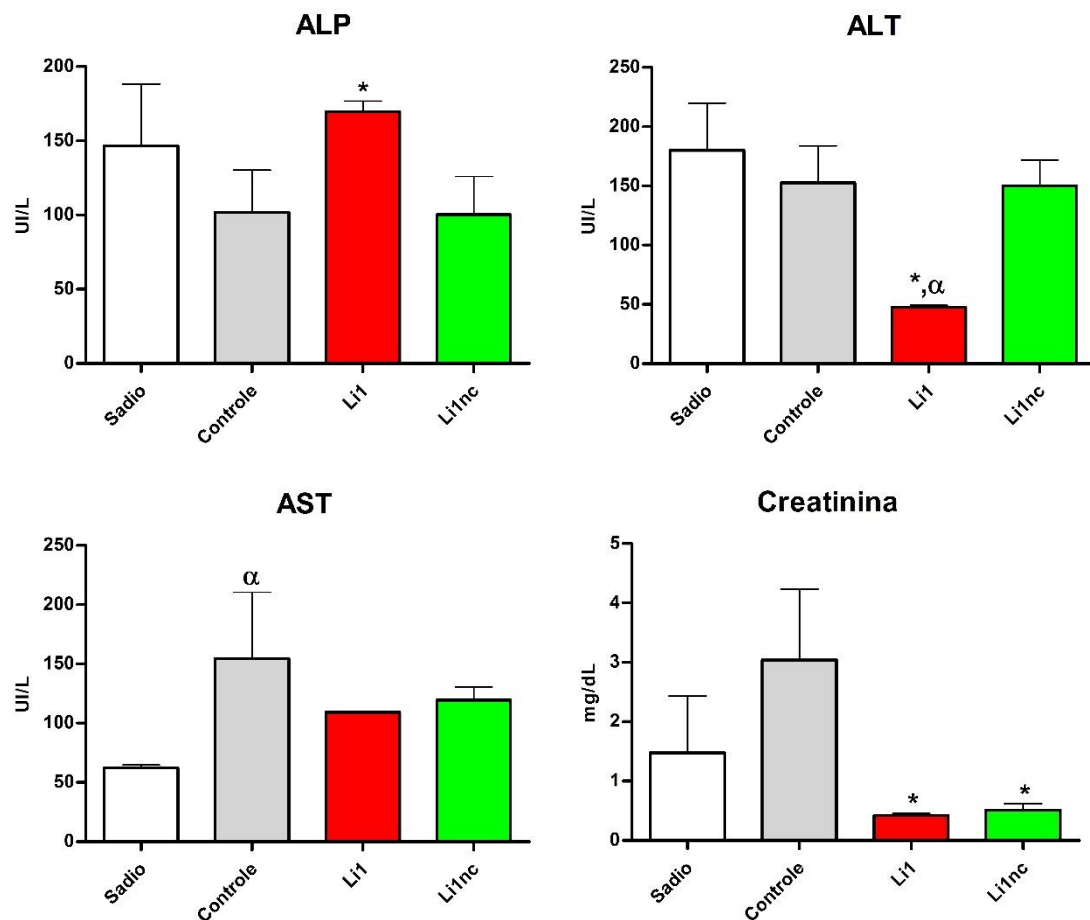
Fonte: autoria própria.

