



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Doutorado - Programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Natália Caroline Costa Coelho

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

Araraquara

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Doutorado - programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Natália Caroline Costa Coelho

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

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara

2022

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: NATÁLIA CAROLINE COSTA COELHO

ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

COORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

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

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

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

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

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

Araraquara, 18 de outubro de 2022

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

Agradecimento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Também agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro e ao CNPQ

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

Resumo

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

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

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The control of leishmaniasis depends on chemotherapeutic intervention, with emphasis on amphotericin B, object of study in this work. Amphotericin B is toxic and causes severe side effects in patients. Within this scenario, part of our objectives is the modification of amphotericin B via coupling of antimicrobial peptides, in a process called therapeutic bioconjugation. In this study, leishmanicidal peptides of the temporine and histatin classes were explored for the development of new bioconjugates. For this, TSHa ($IC_{50} \text{ama} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 200$), TSHd ($IC_{50} \text{ama} = 7.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS = 14$) and Hist 5 ($IC_{50} \text{ama} = 8 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 125$) peptides were functionalized to amphotericin B ($IC_{50} \text{ama} = 0.63 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS = 38$), generating Anf B*-TSHa derivatives ($IC_{50} \text{ama} = 1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 645$), Anf B (RC)-TSHa ($IC_{50} \text{ama} = 0.31 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 3225$), Anf B*-TSHd ($IC_{50} \text{ama} = 0.95 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 1052$), Anf B-Hist 5 ($IC_{50} \text{ama} = 0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 2500$) were synthesized with a high degree of purity. Among the main findings, the high selectivity (IS) of the bioconjugates stands out, which are at least 600 times more selective for the parasite when compared to the host cell, which can be attributed to a possible action of the temporal peptides TSHa and TSHd in the parasite membrane, either by pore formation or by detergent-like interactions (carpet like), which may be facilitating the permeation of amphotericin B in macrophages, promoting its anti-amastigote activity. Differently for the bioconjugate Anf B-Hist5, it was verified that there was less permeabilization of these in the membrane of the parasite, this was observed through the flow cytometry and fluorescence microscopy assays. Confocal fluorescence microscopy data indicated a better compartmentalization of the peptide Anf B-Hist 5 in the mitochondria, suggesting an inherent dual mechanism of action of each molecule associated with the biological activity characterized here: the action of amphotericin B on the parasite membrane, facilitating the entry of the parasite. Anf B-Hist 5 peptide and thus its activity on mitochondria. Additionally, in order to synthesize new leishmanicidal peptides, a dimer composed of TSHa peptides, called (TSHa)₂K ($IC_{50} \text{ama} = 0.58 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $IS > 1724$) was designed and synthesized, whose potency and selectivity increased by about ten times that of the TSHa peptide. In parallel, from molecular modeling studies to obtain the structure of the mitochondrial calcium channel MCU from *Leishmania*, molecular docking studies were carried out to design novel peptides capable of selectively interfering with the influx of calcium into the parasite's mitochondria based on the interaction of these with the DIME selectivity filter region, which should be synthesized and validated in studies on the *Leishmania* parasite. With the present research we can conclude that bioconjugation with Anf B and the rational design of peptides are interesting strategies for the development of new molecules for the treatment of leishmaniasis, focusing on increasing selectivity and decreasing toxicity.

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

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ácido trifluoracético: TFA

Anfotericina B incompleta: Anf B*

Anfotericina B: Anf B

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

Carboxifluoresceína:CF

Cell and Tissue Adhesive: Cell-Tak

Colesterol: COL

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: CLAE

Dicroísmo circular: CD

Dímero TSHa: (TSHa)₂K

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

Fosfatidilserina: POPS

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

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

Histatina 5: Hist 5

Índice de seletividade: IS

Iodeto de propídio: PI

Lisofosfatidilcolina: LPC

Membrana mitocondrial interna: IMM

Mitochondrial Calcium Uniporter: MCU

PAM: Peptídeo antimicrobiano

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

Protein Data Bank: PDB

Reação colateral: RC

Tampão fosfato salino: PBS

Triisopropilsilano: TIS

2,2,2-Trifluoroetanol: TFE

Vesículas unilamelares :LUVs

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo biológico do parasita <i>Leishmania</i>	21
Figura 2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	25
Figura 3. Esquema da bioconjugação dos peptídeos deste trabalho com a Anf B	28
Figura 4. Estrutura do complexo MCU em seres humanos e em tripanossomatídeos	33
Figura 5. Padrão de bandas características para determinação de estruturas secundárias de peptídeos antimicrobianos	38
Figura 6. Esquema para a formação das vesículas unilamelares	43
Figura 7. Espectro de massas referente ao peptídeo TSHa conjugado à Anf B	48
Figura 8. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B*-TSHa	49
Figura 9. Perfil cromatográfico do peptídeo puro Anf B*-TSHa	50
Figura 10. Análise de CLAE para avaliação do processo de acoplamento da anfotericina B ao peptídeo TSHa em pequena escala do qual foi utilizado o agente ativador HATU e o acoplador DIPEA	51
Figura 11. Análise de espectrometria de massas do acoplamento em solução de TSHa e Anf B	52
Figura 12. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B-TSHa com o agente acoplador HATU e o ativador DIPEA	52
Figura 13. Perfil do peptídeo puro Anf B (RC) -TSHa a partir do aumento de escala com os agentes ativadores DIPEA e o agente acoplador HATU	53
Figura 14. Espectro de massas do peptídeo Anf B (RC)-TSHa resultante da reação de acoplamento com agente ativador HATU e o acoplador DIPEA	54
Figura 15. Espectro de massas do peptídeo Anf B-TSHa resultante da estratégia de acoplamento com o agente acoplador BOP e o ativador DIPEA	55
Figura 16. Perfil cromatográfico do peptídeo Anf B (completo)-TSHA por CLAE modo analítico	55
Figura 17. Espectro de massas referente ao Dímero (TSHa) ₂ -K	57
Figura 18. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Dímero (TSHa) ₂ -K	57
Figura 19. Perfil do peptídeo puro Dímero (TSHa) ₂ -K	58
Figura 20. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B*-TSHd	59
Figura 21. Perfil cromatográfico do peptídeo puro Anf B*-TSHd	59

Figura 22. Espectro de massas do peptídeo conjugado Anf B*-TSHd	60
Figura 23. Espectro de massas do peptídeo (Anf B) ₂ -TSHd	61
Figura 24. Perfil cromatográfico do peptídeo (Anf B) ₂ -TSHd	59
Figura 25. Perfil do peptídeo puro Anf B-Hist 5	62
Figura 26. Espectro de massas referente ao peptídeo Anf B-Hist 5	63
Figura 27. Espectros de CD do peptídeo TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	66
Figura 28. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	67
Figura 29. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	67
Figura 30. Espectros de CD do peptídeo dimerico (TSHa) ₂ K em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	68
Figura 31. Espectros de CD da Anf B em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	68
Figura 32. Espectros de CD do peptídeo TSHd em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	69
Figura 33. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHd f B em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	70
Figura 34. Espectros de CD do peptídeo Hist 5 em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	71
Figura 35. Espectros de CD do peptídeo Anf B-Hist 5 em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L ⁻¹ e em solução de TFE 60%	71
Figura 36. Efeito <i>in vitro</i> Anf B*-TSHa X Anf B (RC)- TSHa X (TSHa) ₂ K X TSHa X Anf B	77
Figura 37. Efeito <i>in vitro</i> Anf B-Hist 5 X Hist 5 X Anf B e Anf B*-TSHd xTSHd em amastigotas intracelulares de <i>L. mexicana</i>	78
Figura 38. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos TSHa e Anf B*-TSHa em vesículas de POPC:COL (5:1)	78
Figura 39. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos TSHa e Anf B*-TSHa em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3)	82

Figura 40. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Anf B (RC)-TSHa em vesículas de POPC:COL (5:1) e POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3)_____ 84

Figura 41. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo (TSHa)₂K em vesículas de POPC: COL (5:1) e POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) _____ 84

Figura 42. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo composto Anf B em vesículas de POPC:COL (5:1) e POPC:POPS:Ergosterol (1:13:3)_____ 85

Figura 43. Gráfico da liberação de CF pelo composto peptídeo TSHd em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF _____ 86

Figura 44. Gráfico da liberação de CF pelo composto Anf B*-TSHd em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior _____ 86

Figura 45. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Hist 5 e bioconjugado Anf B-Hist 5 em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF _____ 88

Figura 46. Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Hist 5 e bioconjugado Anf B-Hist 5 em vesículas de POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF _____ 88

Figura 47. Análise de dano de membrana por citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* dos peptídeos TSHa e bioconjugados com Anf B _____ 90

Figura 48. Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com iodeto de propídio (PI) frente aos tratamentos com Anf B, TSHa, Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e (TSHa)₂K _____ 91

Figura 49. Análise de dano de membrana por citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* do peptídeo TSHd e bioconjugado com Anf B ____ 93

Figura 50. Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com iodeto de propídio (PI) frente aos tratamentos com Anf B, TSHd, Anf B*-TSHd _____ 94

Figura 51. Análise de dano de membrana por Citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* do peptídeo Hist 5 e bioconjugados com Anf B ____ 96

Figura 52. Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com PI frente aos tratamentos com Anf B, Hist 5, Anf B- Hist 5 ____ 97

- Figura 53.** Ensaio de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 24 horas ____ 98
- Figura 54.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHa por 24 horas _____ 100
- Figura 55.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHa por 2 horas _____ 101
- Figura 56.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC) -TSHa por 24 horas ____ 102
- Figura 57.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC) -TSHa por 2 horas _____ 103
- Figura 58.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com iodeto de propídio (PI) pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, TSHa, Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e $(\text{TSHa})_2\text{K}$ nas concentrações $1,25$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento _____ 104
- Figura 59.** Ensaio de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 24 horas para o experimento com o peptídeo TSHd e Anf B*-TSHd _____ 105
- Figura 60.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHd por 24 horas _____ 106
- Figura 61.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHd por 2 horas _____ 107
- Figura 62.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com PI pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, TSHd, Anf B*- TSHd, nas concentrações $1,25$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento _____ 105
- Figura 63.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 por 24 horas _____ 106
- Figura 64.** Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 por 2 horas _____ 107
- Figura 65.** Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com PI pelo

número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, Hist 5, Anf B- Hist 5, nas concentrações 1,25 e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento _____ 109

Figura 66. Ensaio de microscopia confocal com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 5 horas de incubação _____ 113

Figura 67. Ensaios de microscopia confocal com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação _____ 115

Figura 68. Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B*-TSha 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal _____ 116

Figura 69. Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B-Hist 5 na concentração de 2 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal _____ 118

Figura 70. Análise da similaridade das estruturas proteicas da proteína MCU com a sequência de *L. mexicana* _____ 122

Figura 71. Análise da similaridade das sequências das proteínas de MCU de *L. mexicana*, *H. sapiens*, *C. elegans* e *C. europaea* _____ 123

Figura 72. Estrutura da proteína MCU *C. elegans* (5ID3) _____ 124

Figura 73. Modelo por homologia da proteína MCU de *L. mexicana* _____ 124

Figura 74. Dados resultantes da otimização energética realizada através do método semiempírico PM7 _____ 125

Figura 75. Gráfico de Ramachandran da estrutura otimizada do MCU a partir do template do 5ID3 _____ 128

Figura 76. Estrutura da proteína MCU *C. europaea* (6DNF) e do modelo por homologia da proteína MCU de *L. mexicana* _____ 127

Figura 77. Dados resultantes da otimização energética realizada através do método semiempírico PM7 com o programa MOPAC _____ 128

Figura 78. Gráfico de Ramachandran da estrutura otimizada do MCU a partir do template do 5ID3 _____ 129

Figura 79. Estrutura do Modelo por homologia MCU com docking do inibidor mitoxantrona _____ 131

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

Lista de tabelas

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

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

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

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

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

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

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

Sumário

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

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

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

Capítulo 1

1. Introdução

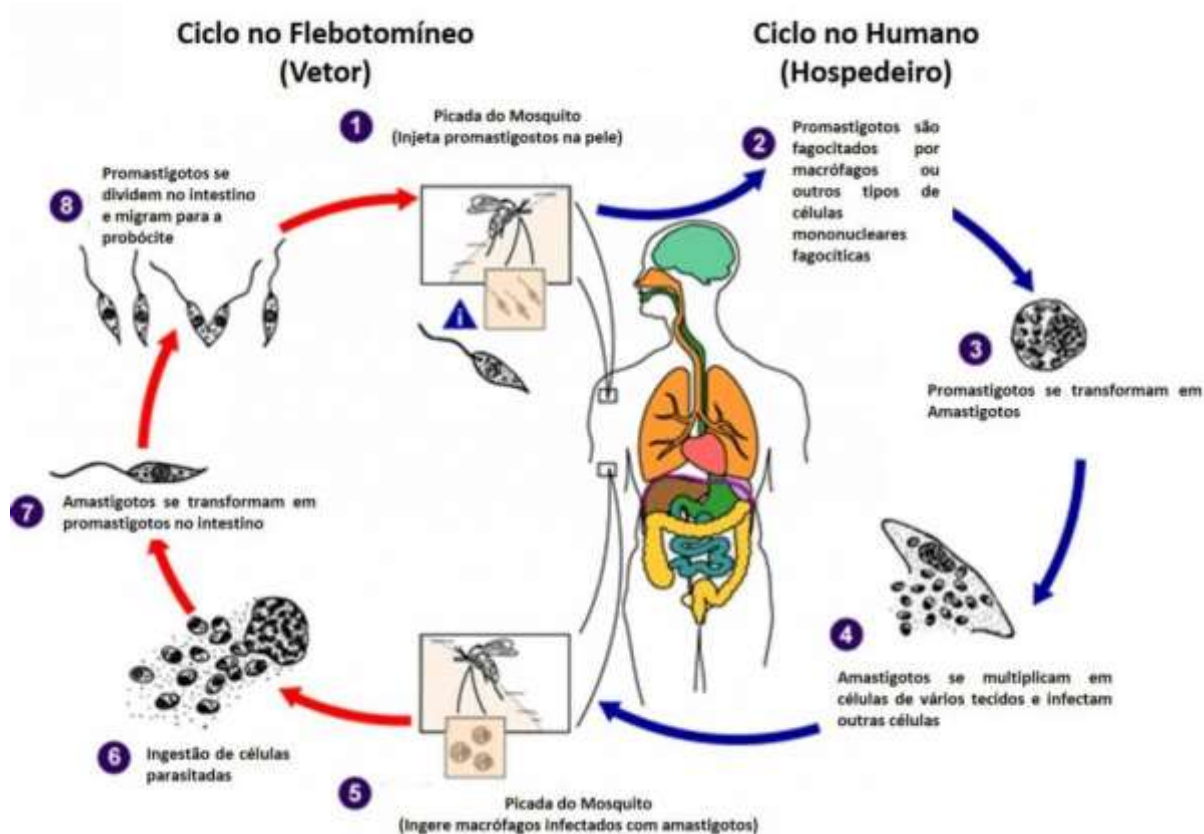
1.1. Leishmanioses: novos alvos terapêuticos para estas doenças

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

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

seguido de nova infecção de macrófagos (ALBEROLA; RODRÍGUEZ; FRANCINO; ROURA *et al.*, 2004; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

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



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

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

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

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

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

Dentre os tratamentos para a leishmaniose, alguns deles foram desenvolvidos a partir da estratégia de reposicionamento de fármacos (do inglês, drug repositioning ou drug repurposing). Esta estratégia é extremamente interessante e pode acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos. Isto porque são compostos cujas características farmacocinéticas (absorção, metabolização, distribuição e excreção) e toxicológicas já estão bem estabelecidas (OPREA; BAUMAN; BOLOGA; BURANDA *et al.*, 2011)

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

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

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

1.2. Peptídeos antimicrobianos como novos agentes terapêuticos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam diferentes propriedades biológicas, incluindo a modulação imunológica em diversos organismos a fim de protegê-los contra o estabelecimento de patógenos, além de apresentarem outros mecanismos de ação (LIU; SHI; TONG; JIA *et al.*, 2021) tendo sido descritos e

caracterizados até o momento mais de cinco mil PAMs (HUAN; KONG; MOU; YI, 2020; SEO; WON; KIM; MISHIG-OCHIR *et al.*, 2012), as quais apresentam diversas atividades biológicas incluindo atividades antimicrobiana, anticancerígena, antifúngica, antiparasitárias, entre outras (Seo et al., 2012; Aoki e Ueda, 2013; Lewies et al., 2015).