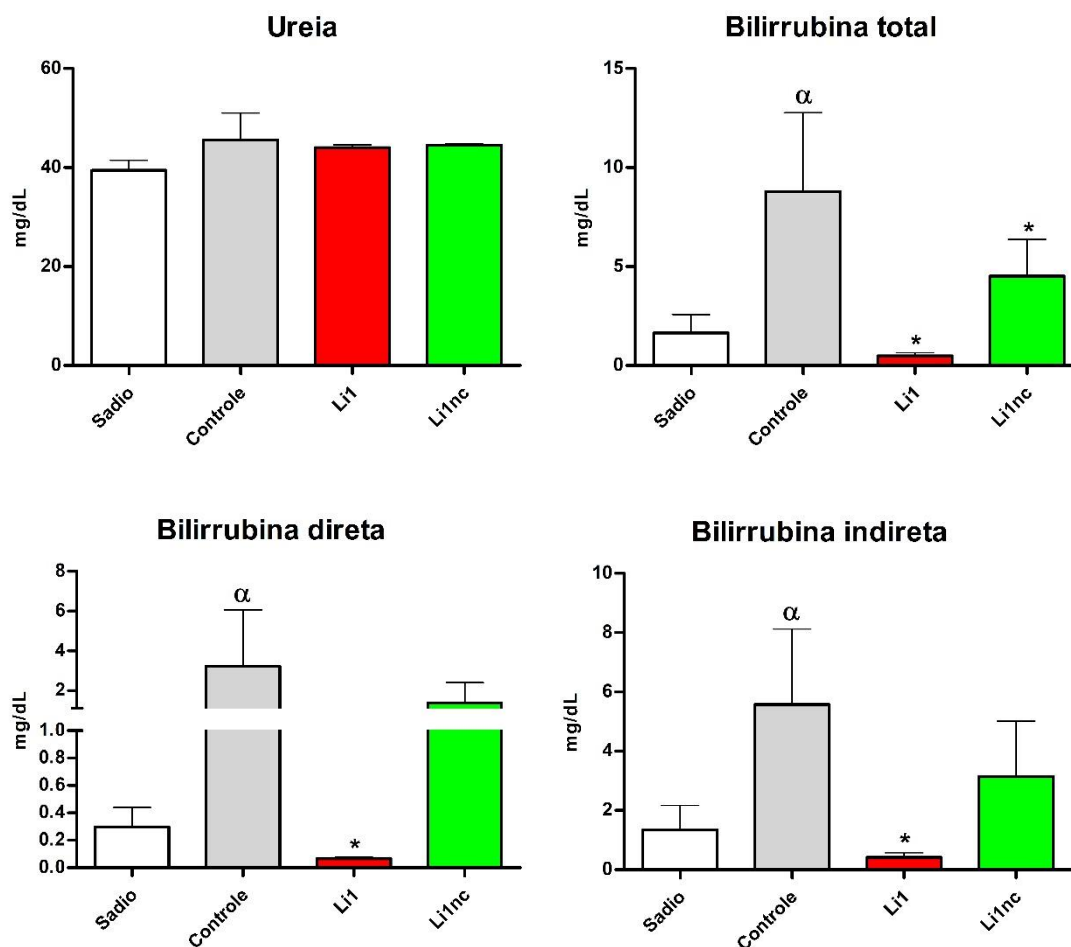
A análise estatística demonstrou diferenças significativas comparando-se os grupos que receberam promastigotas previamente incubados com os peptídeos ao grupo controle. Esses resultados evidenciam que a interação dos peptídeos com a superfície de formas promastigotas reduz a taxa de internalização *in vivo* e a carga parasitária, corroborando os resultados obtidos *in vitro* e os achados descrito para o peptídeo Li1 por Verga *et al.*, 2024.

Ainda, Verga *et al.* 2024 evidenciou anteriormente que a ordem dos resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica é um fator importante, pois a mudança na ordem dos resíduos, com exceção das cisteína, implicava em perda de interação com a superfície celular e ineficácia *in vitro* e *in vivo*. Aqui verificamos que o peptídeo Li1 é efetivo em reduzir a taxa de infecção *in vivo*, nesse ensaio verificamos que o peptídeo linear Li1nc também tem efeito sobre a carga parasitária, porém com atividade inferior se comparado a Li1. Esses resultados associados aos demais achados dessa pesquisa, como os experimentos de microscopia confocal e infecção *in vitro*, reforçam que esses peptídeos interagem com moléculas de superfície presente em *Leishmania* que são importantes para a internalização das formas promastigotas infectantes. Além disso, evidencia-se novamente que a ciclização é um fator importante para a atividade desses peptídeos, pois embora Li1nc mantenha a atividade seu desempenho é inferior se comparado ao Li1.

Também foram realizadas análises bioquímicas para a avaliação dos marcadores hepáticos AST, ALT, ALP e bilirrubinas e renais, creatinina e ureia, os resultados estão descritos na figura 28.

Figura 28 - Níveis plasmáticos de biomarcadores de função hepática e renal em camundongos BALB/c sadios, controle, infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo L1l e infectados com promastigotas pós-exposição ao peptídeo L1lnc. 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 *one-way* seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.





Fonte: autoria própria.

Os grupos Li1 e Li1nc não apresentaram diferenças significativas com o grupo sadio para os biomarcadores hepáticos ALT, AST, bilirrubinas e marcadores renais. Para o peptídeo Li1 foram observadas alterações significativas se comparado ao grupo controle reduzindo os níveis de ALT, creatina e bilirrubinas, já para o peptídeo Li1nc as reduções foram relacionadas aos níveis de creatinina e bilirrubina total.

Com relação a atividade hepática, ALT, ASP e ALP são biomarcadores importantes para a avaliação da integridade e função do hepatócito. Em uma lesão há aumento dos níveis de AST/ALT em comparação com ALP, além disso, aumento dos níveis de AST e ALT são considerados normais em indivíduos adoecidos (Burtis; Ashwood, 2001). Foram encontrados níveis aumentados de AST para o grupo controle se comparado ao grupo sadio, enquanto ALT e ALP não apresentaram diferenças significativas. Interessantemente, os níveis de ALT/AST foram superiores a ALP indicando uma possível lesão hepatocelular no grupo controle. Diferentemente, os grupos Li1 e Li1nc apresentaram valores mais baixos de ALT/AST se

comparado ao grupo controle, indicando que a administração dos peptídeos com as promastigotas preveniu o dano hepático.

Como podemos verificar na figura 28, as bilirrubinas são outros marcadores hepáticos alterados durante a infecção por *L. amazonensis*, como observado anteriormente nos trabalhos de Velásquez 2017 e Moreira *et al.*, 2022. A leishmaniose pode causar o aumento dos níveis de bilirrubina total e especialmente direta causando obstrução do fluxo biliar e disfunção hepatocelular que compromete a conjugação e excreção de bilirrubina (Godoy; Salles 2001; Burtis; Ashwood, 2001). As bilirrubinas total, direta e indireta para os grupos infectados apresentaram valores elevados significativos se comparado ao seu respectivo grupo sadio. O peptídeo Li1 foi capaz de reduzir os níveis de bilirrubinas a níveis não significativos se comparado ao grupo sadio, indicando prevenção ao dano hepatocelular, também para esse biomarcador.

Considerando o possível acometimento dos rins durante a infecção por *Leishmania*, faz-se necessário o acompanhamento dos biomarcadores renais, creatinina e ureia. Altos níveis de creatinina sérica podem ser encontrados em indivíduos com leishmaniose (Salgado Filho *et al.*, 2003; Rigo *et al.*, 2009). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os níveis de ureia, que foram elevados para todos os grupos avaliados. Para a creatinina os grupos Li1 e Li1nc apresentaram diferenças significativas se comparado ao grupo controle que apresentou elevados níveis de creatinina, diferentemente os peptídeos apresentaram baixos níveis desse biomarcador e, além disso, não significativos se comparado ao grupo sadio, ou seja, a administração dos peptídeos junto das promastigotas preveniu o dano renal.

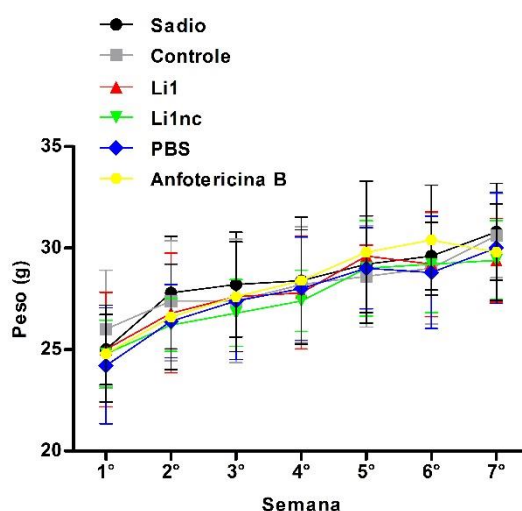
É importante enfatizar que os peptídeos para a maioria dos marcadores apresentaram níveis não significativos se comparado ao grupo sadio, especialmente o peptídeo Li1, além de prevenir danos hepáticos e renais, possivelmente associado a redução da internalização das formas infectantes e carga parasitária, o que impediu a progressão da doença.