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

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

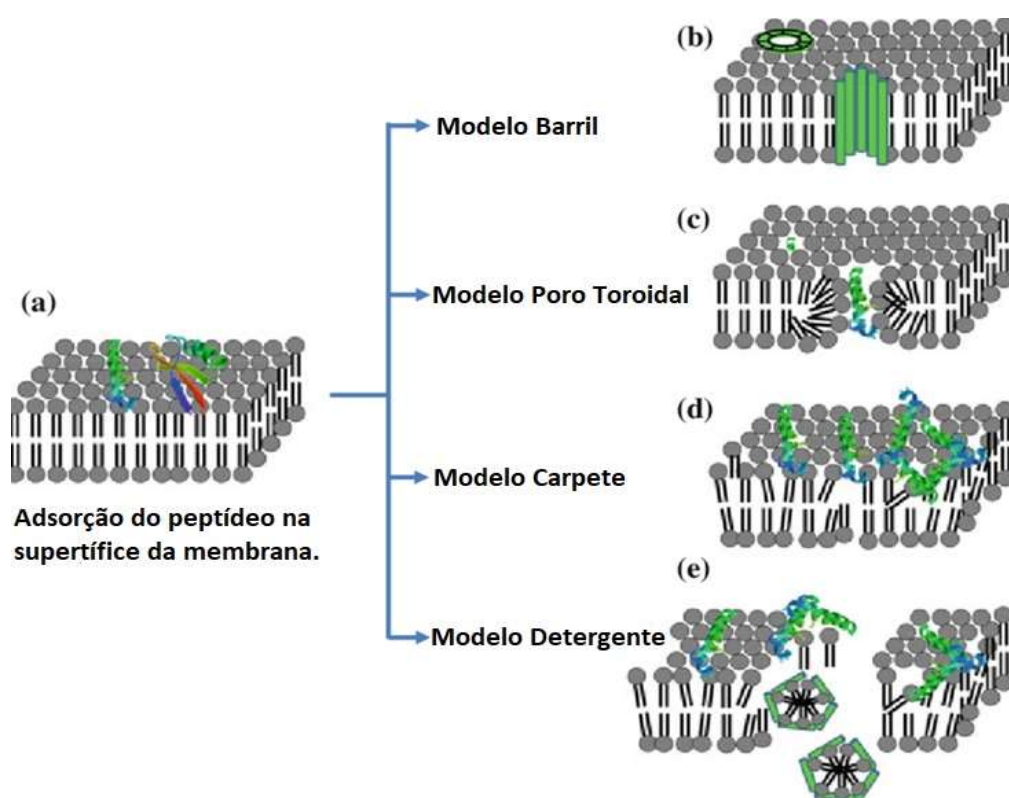
O principal mecanismo de ação dessas moléculas vinculado à capacidade de interagir, permear e desestruturar membranas celulares é dependente de diversos fatores, incluindo a estrutura secundária, a carga líquida total, o tamanho e o equilíbrio entre as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Lewies *et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

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

Como já mencionado anteriormente, um dos principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos é a membrana celular, do qual a membrana celular da *Leishmania* é formada principalmente por fosfolipídios de carga negativa sendo os principais fosfatidilinositol, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, dos quais estes são ancorados ao glicocálice. Outro ponto importante é que a morfologia desta membrana varia de acordo com a morfologia do parasita e o seu estágio de desenvolvimento, além disso este é um alvo terapêutico seletivo já que a constituição da membrana celular de mamíferos é diferente da parasitária e menos negativa, o que permite que

os PAMs tenham uma ação mais seletiva (CABEZAS; LEGENTIL; ROBERT-GANGNEUX; DALIGAULT *et al.*, 2015).

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



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

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

Dados mostram que os PAMs α -helicoidal se ligam à membrana lipídica aniônica e transformam sua estrutura desordenada em solução aquosa na estrutura

anfifílica α -helicoidal para facilitar a interação com a membrana, já os peptídeos estruturados em folha β não sofrem uma grande transição conformacional ao interagir com a membrana devido à presença de ligação dissulfeto estável (ZHANG; YAN; MENG; HONG *et al.*, 2021).

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

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

Vale ressaltar que a membrana de protozoários apresenta uma composição de fosfolipídios que contribui para uma carga líquida total negativa, constituindo-se, desta forma, um ponto de ataque quimioterápico bastante interessante (Lewies et al., 2015). Adicionalmente, os PAMs podem interferir no metabolismo e em processos celulares críticos do patógeno, incluindo a síntese da parede celular (Bechinger e Gorr, 2017; Kumar et al., 2018). Além das membranas celulares os peptídeos antiparasitários podem ter alvos intracelulares que incluem mecanismos como: indução de processos de necrose e apoptose-like, podem inibir a síntese de ATP na mitocôndria interferir na bioenergética do parasita.

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

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

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

Outro peptídeo é a Histatina 5 (Hist 5) (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGRY), peptídeo derivado da saliva humana. Este foi descrito pela literatura com atividade

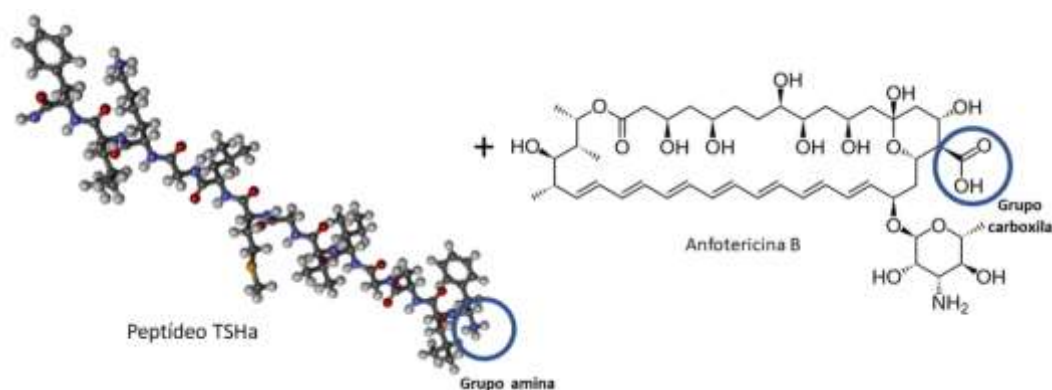
antileishmania para *Leishmania donovani* com IC₅₀ para promastigotas e amastigotas de 7.3 μ M e 14.4 μ M, respectivamente (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008). Outro dado interessante é que este peptídeo também afeta a função mitocondrial da *Leishmania* pela inibição da enzima ATP sintase (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008).

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

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

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

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



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

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

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

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

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

O cálcio é um importante mensageiro celular, que desempenha funções importantes na sobrevivência e infectividade dos tripanossomatídeos. Este está envolvido em processos importantes como a adesão do flagelo ao corpo celular em *T. cruzi* e *T. brucei*, controlando a atividade flagelar, seu processo de deslocamento, além disso desempenha um papel importante na infectividade de diversos parasitas, aumentando a sua capacidade de invadir a célula hospedeira como por exemplo em tripomastigotas em *T. cruzi* ou em amastigotas em *Leishmania amazonensis* (BENAIM; PANIZ-MONDOLFI; SORDILLO; MARTINEZ-SOTILLO, 2020; DOCAMPO; HUANG, 2015).

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

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

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

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

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

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

Em tripanossomatídeos, além dos acidocalcissomos e retículo endoplasmático, as mitocôndrias desempenham um papel muito importante na manutenção da homeostase do Ca^{2+} (DOCAMPO *et al.*, 2005). Os tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria cujas funções e forma variam de acordo com estágio

de vida do parasita e difere do hospedeiro mamífero. Nas formas parasitárias presentes na corrente sanguínea como a amastigota, a organela mitocondrial não tem cristas e a maioria dos complexos são responsáveis pela fosforilação oxidativa, enquanto que na forma encontrada nos insetos como por exemplo a promastigota de *Leishmania*, a membrana mitocondrial interna é fortemente aumentada para formar cristas que abrigam os complexos de fosforilação oxidativos para a produção de energia. Além disso, toda a organela está aumentada formando uma rede complexa em toda a célula (JAKOB; HOFFMANN; AMODEO; PEITSCH *et al.*, 2016)

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

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

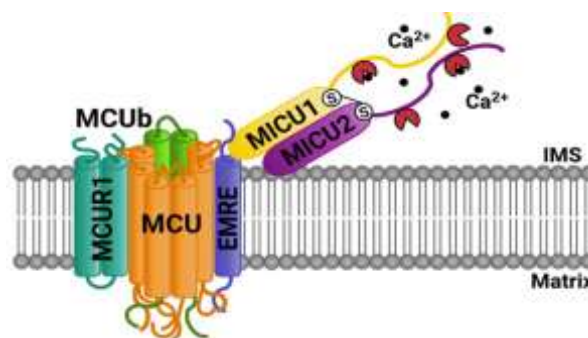
Assim, o transporte de Ca^{2+} ocorre via estabelecimento de um gradiente eletroquímico através do IMM, utilizando um canal específico denominado MCU (do inglês, **Mitochondrial Calcium Uniporter**), formado por um complexo multimérico (MAMMUCARI; GHERARDI; RIZZUTO, 2017). O complexo MCU em tripanossomatídeos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

também apresentar uma organização tetramérica do canal MCU em humanos e em tripanossomatídeos a proteína é pentamérica (Figura 4).

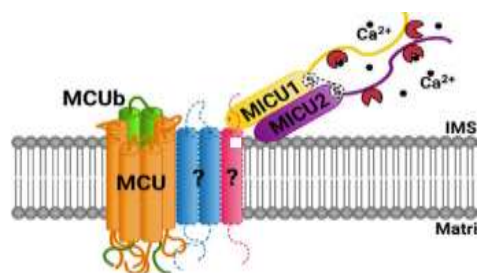
Dados da literatura indicam que o MCU tem papel fundamental na manutenção do Ca^{2+} via mitocôndria e é essencial para a sobrevivência do parasita, já que o silenciamento deste canal em *T.brucei* causa aumento na razão AMP/ATP, seguido por autofagia (LANDER; CHIURILLO; BERTOLINI; DOCAMPO *et al.*,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

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

a)



b)



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

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

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

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

2. Objetivo

Este trabalho está dividido em dois objetivos principais: (1) caracterizar a atividade leishmanicida de peptídeos da classe das temporinas e das histatinas sintéticos funcionalizados ao antileishmanial Anf B e (2) realizar modelagem molecular da proteína MCU de *Leishmania* baseado em homologia para fins de planejamento e

síntese de peptídeos antileishmanial inibidores do influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria parasitária.

Objetivos específicos a serem atingidos em (1):

1. Sintetizar e caracterizar os peptídeos TSHa (FLSGIVGMLGKLF-NH₂), TSHd (FLPAALAGIGGILGKLF-NH₂) e Hist 5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY);
 - 1.1 Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência e confirmação da Massa molecular por espectrometria de massas.
 - 1.2 Análise da estrutura secundária das moléculas por dicroísmo circular.
2. Realizar e caracterizar a bioconjugação dos peptídeos TSHa, TSHd, e Hist 5 com Anf B e síntese do dímero (TSHa)₂K,
3. Determinar as atividades (IC₅₀) anti-promastigota, anti-amastigota e citotóxica (CC₅₀) dos peptídeos TSHa, TSHd, (TSHa)₂K, Hist 5 e bioconjugados;
4. Caracterização dos peptídeos:
 - Avaliar a capacidade dos peptídeos TSHa, TSHd e Hist 5, (TSHa)₂K e bioconjugados em permeabilizar de membrana com miméticos de membrana e ensaios de danos de membrana por citometria de fluxo.
 - Estudos de mecanismo de ação dos peptídeos e bioconjugados por microscopia fluorescência e microscopia de fluorescência confocal em *L. mexicana*

Objetivos específicos a serem atingidos em (2):

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

3. Planejar os peptídeos potencialmente inibidores do poro de seletividade do MCU;

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese dos peptídeos TSHa, TSHd e Hist 5 e dímero (TSHa)₂K

Os peptídeos foram sintetizados utilizando a técnica de síntese peptídica em fase sólida (SPFS), de acordo com metodologia previamente descrita baseada no crescimento resíduo por resíduo da cadeia peptídica, ligada covalentemente pelo seu aminoácido carboxi-terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina) (Merrifield, 1964).

No presente trabalho, os peptídeos TSHa, TSHd foram sintetizados utilizando-se resina Rink Amide de grau de substituição de 0,5 mmol e 0.4 mmol de escala e com 2x de excesso, enquanto Hist 5, foi utilizada a resina Fmoc-Tyr-Wang que já contém o primeiro aminoácido da sequência com grau de substituição de 0.28 mmol e a mesma escala e excesso dos peptídeos temporinas.

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com a combinação diisopropilcarbodiimida e N-Hidroxibenzotriazol. Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram usados com 2 vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. O grupo Fmoc base-lábil foi retirado pela lavagem com 20% 4-metilpiperidina/DMF (dimetilformamida) durante 1 e 20 min. Entre cada etapa foram realizadas lavagens com DMF, para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Depois de cada etapa de acoplamento foi realizado o teste de ninidrina, como descrito em (Kaiser *et al.*, 1970).

Para a síntese do dímero de TSHa, aqui denominado (TSHa)₂ K, utilizou-se um resíduo de lisina, presente na Fmoc-K-Fmoc, para servir como ligante entre as duas cadeias do TSHa. O resíduo de lisina foi acoplado a uma resina PEG Rink-Amida de grau de substituição 0.23 mmol, com escala de 0.12 mmol e com 4x de excesso. Nota: utilizou-se HATU ((1- [Bis (dimetilamino) metileno] -1H-1,2,3-triazolo [4,5-b] piridínio 3-óxido hexafluorofosfato-Chemtech)), do inglês **H**exafluorofosfato **A**zabenzotriazol **T**etrametil **U**rônio) como agente ativador e DIPEA ((N,N-diisopropiletilamina)- Merck), como agente acoplador.

3.1.1. Bioconjugação de peptídeos à anfotericina B

Parte das resinas contendo os peptídeos TSHa, TSHd ou Hist 5 foram clivadas e caracterizadas por espectrometria de massas. Anf B (cristália) foi, então, acoplada à extremidade N-terminal de cada peptídeo através do uso do ativador HBTU ((2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato-Chemtech) e do agente acoplador DIPEA (N,N-diisopropiletilamina-Merck). Alternativamente, a conjugação da Anf B aos peptídeos TSHa e TSHd foi feita em solução, de acordo com Shu et al. (2018) para acoplamento da Anf B ao peptídeo bruto, uma vez confirmada a massa molecular dos peptídeos. Desta forma, Anf B foi acoplada por duas horas em diferentes combinações de agentes ativadores HATU, HBTU ((2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) e BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)phosphonium-Chemtech) e com o agente acoplador DIPEA.

A reação de acoplamento foi confirmada em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) analítico (Equipamento da Shimadzu) a 350 nm, comprimento de onda absorvido pela Anf B, seguido por análise de espectrometria de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS, com analisador por injeção *íon trap*, para confirmar a obtenção do material desejado, no modo eletro spray positivo (M+H)⁺ faixa de 200-2000 g mol⁻¹.

3.2. Reação de clivagem

A clivagem dos peptídeos recém sintetizados TSHd e Hist 5 foi realizada pela adição de ácido trifluoracético - TFA, e supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) e água ultrapura; em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h, na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de peptidil-resina. Para o peptídeo TSHa e (TSHa)₂K foi utilizado o seguinte coquetel de clivagem: TFA, TIS, H₂O Ultrapura e DODT (3,6-dioxa-1,8-octanedithiol). Depois realizou-se a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado, seguido por descarte do sobrenadante por 3 vezes. Na etapa seguinte, os peptídeos foram extraídos com solvente A (H₂O) contendo 0,045% de TFA e solvente B (acetonitrila) contendo

0,036% de TFA, sendo centrifugado para separar os peptídeos da resina. Os sobrenadantes resultantes contendo os peptídeos foram liofilizados.

3.3. Purificação e caracterização dos peptídeos

A purificação dos produtos obtidos foi feita em CLAE em modo semi-preparativo, com solvente A e solvente B, fluxo de 5 mL min⁻¹, detecção a 220 nm, em coluna C18 de fase reversa (Jupiter Proteo), com dimensão de 25 cm x 10 mm e partículas 5 µm. Os peptídeos foram purificados em gradientes de concentração de solvente de acordo com a hidrofobicidade de cada molécula.

A seguir, a pureza de cada fração foi determinada em CLAE, modo analítico, utilizando espectrômetro Shimadzu, com coluna C18 (25 cm x 10 mm), detecção a 220 nm, utilizando método gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL min⁻¹.

As análises das massas moleculares dos peptídeos foram realizadas por espectrometria de massas (Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS), com analisador *ion trap*, modo eletrospray positivo (M+H)⁺ faixa de 200-2000 g mol⁻¹.

3.4. Ensaios de dicroísmo circular

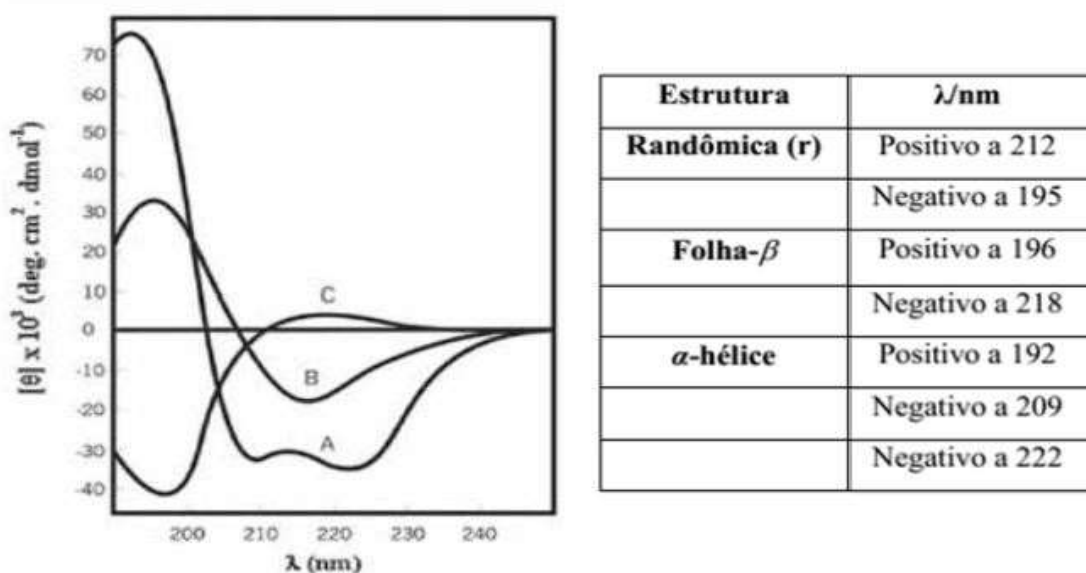
A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi utilizada para os estudos estruturais dos peptídeos. Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco J- 815, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 5 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 s por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm com controle de temperatura a 25° C. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos peptídeos em tampão PBS (Tampão fosfato salino) pH 7,4, para posterior diluição em 10 µmol L⁻¹. As soluções de peptídeos foram tituladas com LPC (lisofosfatidilcolina), em concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e solução estruturante de 60% de 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE).

O cálculo da elipticidade molar $[\Theta]$ para converter os dados coletados inicialmente em milidegree foi realizado com a equação 1 (CASALLANOVO; DE OLIVEIRA; DE SOUZA; ROS *et al.*, 2006):

$$[\Theta] = \frac{\text{valor(em milidegree)}}{(10 \cdot l \cdot [\text{peptídeo}] \cdot n^{\circ} \text{ de aa}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde no numerador é colocado o valor obtido em milidegree pelo equipamento, l é o caminho óptico utilizado na cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento em mol. L⁻¹ e n° de aa é a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes na molécula, no qual Anf B foi considerada um resíduo de aminoácido (Figura 5).

Figura 5: Padrão de bandas características para determinação de estruturas secundárias de peptídeos antimicrobianos.



3.5. Ensaios biológicos

3.5.1. Cultivo de *L. mexicana* e obtenção de macrófagos peritoneais

Para a obtenção da cultura de *L. mexicana*, os parasitas são obtidos a partir de modelo de infecção animal em machos de BALB/c (CEMIB-UNICAMP) (entre 5 a 7 semanas de idade) devendo ser infectados subcutaneamente com 1×10^7 promastigotas de *L. mexicana* na fase metacíclica na pata traseira direita. Após dois meses de infecção ou até o aparecimento da lesão (diâmetro de 5 a 7 mm), os animais

foram sacrificados segundo as recomendações do comitê de ética - CEUA/FCFCAR Processo:03/2019, e a derme e epiderme da região da lesão removidas e massareadas e estas foram cultivadas em Meio Schneider (Sigma).

Após este cultivo, os parasitas devem crescer até a fase exponencial de crescimento e congeladas na concentração de 1×10^8 promastigotas mL^{-1} em 10% de glicerol e armazenado em ultrafreezer -80° , sendo a passagem de cultura proveniente do animal P0 e a cada novo cultivo muda-se a passagem da cultura de parasitas.

Para este trabalho foram utilizadas promastigotas de *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) na passagem P3 ou P4, cultivadas em meio Schneider (Sigma Aldrich) a 28°C até a fase mid log de crescimento. Macrófagos foram obtidos a partir da cavidade peritoneal de camundongos Swiss, de acordo com metodologia previamente descrita em VELÁSQUEZ; RIBEIRO; VENN; CASTELLI et al., 2017.

3.5.2. Bioensaio para avaliar a atividade anti-promastigota *in vitro*

Culturas de *L. mexicana* na passagem P3 e na fase exponencial de crescimento foram transferidas para poços de placas de 96 poços para concentração final de 1×10^7 promastigotas mL^{-1} , seguido pela adição de peptídeos nas concentrações de 1,28 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, a fim de avaliar o potencial leishmanicida. Após 72 horas, realizou-se contagem de leishmanias viáveis na câmara de Neubauer na presença de azul de tripan. Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental com triplicata de cada concentração testada.

3.5.3. Determinação do potencial citotóxico dos peptídeos frente a macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais murinos (3×10^5 células mL^{-1}) foram cultivados em meio RPMI-1640 (SIGMA) completo, em placas de 96 poços. A adesão das células ocorreu a 37°C em 5% CO_2 por 4 h. Os peptídeos foram testados nas concentrações $1,28 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a leitura dos resultados foi realizada por método colorimétrico MTT.

Os resultados obtidos foram expressos em forma de CC_{50} , que é a concentração que apresenta igual e/ou maior que 50% da viabilidade celular, ou seja, células viáveis. No qual a determinação deste valor foi realizada por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat. Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental com triplicata de cada concentração testada.

3.5.4. Bioensaio para avaliar a atividade anti-amastigota in vitro

Macrófagos peritoneais murinos (3×10^5 células mL^{-1}) foram cultivados em meio RPMI-1640 completo, distribuídos em lamínulas circulares (de 13 mm de diâmetro) acondicionadas dentro de poços de placas de 24 poços. A adesão das células ocorreu a $37^{\circ}C$ em 5% CO_2 por 4h. Macrófagos foram infectados com a forma promastigotas de *L. mexicana*, na fase estacionária do crescimento, na razão de 10:1 (promastigotas:célula) e mantidos a $37^{\circ}C$ em 5% de CO_2 por mais 8 h. Ao final, os parasitas não fagocitados foram removidos por lavagem, seguido pela adição de 20 μL dos peptídeos nas concentrações 10- 0.62 $\mu mol L^{-1}$ e para moléculas com valor de IC_{50} inferiores a 0, 62 foram testados nas concentrações 0.62 a 0.02 $\mu mol L^{-1}$ solubilizada em meio fresco. A placa foi mantida a $37^{\circ}C$, 5% de CO_2 por 24 h e 48 h. O fármaco de referência utilizado como controle foi a Anf B. Para análise do índice de infecção e concentração inibitória de 50% da inibição do crescimento (IC_{50-AMA}), as lamínulas foram coradas por Giemsa, para posterior análise em microscopia óptica para registro do número de amastigotas por macrófago. Para o cálculo do índice de infecção (Porcentagem de células infectadas * (número de parasitas intracelulares /número de células infectadas) e (IC_{50-AMA}) determinados por regressão não linear. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.6. Estudos de mecanismos de ação

Como descrito anteriormente o principal mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos é na membrana celular dos microrganismos, assim como como a

droga antiparasitária Anf B, com o objetivo de entender se os bioconjugados dos peptídeos com Anf B e o dímero do TSHa também possuem este mecanismo, foram realizados alguns ensaios que podem contribuir para o delineamento deste mecanismo.

3.6.1. Ensaios de permeabilização de vesículas

Como o mecanismo de ação dos peptídeos em estudo pode ser na membrana, foram realizados estudos com miméticos de membrana com a composição lipídica do parasita *Leishmania* e das células hospedeiras dos macrófagos. A membrana celular da *Leishmania* é formada principalmente por fosfolipídios de carga negativa sendo os principais fosfatidilinositol, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina e ergosterol, já a membrana celular de mamíferos é menos negativa formado principalmente por fosfatidilcolina e colesterol (CABEZAS; LEGENTIL; ROBERT-GANGNEUX; DALIGAULT *et al.*, 2015).

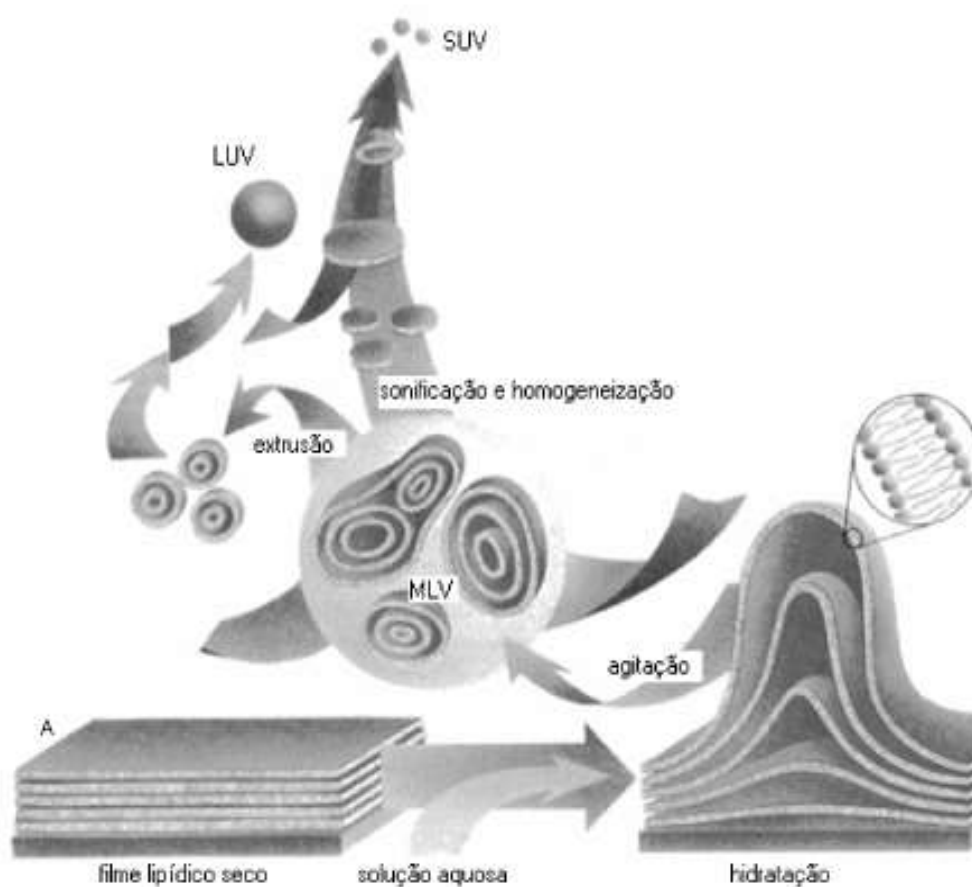
Foram preparados filmes lipídicos de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina): Colesterol (5:1) e de POPC: POPS (Fosfatidilserina): Ergosterol (1:13:3) na concentração de 15 mmol L⁻¹.

Para elaboração dos filmes, os lipídios foram solubilizados em solução de metanol/clorofórmio (4:1, v:v) e exposto a um fluxo de nitrogênio para consequente formação do filme lipídico. Os mesmos foram mantidos em bomba de vácuo durante 12 h para eliminação dos solventes. Após secagem no vácuo, foi adicionado uma solução aquosa contendo o fluoróforo carboxifluoresceína (CF-50 mmol L⁻¹). A solução passou por ciclos de aquecimento a 60°C seguida de sonicação e agitação por 5 min, durante 1 h para a formação das vesículas multilamelares. Após este período, a mistura foi submetida a um extrusor da Avanti Polar Lipids para obtenção de vesículas unilamelares (LUVs) de 100 nm.

Após a formação das vesículas unilamelares, a solução foi aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex LH-20 para a separação da CF que não foi encapsulada no interior das vesículas (Figura 6). Os compostos foram testados sobre as vesículas e a sua ação foi acompanhada pela liberação do fluoróforo no equipamento espectrofluorímetro HITACHI-U-2000, com comprimento de onda ajustado em 495 nm e 517 nm, para a excitação e emissão, respectivamente. A droga

controle Anf B e os peptídeos TSHa, TSHd, Hist 5, (TSHa)₂K e os bioconjugados com Anf B foram testados nas concentrações de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 6: Esquema para a formação das vesículas unilamelares. Há formação do filme lipídico, a posterior hidratação com carboxifluoresceína seguidos de processos de sonicação, e homogeneização a 60° C por 1 hora. Após isso as vesículas são extrusadas para a formação das LUVs e por fim passam por uma coluna de exclusão de peso molecular para separação das LUVs encapsuladas do fluóforo livre.



Fonte: Liposome preparation, disponível em <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>, acesso em jan./2022.

3.6.2. Ensaios de danos de membrana por citometria de fluxo

Para os ensaios de citometria de fluxo, promastigotas de *L. mexicana* foram crescidas em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino inativado. A cultura de parasitas foi ajustada na concentração 5×10^6 células mL^{-1} , seguidos de incubação na presença ou ausência dos peptídeos, dos bioconjugados e de Anf B nas concentrações: $2 \times \text{IC}_{50}$, $1 \times \text{IC}_{50}$ e $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$ e $\frac{1}{5} \text{IC}_{50}$.