5.6.1 Infecção e posterior tratamento com os peptídeos

Este *in vivo* foi realizado com o objetivo de verificar se após a infecção o tratamento com os peptídeos Li1 e Li1nc poderia ter efeito sob a carga parasitária. Para esse experimento camundongos BALB/c foram pesados e divididos randomicamente em seis grupos: sadio, controle, infectado tratado com o peptídeo Li1, infectado tratado com o peptídeo Li1nc, infectado tratado com o veículo PBS e infectado tratado com anfotericina B. Os animais foram

acompanhados quanto ao peso (Figura 29) e o desenvolvimento das lesões foi avaliado por meio da medida da espessura da pata ao longo de 45 dias, uma vez por semana sempre no mesmo dia.

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.

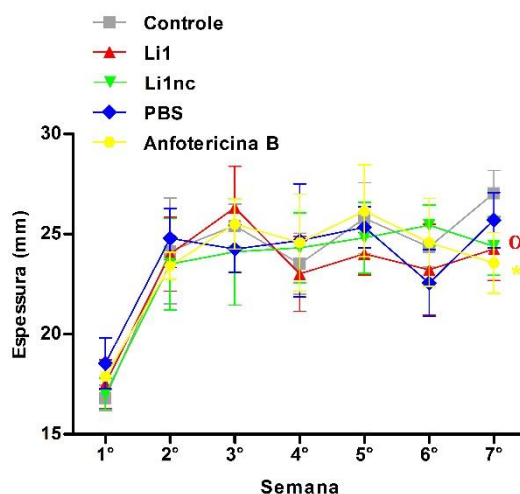


Fonte: autoria própria.

O peso relacionado à primeira semana corresponde a medida realizada logo após a chegada dos animais. A infecção foi realizada na segunda semana e os animais foram acompanhados até a sétima semana. O tratamento com os peptídeos, PBS e anfotericina B foi realizado entre a sexta e sétima semana. No final do experimento, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o peso dos animais nos diferentes grupos. Apesar das diferenças não significativas observou-se um ganho de peso para todos os grupos após o início do experimento. Interessantemente, houve diferenças significativas comparando-se a espessura das patas dos grupos tratados A9 e anfotericina ao grupo controle, após uma semana de tratamento (Figura 30).

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.

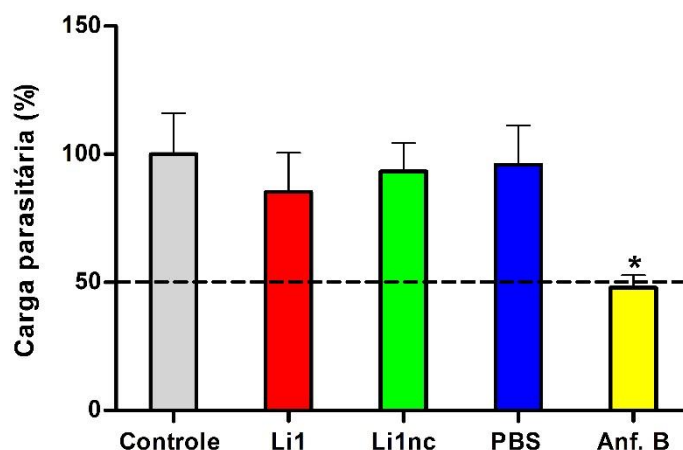


Fonte: autoria própria.

É possível observar que a partir da infecção (segunda semana) há um aumento da espessura das patas em todos os grupos avaliados. Durante os 45 dias de experimentação não houve a formação de lesões evidentes, o que está possivelmente associado ao período mais curto da experimentação, diferentemente do observado no trabalho de Velásquez *et al.*, 2017 após dois meses de infecção.

No término do tratamento a carga parasitária (Figura 31) foi determinada pelo método de diluição limitante. O grupo Li1 apresentou carga parasitária referente a 85,3% ($\pm 15,2$) e o grupo Li1nc referente a 93,3% ($\pm 11,0$), PBS 95,9% ($\pm 15,3$) e anfotericina B 47,9% ($\pm 4,9$). Não foram encontradas diferenças significativas para a carga parasitária dos grupos Li1, Li1nc e PBS se comparado ao grupo controle. A anfotericina apresentou diferenças estatisticamente significativas se comparado ao grupo controle reduzindo 52,1% da carga parasitária.

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.



Fonte: autoria própria.

Os resultados não significativos mostram que os peptídeos administrados como tratamento não têm impacto sobre a carga parasitária. Esse ensaio foi proposto com o objetivo de verificar se os peptídeos poderiam interagir com a superfície das amastigotas após o estabelecimento do ciclo intracelular e reduzir a reinternalização dos mesmos.

Esses resultados propõem novos questionamentos. A molécula de superfície que interage com as promastigotas e, cuja interação impacta diretamente a carga parasitária, pode estar ausente nos amastigotas, ser expressa em níveis reduzidos, apresentar isoformas distintas ou ainda exibir modificações químicas em domínios cruciais para a ligação com os peptídeos. Essa hipótese é compatível com relatos anteriores sobre a GP63, cuja estrutura e expressão variam entre as diferentes formas de *Leishmania* (Hsiao 2008; Yao *et al.*, 2005). Outro exemplo é a HASPB (Proteína B Hidrofílica de Superfície Acilada), poderiam os peptídeos interagir com essa molécula, que é altamente expressa na superfície celular das formas metacíclicas e associada a internalização em macrófagos. Interessantemente, após a infecção sua expressão passa a ser retida internamente, não estando associada à superfície das formas amastigotas (Maclean *et al.*, 2012).

Ainda, poderiam os peptídeos interagir com estruturas presente em promastigotas e que são imprescindíveis para interação com o hospedeiro e para infecção, como o flagelo, mas que em amastigotas não estão diretamente associadas a reinternalização dessa forma. O flagelo, bem caracterizado nos ensaios de microscopia confocal, interage com ambos os peptídeos (principalmente Li1) e ambas as moléculas reduzem a internalização das formas promastigotas *in vitro* e *in vivo*. Interessantemente, na forma amastigota o flagelo não possui papel ativo na