Após a incubação, as promastigotas foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas com iodeto de propídio (PI) ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 20 min, seguido de centrifugação a $2000 \times g$ por 10 min e ressuspensão em 500 μL de PBS.

Todas as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e analisadas usando o software proprietário do equipamento e não menos 50.000 eventos foram efetivamente incluídos em cada análise, além disso todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica com triplicata de cada ponto experimental.

3.6.3. Ensaios de microscopia de fluorescência e de fluorescência confocal

Microscopia de fluorescência

Para a microscopia de fluorescência foram realizados ensaios com formas promastigotas de *L. mexicana* na fase exponencial de crescimento na passagem P3 na concentração de 1×10^7 cél mL^{-1} . Todos foram tratados com Anf B, peptídeos e os bioconjugados nas concentrações de 1,25 ou 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 h ou 24 h de tratamento. Os parasitas foram marcados com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst (Estoque: 1 mg mL^{-1}) por 5 minutos e após isso foi adicionado PI (1 mg mL^{-1}) para uma concentração final de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de incubação por 20 min a temperatura ambiente.

Após a incubação, os parasitas foram centrifugados por 10 min a $2000 \times g$, seguido da ressuspensão do precipitado em 100 μL de PBS, a fim de remover os fluoróforos.

Os parasitas foram imobilizados em lamínula de vidro previamente tratada com Cell-Tak Cell and Tissue Adhesive (Corning™) a $1 \mu\text{g cm}^{-2}$. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon DS-R11) no aumento de 40x. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica com triplicata experimental.

Microscopia de fluorescência confocal

Para avaliar o processo de acumulação e localização dos bioconjugados nas formas promastigotas de *L. mexicana* a 28°C , os parasitas (1×10^7 células mL^{-1}) foram incubados na presença ou ausência de peptídeos por 5 h. Após a incubação, os parasitas foram centrifugados por 10 min a 2000 xg, seguido da ressuspensão do *pellet* em 500 μL de PBS, a fim de remover os peptídeos não incorporados. Após isso foi realizada incubação dos parasitas com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI (Thermo-solução estoque: 1 mg mL^{-1}) por 15 min, 200 nmol L^{-1} de mitotracker (Invitrogen-solução estoque 1 mmol L^{-1}) por 20 min ou 50 nmol L^{-1} lysotracker (Thermo- solução estoque 1 mmol L^{-1}) por 20 min. Após a incubação, os parasitas foram centrifugados por 10 min a 2000 xg, seguido de ressuspensão do precipitado em 100 μL de PBS, a fim de remover os fluoróforos. Os parasitas foram imobilizados em lamínula de vidro previamente tratada com Cell-Tak Cell and Tissue Adhesive (Corning™) a $1 \mu\text{g cm}^{-2}$ sendo adquiridas imagem em microscópio confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) em objetiva de 40x de aumento.

3.7. Construção do modelo por homologia da proteína MCU

Para os estudos de modelagem molecular, utilizou-se a sequência da proteína MCU de *L. mexicana* (XM_003876603.1), obtida a partir do banco de dados TritypDB (tritypdb.org), a análise de similaridade foi feita por BlastP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alndr_401417537) e, os alinhamentos, com o software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Como estrutura molde foi escolhida a proteína MCU de *Caenorhabditis elegans* utilizando o servidor Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) a partir deste modelo foi gerado uma estrutura por homologia da proteína MCU de *L. mexicana* em formato pdb. O modelo da proteína MCU de *L. mexicana* construída foi otimizado e validado com o software MolProbity (CHEN; ARENDALL; HEADD; KEEDY et al., 2010; WILLIAMS; HEADD; MORIARTY; PRISANT et al., 2018),

juntamente com o método semi empírico PM7 com o Software livre MOPAC (versão 2016) através do Mercury Interface de software CSD (v3.9), do Pacote computacional GOLD Suite desenvolvido pela CCDC (OKADA JUNIOR, C. Y. ,2018).

3.7.1. Planejamento dos peptídeos inéditos inibidores da proteína MCU

Para o planejamento dos peptídeos, inibidores do canal iônico de MCU tetraciclina B, NecroX-5, Mitoxantrone, KB-R793, Despiramina, DS1657051, Curcumina B, Ciclosporina A e B, Aminosalicilato, Hexa)cetylpiridinium foram utilizados para identificação das principais interações químicas (WOODS; NEMANI; SHANMUGHAPRIYA; KUMAR *et al.*, 2019; WOODS; WILSON, 2020).

Os inibidores tiveram suas estruturas desenhadas no programa Discovery Studio *Visualizer* , e posteriormente otimizados utilizando-se o método semi empírico PM7 em Software livre MOPAC (versão 2016) através da interface gráfica do programa Mercury Interface de software CSD (v3.9) do Pacote GOLD Suite e, em seguida, foi realizada a ancoragem dos mesmos na estrutura tridimensional de MCU de *L. mexicana* utilizando o Software Gold Suite com a função de pontuação chempplp , avaliando depois quais as interações químicas presentes na docagem molecular dos inibidores com MCU.

A partir dos peptídeos planejados a fim de inibir a proteína MCU de *L. mexicana*, foi realizada a ancoragem dos mesmos com as estrutura tridimensional de MCU de *Homo sapiens* (pdb:6058) através do Software Gold Suite com a função de pontuação chempplp , no qual foi avaliado a especificidade dos peptídeos, do qual foram selecionados peptídeos que não interagiram com a região do poro da proteína MCU humana, dos quais este foi mais um critério para selecionar os peptídeos que fossem específicas a *L. mexicana*.

3.8. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental com triplicatas de cada ponto. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov). Considerados normais, para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados o teste de Análise de Variância (two-way ANOVA), com o pós-teste de

Tukey e o teste T. As análises foram realizadas através do software Graph Pad Prism® Version 5.01 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotada para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$ e de 1% $p < 0,01$.

4. Resultados e discussões

4.1. Síntese dos peptídeos

A fim de identificar novos agentes leishmanicidas, este projeto de pesquisa baseia-se nas estratégias de síntese, bioconjugação e dimerização de peptídeos.

4.1.1. Peptídeo TSHa e obtenção do bioconjugado Anf B-TSHa

A estratégia de bioconjugação vem sendo aplicada para desenvolver estratégias de desenvolvimento de novos compostos contra Leishmanioses, gerando composto mais seletivos para o parasita, como por exemplo o desenvolvimento de peptídeos inibidores da proteína Tripanotona dissulfeto redutase em *Leishmania Infantum* (REVUELTO; LÓPEZ-MARTÍN; DE LUCIO; GARCÍA-SORIANO et al., 2021) ou a bioconjugação do de ácidos graxos com peptídeos que foram capazes de inibir o crescimento parasitário em *Leishmania major* (ZAHEDIFARD; LEE; NO; SALIMI et al., 2020), todos estes dados corroboram para mostrar como a estratégia da bioconjugação é de extrema importância para o desenvolvimentos de novos antileishmaniais.

Sendo assim para a síntese do peptídeo TSHa (FLSGIVGMLGKLF-NH₂), obteve-se 1167 mg de peptidil-resina, correspondendo a um ganho de massa de 366 mg e rendimento de síntese de 82,4%. Assim, 0,1 mmol da peptidil-resina foi clivada para obtenção do peptídeo TSHa, enquanto os outros 0,1 mmol, separados para acoplamento com Anf B na extremidade N-terminal utilizando-se os agentes de acoplamento HBTU e DIPEA por quatro horas. A clivagem do conjugado Anf B-TSHa foi realizada como supracitado (tabela 1).

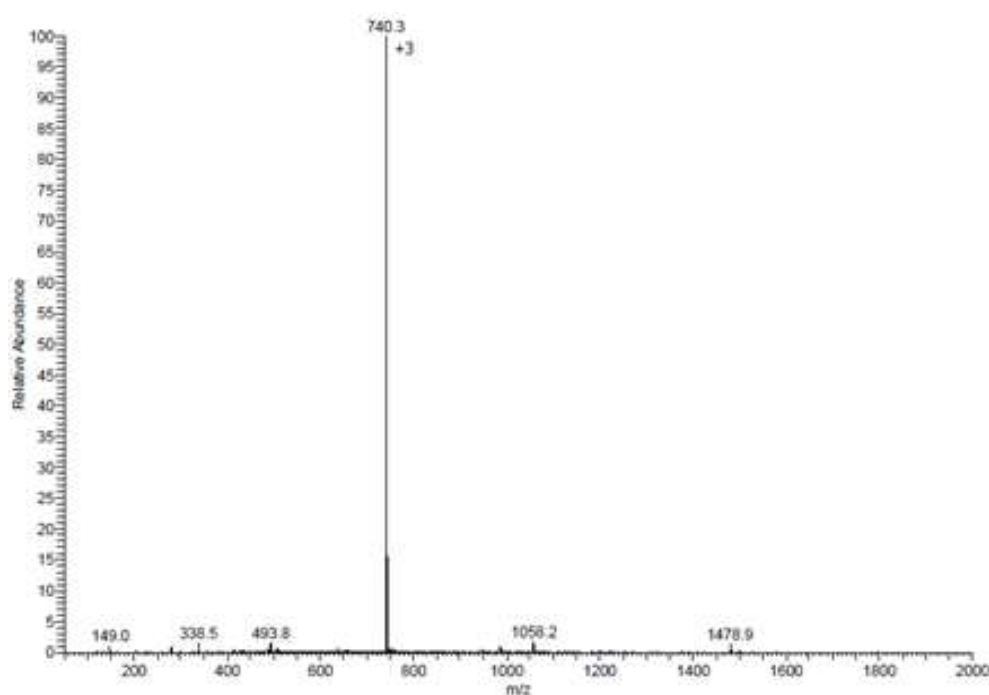
Tabela 1: Rendimento dos de síntese dos peptídeos TSHa e Anf B-TSHa.

Massa	Massa de	Rendimento de
-------	----------	---------------

Peptidil-Resina	do peptídeo bruto (mg)	peptídeo bruto (Teórico)	clivagem (%)
FLSGIVGMLGKLF-NH ₂	51	138	37
Anf B-FLSGIVGMLGKLF-NH ₂	51	222	22

A confirmação da massa molar do peptídeo TSHa está nos anexos O peptídeo Anf B-TSHa (Figura 7), apresentou massa molar de 2217 g mol⁻¹, 69 unidades menor que o valor esperado (2286 g mol⁻¹).

Figura 7: Espectro de massas referente ao peptídeo TSHa conjugado à Anf B. A massa molar do peptídeo obtida foi de 2217,9 g mol⁻¹, demonstrando que a síntese não ocorreu corretamente.



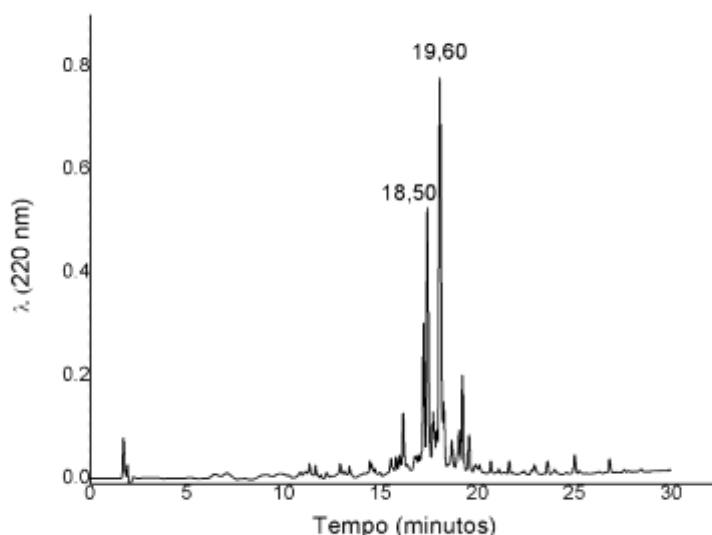
Ao final do processo de conjugação da Anf B ao peptídeo TSHa, não foi possível obter o bioconjugado com a massa molecular, sendo necessário entender o que estava acarretando na formação de uma molécula de anfotericina com uma massa menor. Para isto foram realizados estudos de estabilidade da molécula Anf B realizada em duas diferentes soluções de clivagem I: (H₂O, TIS, TFA) ou II: (H₂O, TIS, ODT e TFA), verificou-se que esta molécula pode estar sendo degradada frente à solução de clivagem II, resultando na ausência de parte da molécula Anf B acoplada ao peptídeo TSHa, (DESHPANDE; GANGRADE; KEKARE; VAIDYA, 2010)

(Resultados em anexo). Essa Anf B modificada, aqui denominada Anf B*, está em processo de elucidação estrutural.

Nova síntese realizada, utilizando-se 0,1 mmol de resina (292 mg), 2x de excesso de Anf B e com um tempo de acoplamento de quatro horas, gerou 322 mg de massa de peptidil-resina, com ganho de 31 mg de massa e rendimento de 84,1 %, a qual foi clivada em em solução I, mas, resultando novamente na formação de Anf B* (2217 g mol^{-1}). Os resultados da purificação do peptídeo TSHa estão disponíveis no anexo 2.

Para o peptídeo Anf B*-TSHa, foram realizadas duas purificações. Inicialmente foi analisado o perfil bruto dos compostos, do qual notou-se a presença de dois picos majoritários com tempo de retenção de 18,5 e 19,6 minutos, correspondendo provavelmente ao peptídeo TSHa e ao conjugado Anf B*-TSHa, respectivamente (Figura 8).

Figura 8: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B*-TSHa. Há presença de dois picos majoritários, 1º pico - tempo de retenção de 18,5 minutos (peptídeo sem anfotericina e o 2º pico - tempo de retenção com 19,6 minutos (peptídeo com parte da estrutura de anfotericina B).

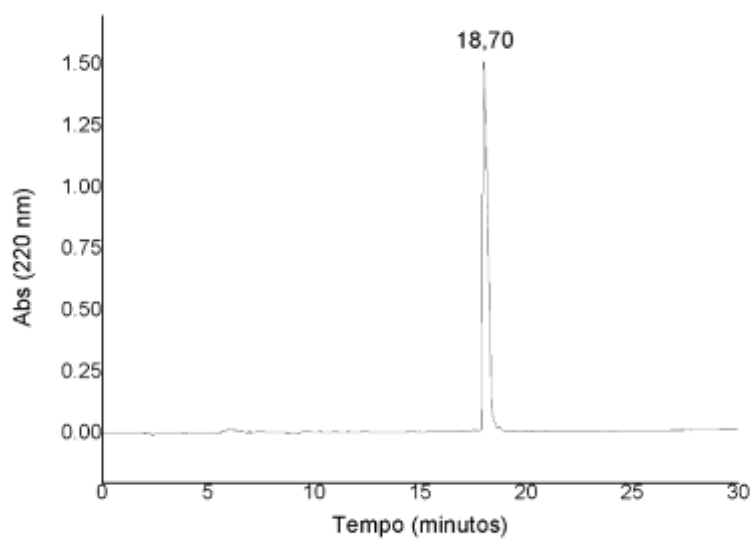


Para a purificação desta molécula utilizou o método 30-70 % solvente B em 90 minutos. A quantidade de massa obtida e pureza das frações estão descritas na tabela 2, destacando que após o processo de purificação e confirmação das massas

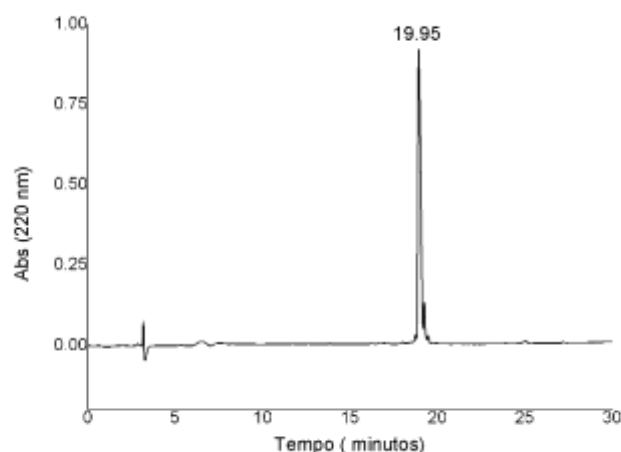
moleculares dos peptídeos obtidos, havia presença do peptídeo TSHa e do seu conjugado Anf B*-TSHa (Figura 9).