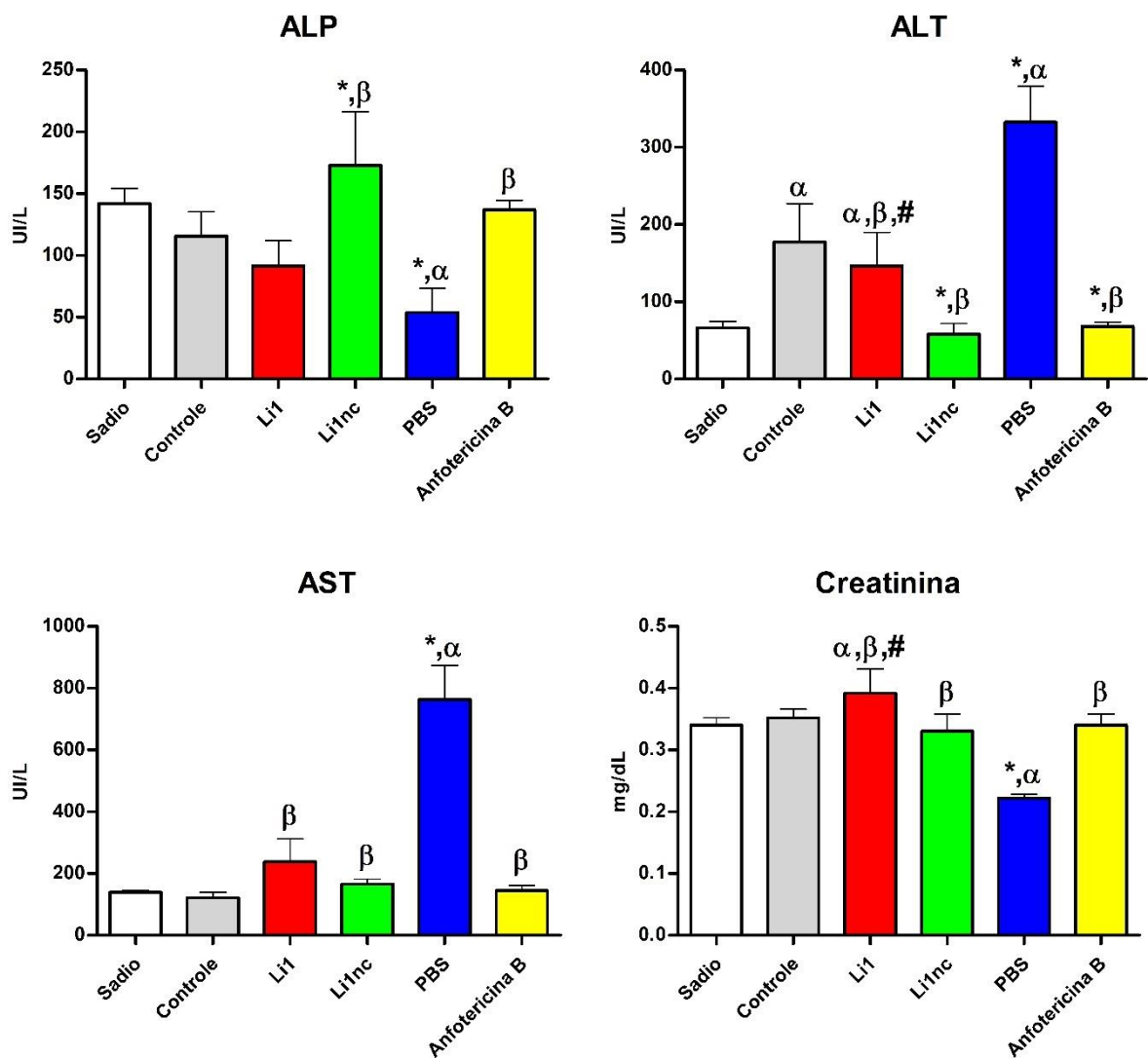
infecção, é residual e não motil. Estudos recentes evidenciam que a membrana flagelar desempenha uma infinidade de funções na interface parasita-hospedeiro, como: fixação a tecidos dentro de insetos vetores, interações com organelas intracelulares de células vertebradas, transações entre flagelos de diferentes parasitas, emergência de nanotubos e exossomos do parasita direcionados a alvos hospedeiros ou microbianos, evasão imunológica e detecção do meio extracelular, entre outras (Kelly *et al.* 2020).