Figura 9: Perfil cromatográfico do peptídeo puro Anf B-TSHa. Em (a) peptídeo sem anfotericina B com pureza de 93,60% de pureza, em (b) peptídeo com parte da estrutura da anfotericina B com 95 % de pureza.

a)



b)



Em ambas as tentativas de síntese, foi demonstrado que a molécula de Anf B acoplada a estrutura do peptídeo está incompleta, para solucionar tal dificuldade um novo método de síntese foi testado, no qual foi realizado um acoplamento em fase líquida, com os ativadores HBTU e DIPEA, este foi feito em solução a fim potencializar o acoplamento da anfotericina B e evitar o contato desta com o meio ácido, uma vez que, dados da literatura demonstraram o uso deste método para acoplar Anf B em peptídeos (Shu et al., 2018).

4.1.2. Nova estratégia de acoplamento em solução da anfotericina B e TSHa.

Como visto anteriormente, não houve sucesso no acoplamento de anfotericina B ao peptídeo TSHa quando utilizada a metodologia de síntese em fase sólida, a qual gerou a molécula Anf B*-TSHa, onde a estrutura da anfotericina B não está completa (Em elucidação).

Para obter novo acoplamento, adotou-se a estratégia de acoplamento em solução. Para isso, reações em pequena escala foram realizadas, seguido de confirmação do acoplamento em CLAE (Figura 10) e espectrometria de massas (Figura 11), em pequena escala foi possível obter o bionconjugado do peptídeo TSHa com a estrutura completa do Anf B. Outro ponto importante é que a síntese em solução reduz significativamente o número de unidades de operação que são

necessárias para obter os peptídeos e a síntese em solução é uma forma rápida para a obtenção de peptídeos hidrofílicos e de compostos bioconjugados.

Figura 10: Análise de CLAE para avaliação do processo de acoplamento da anfotericina B ao peptídeo TSHa em pequena escala do qual foi utilizado o agente ativador HATU e o acoplador DIPEA, a corrida se deu no método 5-95% solvente B num intervalo de 30 minutos no comprimento de onda de 350 nm.

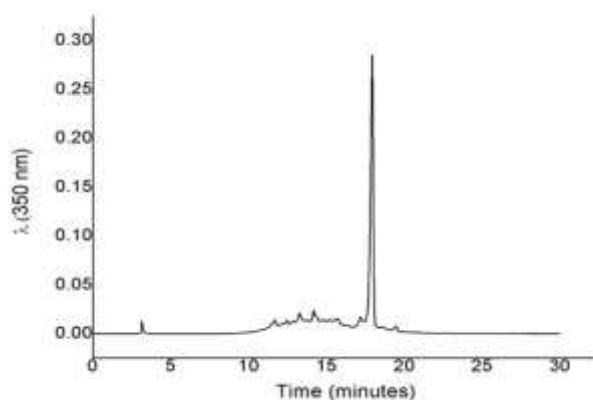
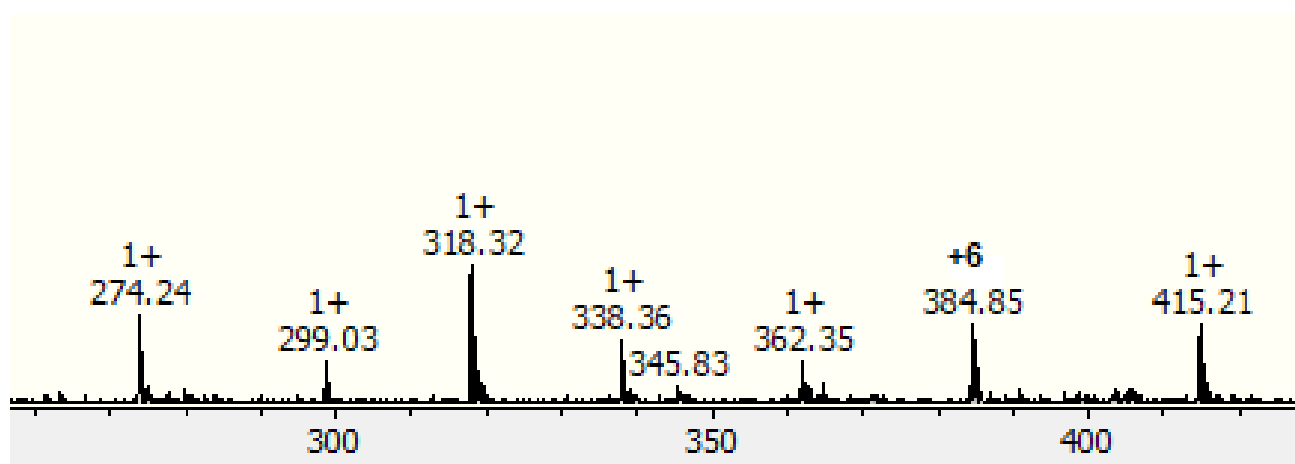
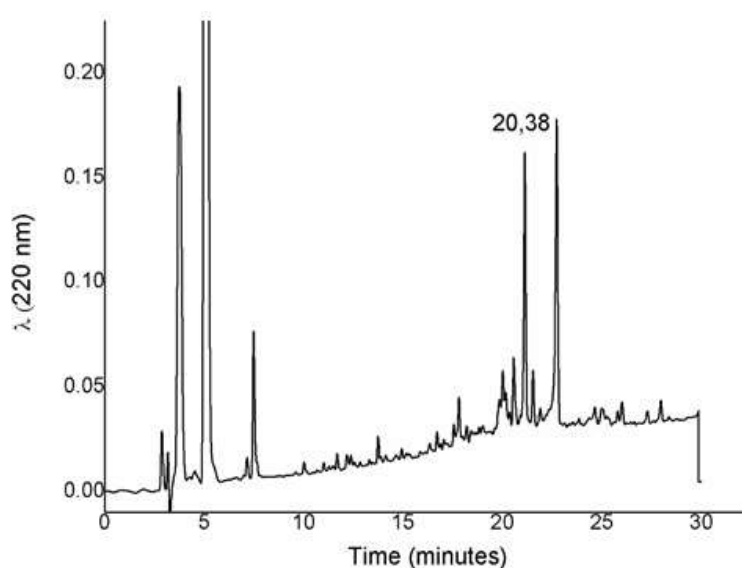


Figura 11: Análise de espectrometria de massas do acoplamento em solução de TSHa e Anf B. Em reação de acoplamento em pequena escala utilizou-se os agentes ativador DIPEA e o agente acoplador, HATU verificou-se o pico +6-384.85, indicando o sucesso na obtenção de Anf B- TSHa.



O processo de acoplamento foi então escalonado e, para esta síntese foram utilizados 28,2 mg de peptídeo bruto (0,020 mmol), sendo a escala da Anf B e agentes ativador/ acoplador de 0.03 mmol com 2x de excesso, o perfil bruto do peptídeo acoplado com Anf B pode ser visto na figura 12.

Figura 12: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B-TSHa com o agente acoplador HATU e o ativador DIPEA, com o aumento da escala de reação, o método utilizado foi 5-95% solvente B em 30 minutos e o peptídeo apresentou um tempo de retenção de 20,38 minutos.



Durante o processo de síntese, após a reação de acoplamento da anfotericina B, o composto obtido foi concentrado e posteriormente liofilizado. O material obtido teve seu perfil cromatográfico inicialmente avaliado por CLAE analítico e posteriormente, purificado em modo semi-preparativo no tempo de retenção de 20.63 minutos (Figura 13) do qual foi obtido cerca de 4 mg de material puro com pureza de 96%. A massa molecular do composto obtido comprovou a conjugação da anfotericina B, porém, com uma diferença agora de +79 na massa molecular esperada, a qual pode ser resultante de reações colaterais (Figura 14).

De acordo com a literatura há reações colaterais que podem ocorrer com agentes acopladores da família dos HATU, quando há formação de sal de urônio, durante a reação de síntese, reagindo com aminas secundárias de resíduos de aminoácidos específicos, como Tyr, Lys, Cys (KELLICI; CHATZIATHANASIADOU; LEE; SAYYAD *et al.*, 2017), dos quais na sequência do peptídeo TSHa há presença de um resíduo de lisina, do qual poderia ser possível ocorrer esta reação colateral (RC).

Figura 13: Perfil do peptídeo puro Anf B (RC) -TSHa a partir do aumento de escala com os agentes ativadores DIPEA e o agente acoplador HATU com tempo de retenção de 20.63 minutos com comprimento de detecção em 220 nm.

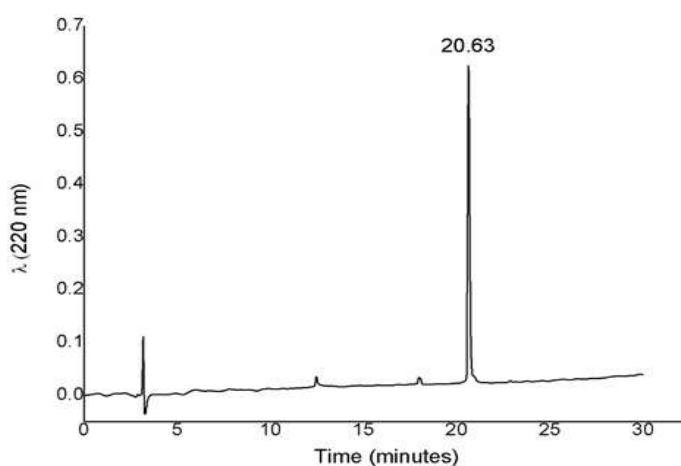
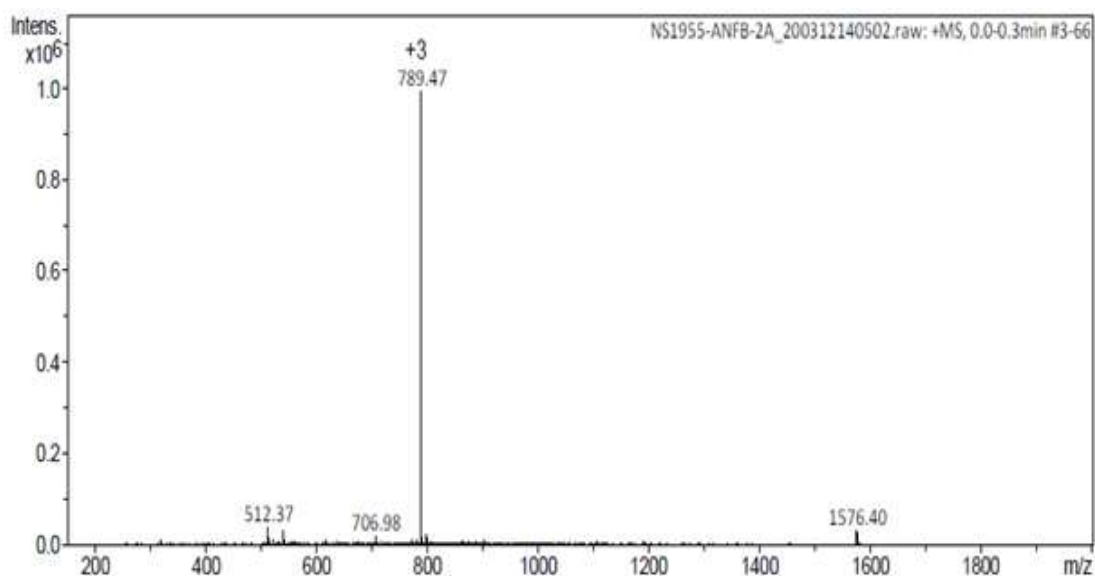


Figura 14: Espectro de massas do peptídeo Anf B (RC)-TSHa resultante da reação de acoplamento com agente ativador HATU e o acoplador DIPEA, a razão massa carga indica uma massa molecular de 2365 que é uma diferença da massa molecular de +79, como já demonstrado anteriormente deveria ser 2286 g/ mol.



Novo acoplamento foi realizado utilizando agora outro agente acoplador, o BOP, e DIPEA. Essa estratégia de acoplamento, realizada em solução, passou por uma etapa de concentração, seguida de liofilização. Análise de espectrometria de massas do peptídeo conjugado à Anf B revelou o sucesso do acoplamento (Figuras

15 e 16). O ativador BOP utilizado gera poucas reações colaterais, além disso o acoplamento com outros resíduos de aminoácidos utiliza pouca energia, aumentando o rendimento da síntese e também a sua especificidade (EL-FAHAM; KHATTAB; SUBIRÓS-FUNOSAS; ALBERICIO, 2014).

Figura 15: Espectro de massas do peptídeo Anf B-TSHa resultante da estratégia de acoplamento com o agente acoplador BOP e o ativador DIPEA, demonstrando que a síntese se deu de forma satisfatória, a massa molecular do peptídeo é de 2286 g mol⁻¹ com a razão massa carga do íon +2 representados em destaque.

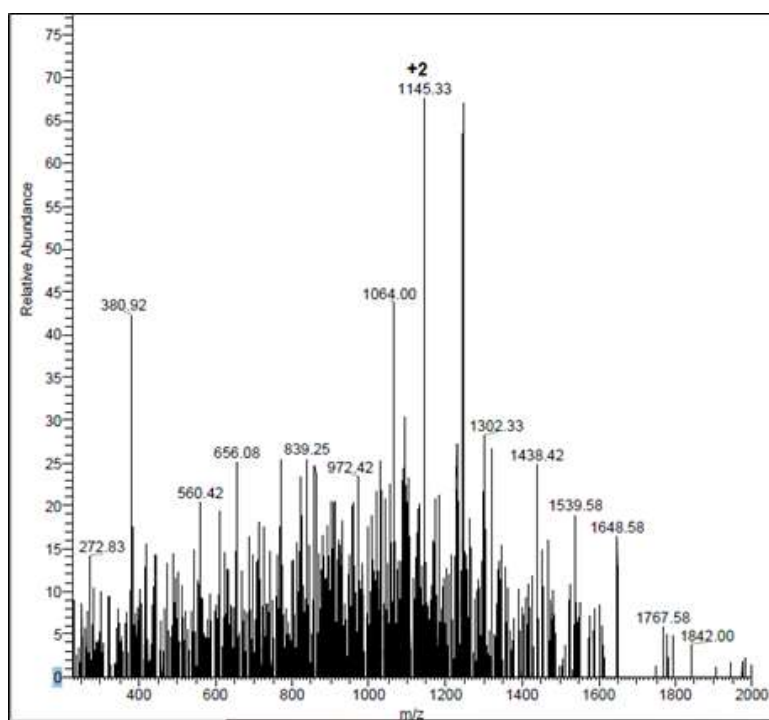
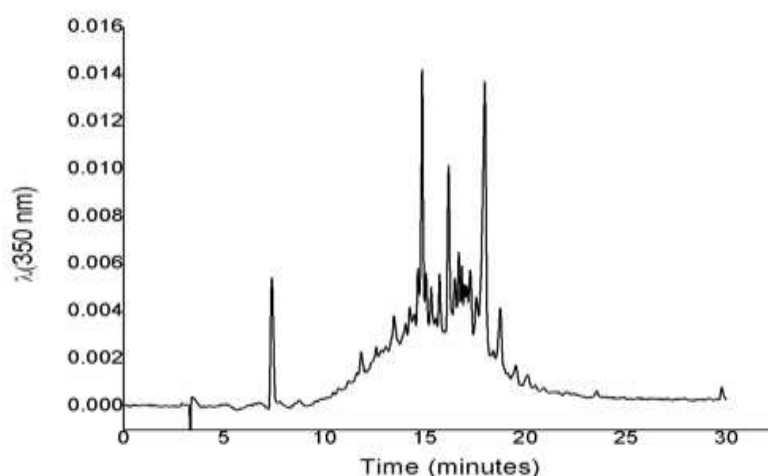


Figura 16: Perfil cromatográfico do peptídeo Anf B (completo)-TSHA por CLAE modo analítico com método de detecção em 350 nm e com um gradiente de 5-95% de solvente b em 30 minutos.