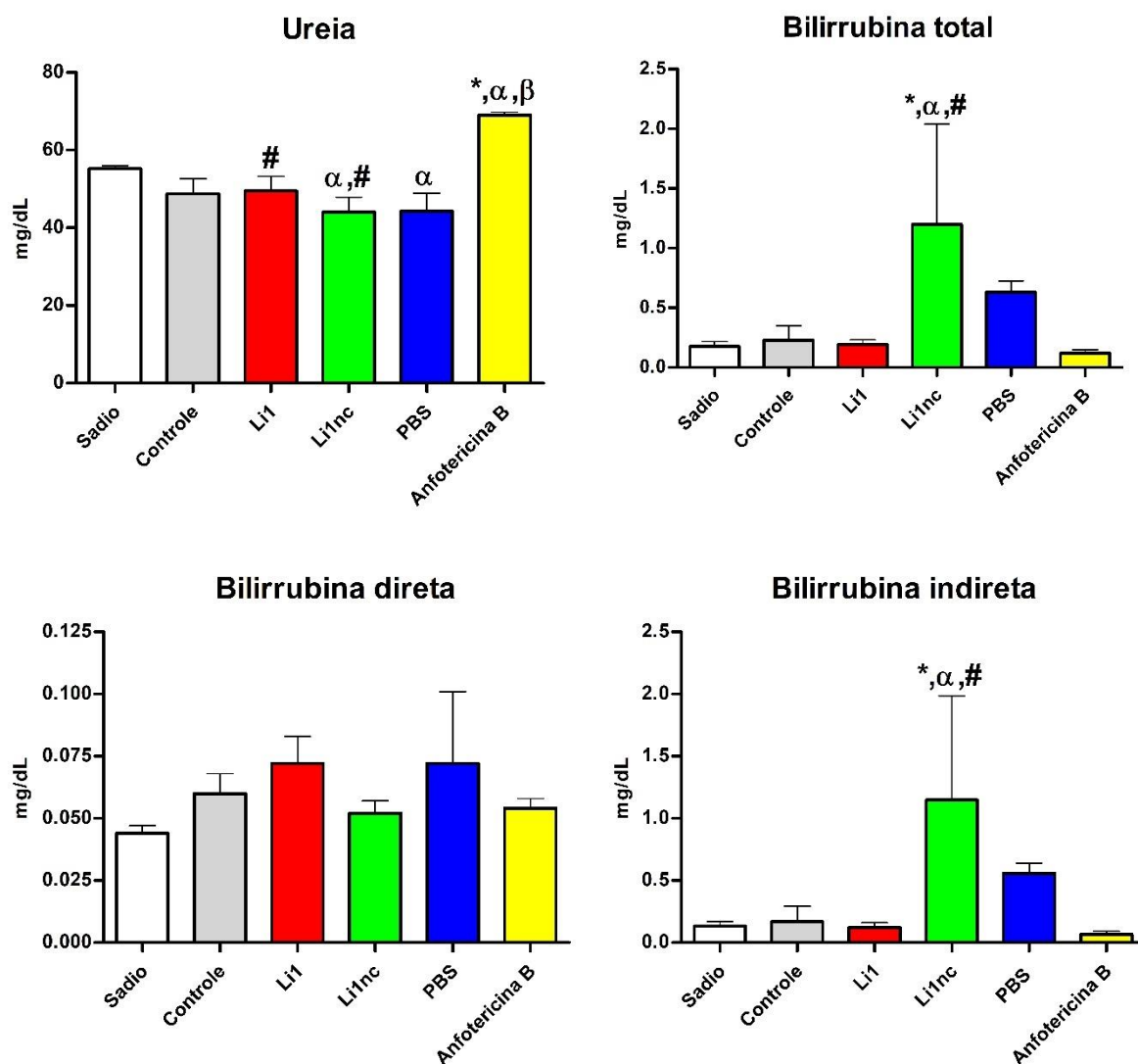
Contudo, a ausência de ensaios de localização celular com a forma amastigota, neste estudo, torna a hipótese associada ao flagelo e as moléculas de superfície limitada, sendo necessário a realização de ensaios, como microscopia de fluorescência, microscopia confocal ou citometria, para verificar se os peptídeos podem interagir com a superfície da forma amastigota. Considerando outro método para avaliar o impacto dos peptídeos frente a infecção, após a confirmação da interação com amastigotas, uma possibilidade seria a realização de ensaios de infecção com amastigotas axênicos pós-incubação com os peptídeos, assim como o ensaio realizado com promastigotas nessa pesquisa. Ensaios de infecção com promastigotas axênicos são amplamente realizados, esses amastigotas apresentam elevada infectividade, alta capacidade para estimulação de células dendríticas e produção de IL-12 (Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2008; Dias-Lopes *et al.*, 2021). Interessantemente, outra opção para continuar as investigações sobre a interação dos peptídeos com a superfície celular seria o *Western blotting* ou proteômica comparativa, com essas técnicas pode-se avaliar a expressão de alvos candidatos (como a GP63, LPG, âncoras de GPI, entre outros) em promastigotas e amastigotas.