Como foi mencionado os peptídeos conjugados com Anf B obtidos Anf B*-TSHA e Anf B (RC)-TSHA estão passando por um processo de elucidação estrutural a fim de identificar o que foi perdido da molécula de Anf B e também identificar o composto da reação colateral formado, para isto estudos com espectrometria de massas com MALDI-TOF e por ressonância magnética nuclear estão sendo realizados.

4.1.3. Obtenção do Dímero do peptídeo TSHA

Uma estratégia para potencializar a atividade microbiana dos PAMs é a dimerização de peptídeos. Dados da literatura comprovam que peptídeos dimerizados são menos suscetíveis à degradação por proteases, têm sua atividade biológica aumentada e a toxicidade pode ser diminuída (LORENZON; PICCOLI; SANTOS-FILHO; CILLI, 2019; LORENZÓN; CESPEDES; VICENTE; NOGUEIRA *et al.*, 2012; LORENZÓN; PICCOLI; CILLI, 2014; LORENZÓN; SANCHES; NOGUEIRA; BAUAB *et al.*, 2013). Desta forma inicialmente foi sintetizado um dímero do peptídeo TSHA, utilizando como primeiro resíduo o aminoácido Fmoc-Lys-Fmoc, permitindo a elongação da cadeia de maneira dupla, formando o dímero (TSHA)₂K (LORENZÓN; CESPEDES; VICENTE; NOGUEIRA *et al.*, 2012; LORENZÓN; PICCOLI; CILLI, 2014; LORENZÓN; SANCHES; NOGUEIRA; BAUAB *et al.*, 2013).

Para síntese do dímero do peptídeo (TSHa)₂K, foi utilizado uma escala de 0,12 mmol com 4x de excesso com a resina PEG-Rink Amide que apresentava menor grau de substituição e permitiu assim que o material fosse sintetizado e com menos contaminantes, obtendo-se 1,1146 g de peptidil-resina, o ganho de massa foi de 393 mg o que representa um rendimento de síntese de 98%. Foi realizada uma clivagem com 557 mg de resina (0,06 mmol) obtendo-se cerca de 60 mg de bruto o que equivale a um rendimento de 35%. O peptídeo foi submetido à análise por espectrometria de massas confirmando a massa molecular do peptídeo (Figura 17). O material também foi purificado em CLAE semi-preparativo (Figura 18) do qual foram obtidos 8.1 mg de puro com 97 % de pureza com tempo de retenção 21,20 minutos (Figura 19).

Figura 17: Espectro de massas referente ao Dímero (TSHa)₂-K, com massa molar de 2872 g mol⁻¹, com ionização positiva dos quais estão representados os picos +3-958.27, +4-719,10, +5-575.29.

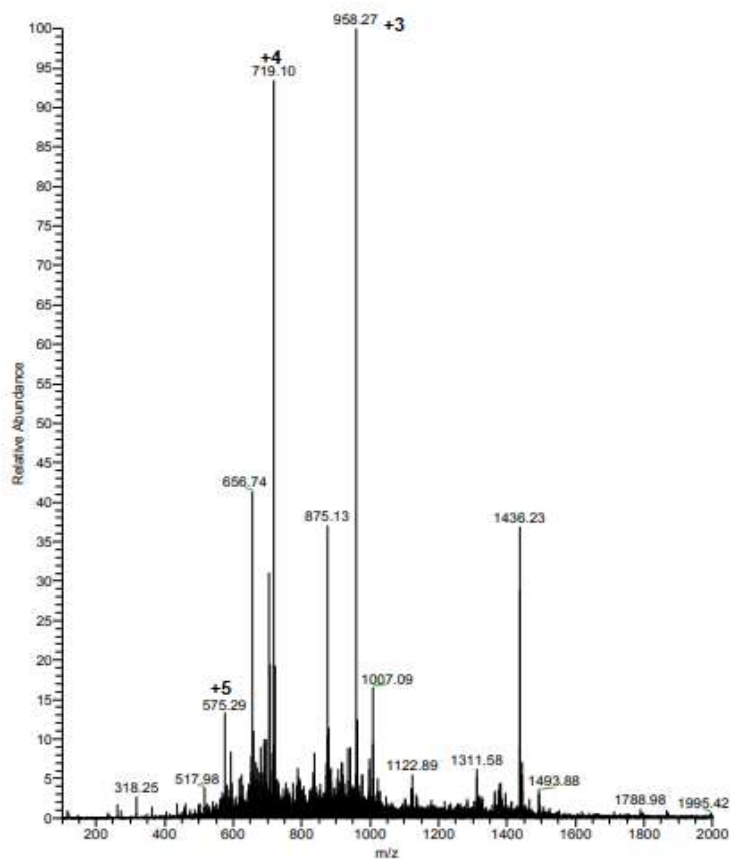


Figura 18: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Dímero (TSHa)₂-K, com tempo de retenção de 21,82 minutos com método 5-95% solvente B em 30 minutos no comprimento de onda de detecção de 220 nm em modo analítico.

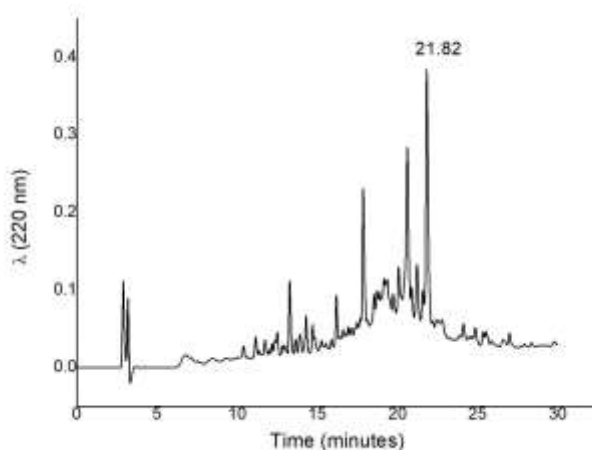
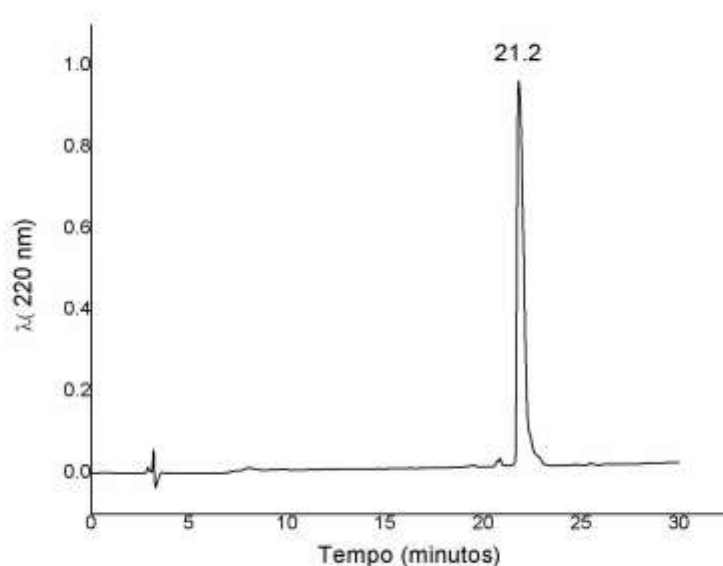


Figura 19: Perfil do peptídeo puro Dímero (TSHa)₂-K com tempo de retenção de 21,20 minutos.



4.1.4. Peptídeo TSHd e obtenção do bioconjugado Anf B-TSHd

Em uma próxima etapa do projeto, o peptídeo TSHd (FLPAALAGIGGILGKLF-NH₂) foi sintetizado com uma escala de 0,4 mmol, ao final do processo de síntese houve um ganho de massa de 767 mg de resina, o que representa um rendimento de síntese de 79,04 %. Ao final da etapa de clivagem foram obtidos 52,8 mg de peptídeo bruto, um rendimento de 31,86%. A massa molar do peptídeo foi comprovada por espectrometria de massas - 1657 g mol⁻¹ e além disso foi realizada a purificação desta molécula por CLAE e com grau de pureza de 97,91, todos os cromatogramas e espectro de massas do peptídeo TSHd estão disponíveis no anexo 3,4 e 5.

Uma das propostas deste trabalho foi o acoplamento da Anf B ao peptídeo TSHd, foram necessárias múltiplas reações de acoplamento da anfotericina B na região N-terminal do peptídeo até a obtenção de resultado negativo no teste de ninidrina, indicativo de que não há mais grupos aminas livres e, portanto, foi possível realizar o acoplamento da Anf B ao peptídeo TSHd.

Ao final do processo de clivagem foram obtidos cerca de 40 mg de peptídeo bruto, cujo perfil cromatográfico foi avaliado e posteriormente purificado por CLAE em modo semi-preparativo (Figuras 20 e 21), com rendimento e pureza de 5,3 mg e 97%, respectivamente. A massa molecular foi avaliada por espectrometria de massas (Figura 22), revelando que, assim como ocorreu com o peptídeo TSHa, esta molécula

também apresentou uma diferença na massa de - 79, equivalente à estrutura da Anf B incompleta acoplada ao TSHd (Anf B*-TSHd). A Anf B obtida durante este processo está em fase de elucidação estrutural (Em elucidação) - (Anf B*-TSHd).

Figura 20: Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Anf B*-TSHd com tempo de retenção de 20,32 minutos com método 5-95% solvente B em 30 minutos no comprimento de onda de detecção de 220 nm em CLAE modo analítico.

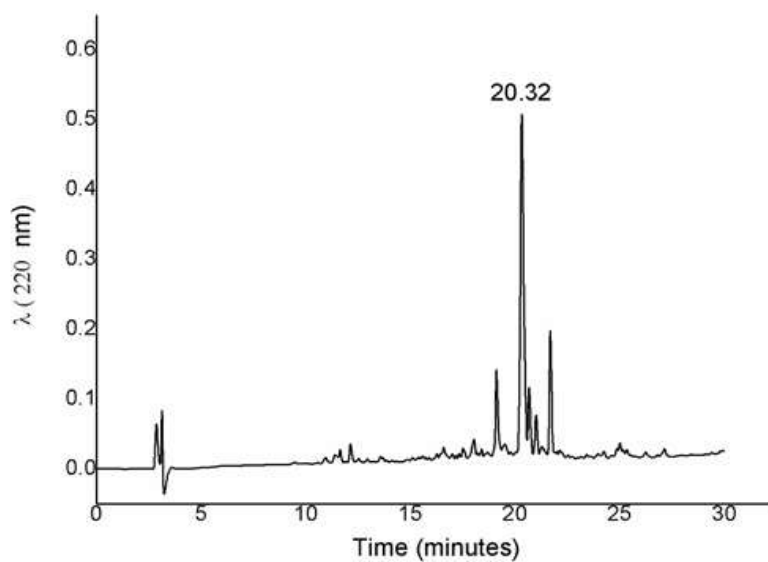


Figura 21: Perfil cromatográfico do peptídeo puro Anf B*-TSHd com tempo de retenção de 20,38 minutos e grau de pureza de 97% em CLAE analítico com método de 5-95% de solvente B em 30 minutos com detecção em 220 nm.

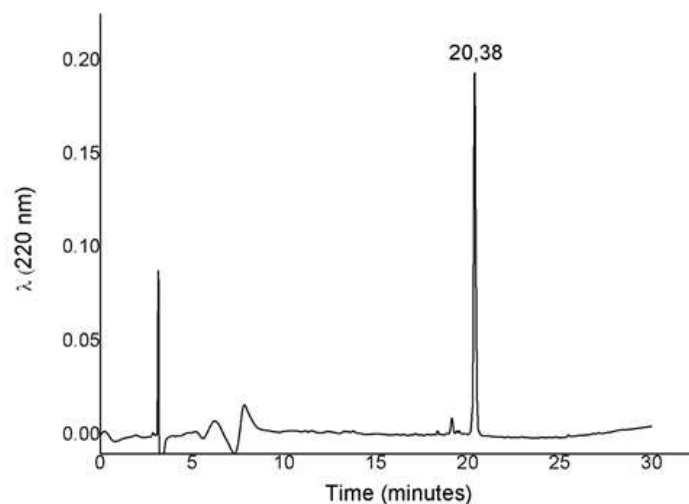
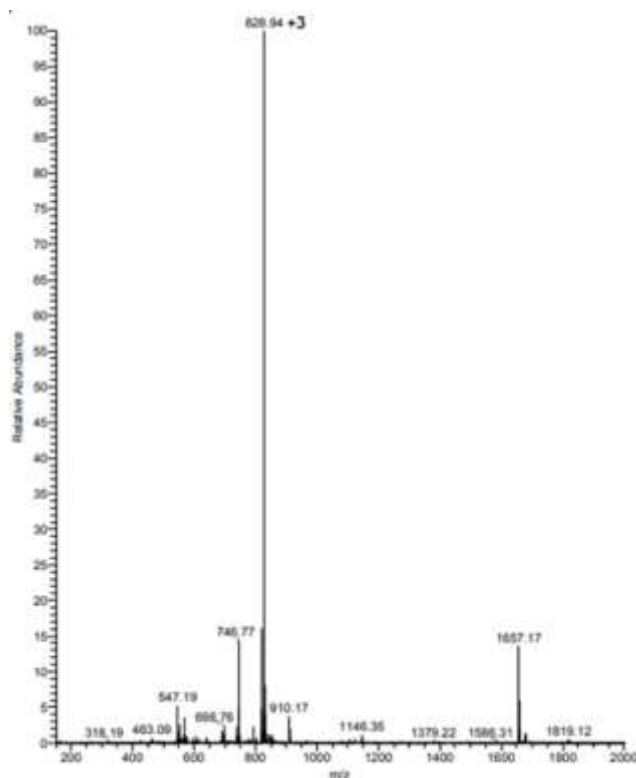


Figura 22: Espectro de massas do peptídeo conjugado Anf B*-TSHd de massa molecular 2563 g mol⁻¹, no entanto a massa molecular identificada foi de 2484 uma diferença de -79 que identifica que parte da estrutura da Anf B foi perdida durante o processo de síntese, foi identificado o íon +828,84. No

espectro também foi identificado a presença do peptídeo sem Anf B, cuja massa molecular é de 1657 g mol⁻¹.



A fim de sanar este problema, a metodologia do acoplamento da Anf B em solução também foi adotada, utilizando-se o ativador BOP e o agente acoplante DIPEA. Nesta estratégia alternativa, a análise de espectrometria de massas revelou que Anf B se ligou à molécula TSHd, no entanto como a sequência do peptídeo apresenta uma lisina que apresenta um grupo amino na com e que sua cadeia lateral, a qual é provável que possa estar ocorrendo apresenta um segundo grupo amino, este também pode se ligar Anf B, levando a um espectro de massas apresentando ionização +3 – 1155.75, o que equivale ao acoplamento de duas moléculas de anfotericina B (Anf B)₂-TSHd, com massa molecular resultante de 3469 g mol⁻¹, o que foi confirmado pela análise de espectrometria de massas (Figura 23). O perfil do peptídeo bruto foi analisado por CLAE analítico no comprimento de onda de 350 nm (Figura 24).

Figura 23: Espectro de massas do peptídeo (Anf B)₂-TSHd a partir da conjugação da Anf B pela metodologia de síntese em solução, do qual pelo espectro de massas foi evidenciado que duas

moléculas de anfotericina se ligaram ao peptídeo TSHd indicando uma massa molecular de 3469 g mol⁻¹.

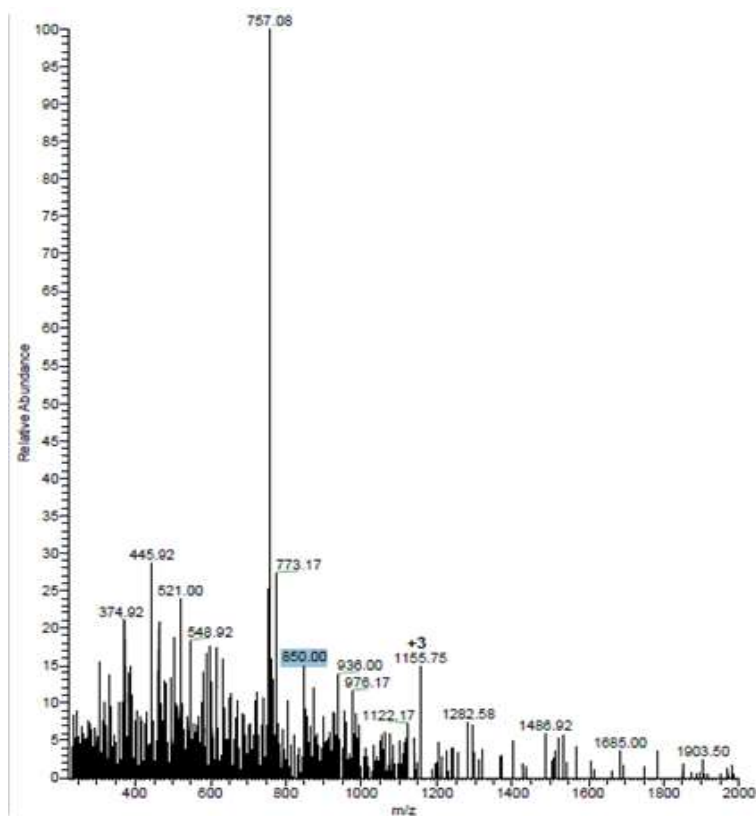
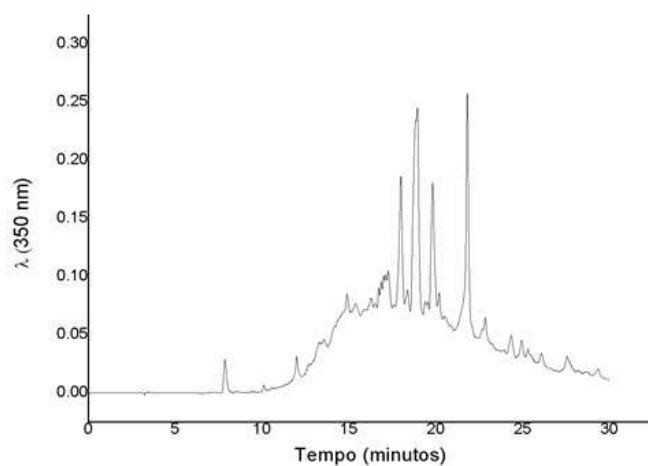


Figura 24: Perfil cromatográfico do peptídeo (Anf B)₂-TSHd por CLAE modo analítico com método de detecção em 350 nm e com um gradiente de 5-95% de solvente b em 30 minutos.



4.1.5. Síntese de Hist 5 e obtenção do bioconjugado Anf B - Hist 5

Após síntese de Hist 5, parte da resina foi separada para posterior acoplamento de Anf B. Importante destacar que devido ao grande número de resíduos com cadeias laterais volumosas, foi necessário realizar mais de um acoplamento para cada resíduo. Para a clivagem utilizou-se 0,1 mmol (455 mg), obtendo-se 150 mg de peptídeo bruto, equivalente a um rendimento de síntese de 49,9%. A massa molecular e os cromatogramas de purificação deste peptídeo se encontram nos Anexo 6 e 7 ao final do processo de purificação e foram obtidos cerca de 13 mg de puro.

A reação de acoplamento foi realizada a partir de 0,1 mmol de peptidil-resina. Desta, obteve-se 150 mg de peptídeo bruto, dos quais foram purificados 70 mg, obtendo-se 8,5 mg de puro e com a massa molar confirmada por espectrometria de massas (Figuras 25 e 26). Os dados referentes a purificação de todos os peptídeos e os bioconjugados estão resumidos na tabela 2.

Figura 25: Perfil do peptídeo puro Anf B-Hist 5 com tempo de retenção de 8,56 minutos.

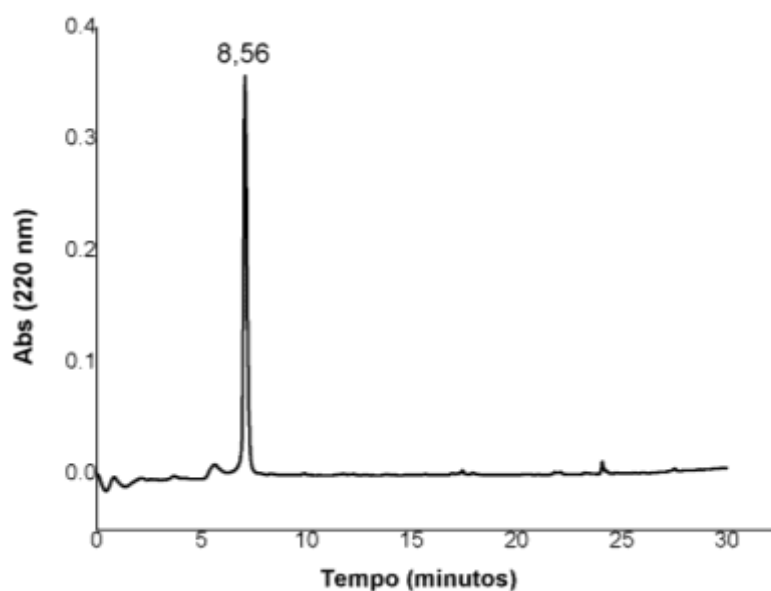


Figura 26: Espectro de massas referente ao peptídeo Anf B-Hist 5, com massa molar de $3942,2 \text{ g mol}^{-1}$, com ionização positiva dos quais estão representados os picos +6-658,50, +8-494,17, +10-395,67.

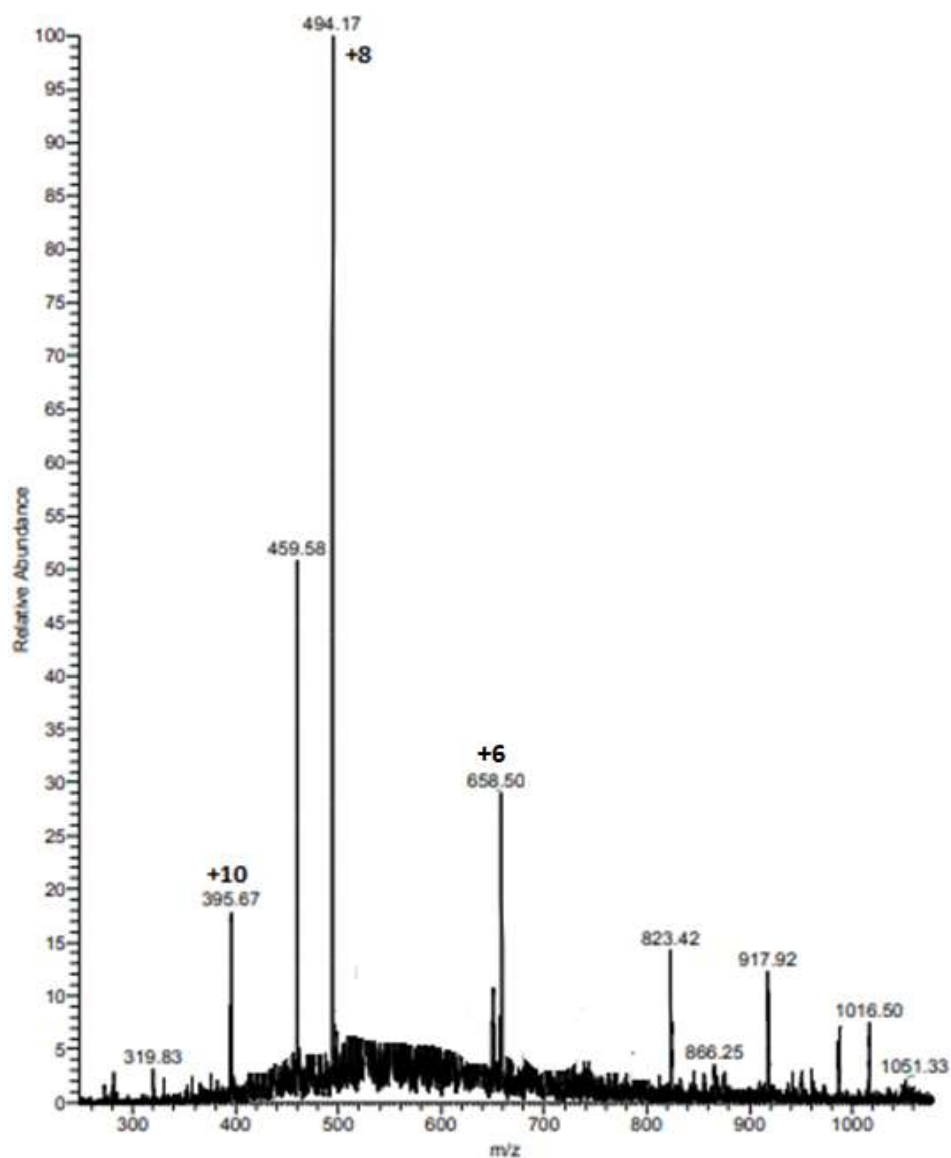


Tabela 2: Dados do processo de purificação dos peptídeos Tsha, Anf B*TSHa, Anf B (RC)-TSHa, (TSHa)₂K, TSHd, Anf B*-TSHd , Hist 5 e Anf B- Hist 5.

Peptídeo	Gradiente de purificação		Massa das Frações Puras (mg)	Pureza (%)
	HPLC preparativo	HPLC analítico		
TSHa- (FLSGIVE MLGKG) -NH ₂	30-70% solvente B em 90 min	35-75 % de solvente B em 15 min.	1 a-3,7 2 a-2,6	99,6 93,6
Anf B*-TSHa- Anf B* - (FLSGIVGMLGKLF)-NH ₂	30-70% solvente B em 90 min	35-75 % de solvente B em 15 min.	1 a- 2,4 2 a- 3,5	93,60 95
Anf B (RC)-TSHa- Anf B (RC)- (FLSGIVGMLGKLF)-NH ₂	30-70% solvente B em 90 min	35-75 % de solvente B em 15 min.	4	96
(TSHa) ₂ K- (FLSGIVGMLGKLF) ₂ K-NH ₂	35-70% solvente B em 90 min	35-80 % de solvente B em 20 min.	8,1	97,7
TSHd- (FLPAALAGIGGILGKLF) -NH ₂	40-75% solvente B em 90 minutos	40-80% solvente b em 15 minutos	1 a- 5,8	97,6
Anf B* TSHd- Anf B *- (FLPAALAGIGGILGKLF) -NH ₂	40-75% solvente B em 90 minutos	40-80% solvente b em 15 minutos	1 a-5,3	97,2
Hist-5 – (DSHAKRHHGYKRKFH EKHSHRGY)	5-35% solvente B em 90 minutos	5-45% solvente B em 15 minutos	1 a-13	98

Anf B-Hist 5-Anf B- (DSHAKRHHGYKRKFH EKHHSHRGY)	10-50 % solvente B em 90 minutos.	20-60% solvente B em 90 minutos.	2 a- 8,5	97,7
---	--	--	----------	------

4.2. Dicroísmo circular

As estruturas secundárias dos peptídeos e bioconjugados foram avaliadas pela técnica de dicroísmo circular.

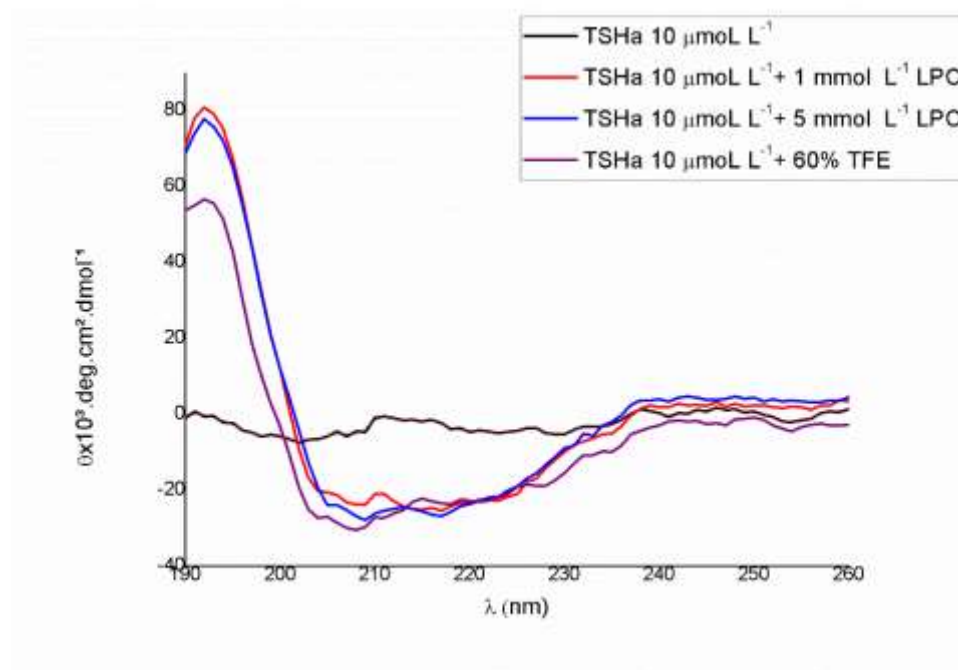
4.2.1. Dicroísmo circular do peptídeo TSHa e bioconjugados

O dicroísmo circular (CD) é utilizado para determinação estrutural de biomoléculas. Por essa técnica é possível obter informações sobre a estrutura secundária de macromoléculas como proteínas, peptídeos, e ácidos nucleicos. Essas moléculas têm em sua composição muitos centros quirais que são unidades opticamente ativas que interagem com a luz incidente circularmente polarizada e alteram sua polarização (MILES; JANES; WALLACE, 2021).

Para avaliar o efeito da adição da Anf B na estrutura secundária do peptídeo TSHa utilizou-se a técnica de CD, na qual os peptídeos foram testados em solução tampão PBS, micelas de LPC e em solução de TFE. O LPC é um surfactante, que apresenta uma única cadeia de hidrocarbonetos, que podem se organizar na forma de micelas, que são estruturas esféricas compostas por grupos lipofílicos orientados para o interior da estrutura e grupos hidrofílicos para o exterior, mimetizando o ambiente existente em membranas. O TFE é um agente estruturante, reconhecido indutor de estrutura secundária. As soluções de peptídeos com concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ tiveram sua estrutura avaliada em concentrações de LPC de 1 e 5 mmol L^{-1} e de solução de TFE 60%.