A estabilidade das moléculas também pode estar associada a não eficácia dos mesmos. Os peptídeos podem ser susceptíveis a proteases do hospedeiro, o que resulta na degradação das moléculas e na não interação com a superfície das formas amastigotas. Para avaliar a estabilidade das moléculas poderiam ser realizados ensaios de estabilidade em soro humano, com avaliação por CLAE-FR/EM para confirmação da presença do material de interesse em diferentes tempos e variações de temperatura. Outra possibilidade seria a realização de ensaios de farmacocinética e biodisponibilidade, pois a rápida depuração ou distribuição inadequadas poderiam estar associadas a ineficiência dos peptídeos na administração enquanto tratamento. Para isso, camundongos BALB/c tratados com os peptídeos teriam amostras de sangue coletadas em diferentes tempos, 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h e 24 h, após a administração. Análises posteriores poderiam ser realizadas por CLAE-FR/EM para confirmação da presença e quantificação dos peptídeos (Bao *et al.*, 2020).

Assim como no primeiro *in vivo*, neste experimento também foram realizadas análises bioquímicas para a avaliação dos marcadores hepáticos AST, ALT, ALP, BT (BD e BI) e renais creatinina e ureia, os resultados estão descritos na figura 32.

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.





Fonte: autoria própria.

As análises estatísticas mostram que o tratamento com Li1 não reduziu significativamente os níveis dos biomarcadores se comparado ao grupo controle. Para esse peptídeo foi encontrado aumento dos níveis de AST e ALT, além disso, os níveis da relação AST/ALT foram maiores que ALP, o que reforça uma possível alteração hepática. A creatinina também apresentou níveis elevados significativos para essa molécula se comparado ao grupo sadio e infectado, além disso, a diferença significativa se comparado ao nível baixo desse marcador para o veículo PBS mostra que essa alteração não foi causada pelo mesmo, indicando que a dose do peptídeo neste experimento pode provocar comprometimento renal. A bilirrubina direta, embora levemente alterada, não apresentou diferenças significativas.

O tratamento com Li1nc reduziu significativamente o nível do biomarcador ALT se comparado ao grupo controle, entretanto, apresentou níveis elevados de bilirrubina total e

indireta que pode indicar possível obstrução do fluxo biliar e disfunção hepatocelular, todavia, para esse marcador Li1nc não apresentou diferenças significativas com o grupo PBS, que também apresentou níveis elevados de bilirrubinas, podendo o veículo estar associado a essa alteração.

O aumento dos níveis desses marcadores é esperado na infecção por *L. amazonensis*, como descrito anteriormente por Velásquez 2017 e Moreira *et al.*, 2022. Para o grupo PBS os marcadores renais não foram alterados. A anfotericina B apresentou níveis elevados significativos de ureia se comparado aos grupos sadio, controle e PBS, o que está associado a um possível comprometimento renal. Para os demais biomarcadores a anfotericina B apresentou níveis não significativos se comparado aos grupos sadio, interessante, também reduziu os níveis de ALT se comparado ao grupo controle e PBS, prevenindo o dano hepático, como relatado por Velásquez *et al.*, 2017.

É importante mencionar, que o sangue coletado dos grupos controle, Li1 e principalmente Li1nc e PBS apresentaram soro hemolisado em muitas amostras, o que pode resultar em alterações nos níveis dos biomarcadores hepáticos e renais, principalmente bilirrubinas e as enzimas hepáticas ALT e AST.

Os resultados do experimento *in vivo*, infecção com promastigotas pós-exposição aos peptídeos e, infecção e posterior tratamento com os peptídeos, evidenciam que o sucesso no uso dessas moléculas deve estar associado ao momento de aplicação, ou seja, no emprego dos peptídeos antes da infecção, o que sugere um possível uso profilático, especialmente para o peptídeo Li1.

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.
- DEHGHANI, 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 Vénéréologie**, 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*. **Bioinformation**, 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.