Para o peptídeo TSHa (Figura 27), o ensaio em PBS exibiu um espectro típico de estrutura desordenada. Na presença de micelas e na solução estruturante TFE houve alta incidência de estrutura α -hélice. Este mesmo comportamento é encontrado em outros peptídeos antimicrobianos (LORENZÓN; SANCHES; NOGUEIRA; BAUAB *et al.*, 2013; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017).

Figura 27: Espectros de CD do peptídeo TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo foi avaliado com concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS.



Para os peptídeos bioconjugados Anf B* -TSHa e Anf B (RC)-TSHa, foi observado em PBS espectros característicos de estrutura desordenada, semelhante ao peptídeo sozinho (Figura 28 e 29). No caso do peptídeo Anf B* -TSHa, na presença de LPC e da solução estruturante TFE foi observado um espectro típico α -hélice, no entanto para Anf B (RC)-TSHa nas condições descritas o espectro de CD obtido foi típico de estruturas desordenadas.

Figura 28: Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo foi avaliado com concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS. Espectros de CD do peptídeo Anf*B-TSHa em PBS, LPC e TFE.

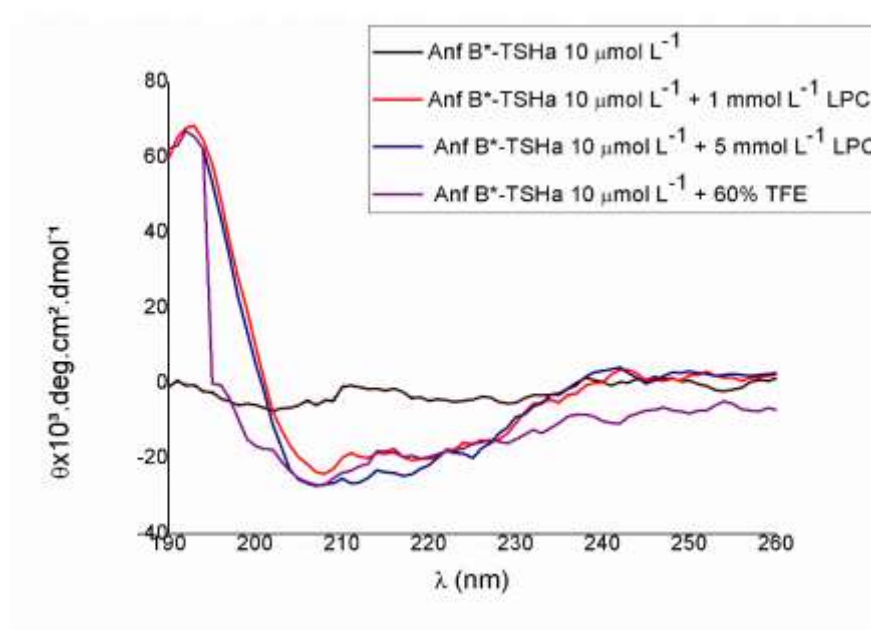
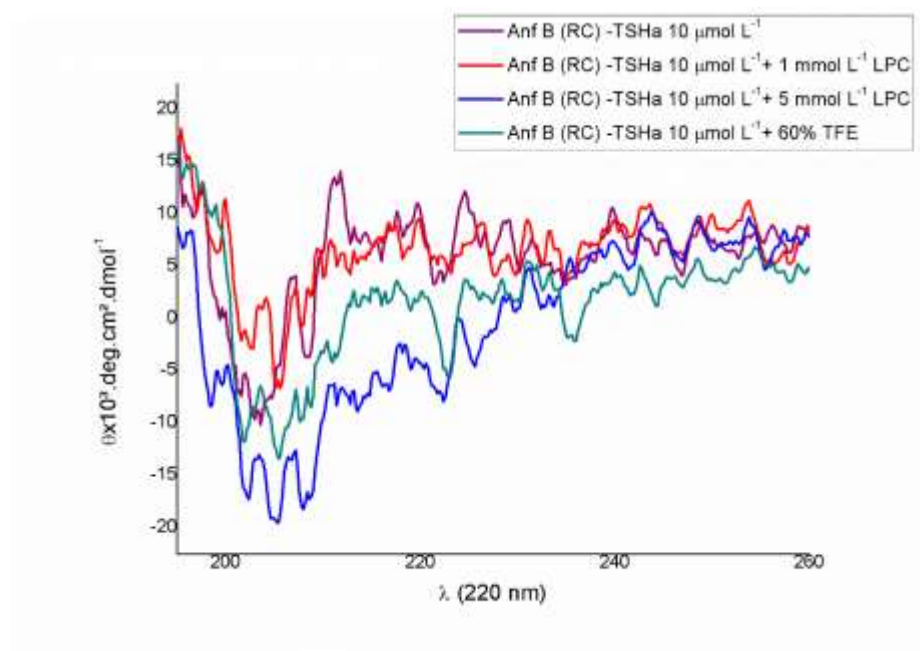


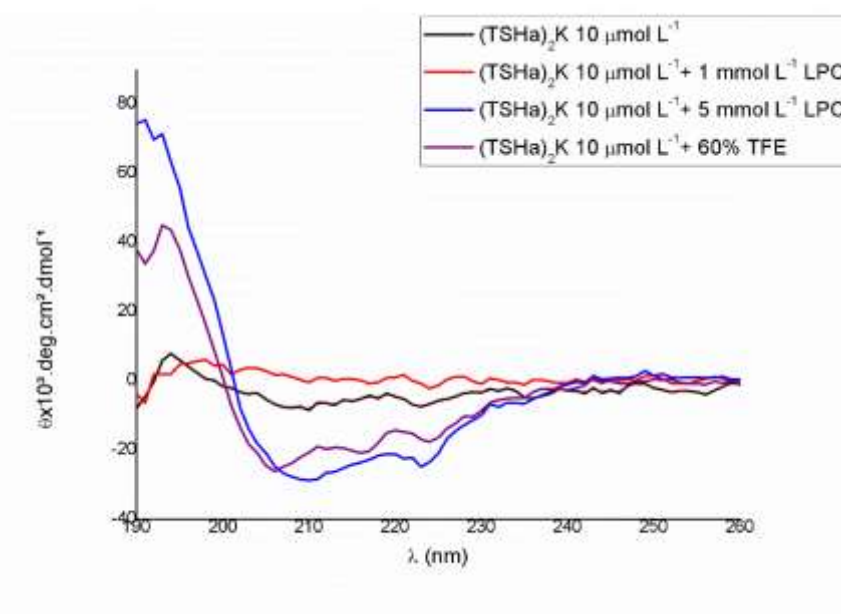
Figura 29: Espectros de CD do peptídeo Anf B (RC)-TSHa em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo foi avaliado com concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS. Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHa em PBS, LPC e TFE.



Um ponto a se ressaltar é que a estrutura em α -hélice obtida com o peptídeo TSHa e o bioconjugado Anf B*-TSHa é bem caracterizada com bandas negativas em 208 e 222 nm e uma positiva em torno de 195 nm (BROMLEY; CHANNON, 2011; VICENTE; NOBRE-PAVINATTO; PAVINATTO; DE OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2015).

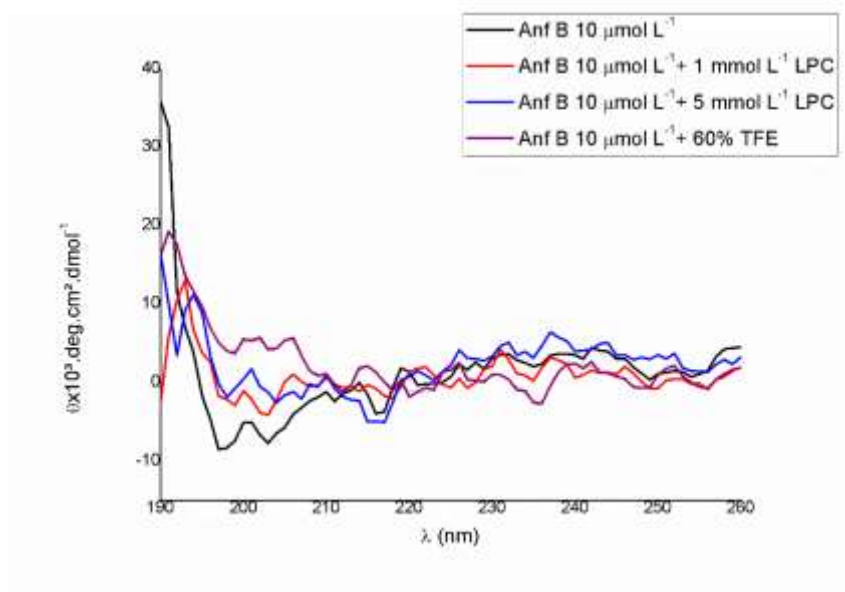
Para o peptídeo dímérico (TSHa)₂K na presença do tampão PBS e na concentração de 1 mmol L⁻¹ de LPC foi possível verificar um espectro característico de estrutura desordenada (Figura 30). Já para a concentração de 5 mmol L⁻¹ e na presença de 60% de TFE, o espectro indica a estruturação em α -hélice. Pode-se atribuir a diferença os diferentes espectros de CD para as diferentes concentrações de LPC, pelo fato de a concentração de 1 mmol L⁻¹ ser abaixo da concentração micelar crítica (CMC), enquanto que, em 5 mmol L⁻¹, a CMC já foi atingida.

Figura 30: Espectros de CD do peptídeo dímérico (TSHa)₂K em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo foi avaliado com concentração de 10 μ mol L⁻¹ dissolvidos em PBS.



Os ensaios de dicroísmo circular também foram realizados com a droga Anf B, no qual está apresentou em todas condições avaliadas um espectro de CD típico de estrutura desordenada (Figura 31).

Figura 31: Espectros de CD da Anf B em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O composto Anf B foi utilizado na concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS.



4.2.2. Dicroísmo circular peptídeo TSHd e bioconjugado

Os ensaios em PBS e TFE mostraram que o peptídeo TSHd exibe um espectro de estrutura desordenada com uma leve contribuição de α -hélice. Na presença de micelas (5 mmol L⁻¹) é possível observar uma alta incidência de estrutura α -hélice (Figuras 32 e 33) (ABBASSI; RAJA; OURY; GAZANION *et al.*, 2013).

Figura 32: Espectros de CD do peptídeo TSHd em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo TSHd foi utilizado na concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS.

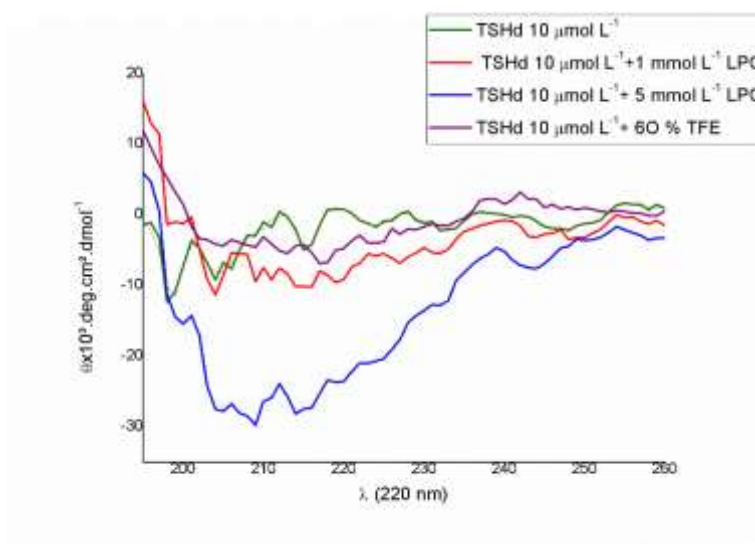
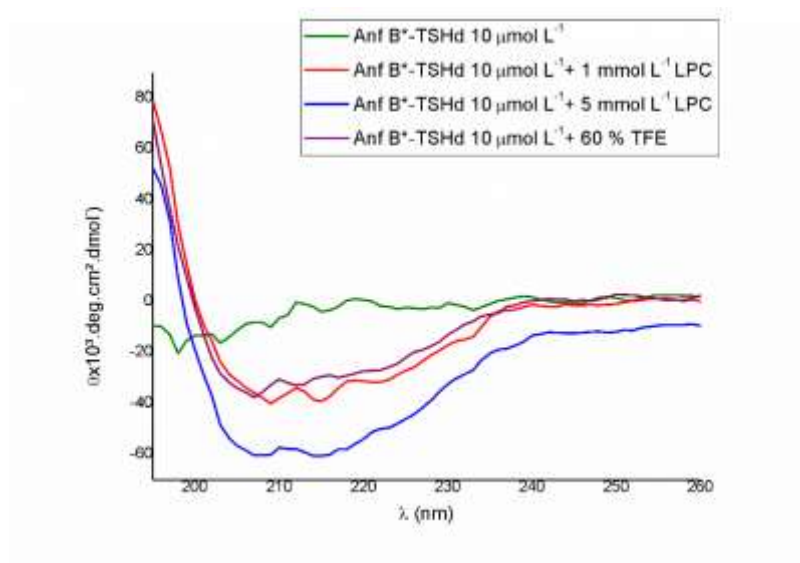


Figura 33: Espectros de CD do peptídeo Anf B*-TSHd f B em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo TSHd foi utilizado na concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS.



O peptídeo ligado à Anf B, com exceção da solução de PBS, mostrou estruturação em α -hélice, com o maior teor de α -hélice encontrado na maior concentração de LPC.

4.2.3. Dicroísmo circular peptídeo Hist 5 e bioconjugado

Os estudos dos peptídeos Hist 5 e Anf B-Hist 5 em PBS e na concentração de LPC de 1 mmol L⁻¹ revelaram um espectro típico de estruturas desordenadas (Figura 34 e Figura 35).

Para a concentração de 5 mmol L⁻¹ o peptídeo Hist 5 continuou apresentando uma estrutura desordenada, somente apresentando uma estruturação na presença de TFE. O acoplamento da Anf B ao peptídeo propiciou um aumento da estruturação do peptídeo α -hélice.

Figura 34: Espectros de CD do peptídeo Hist 5 em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo Hist 5 foi utilizado na concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS.

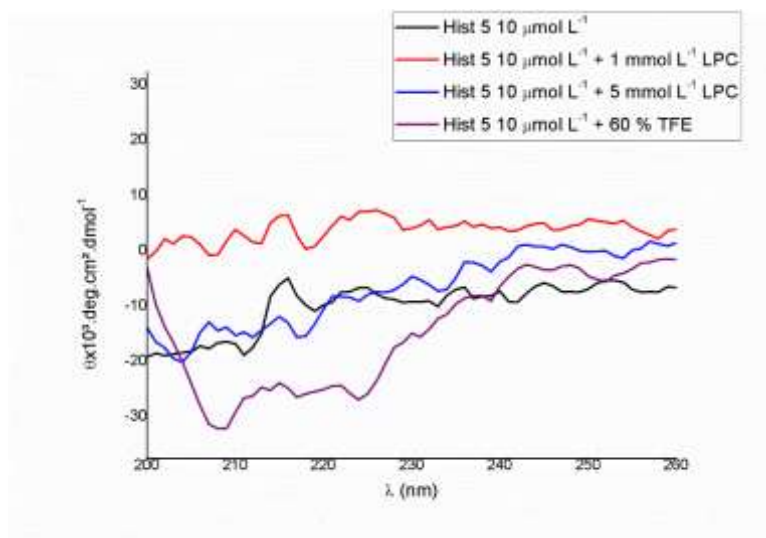
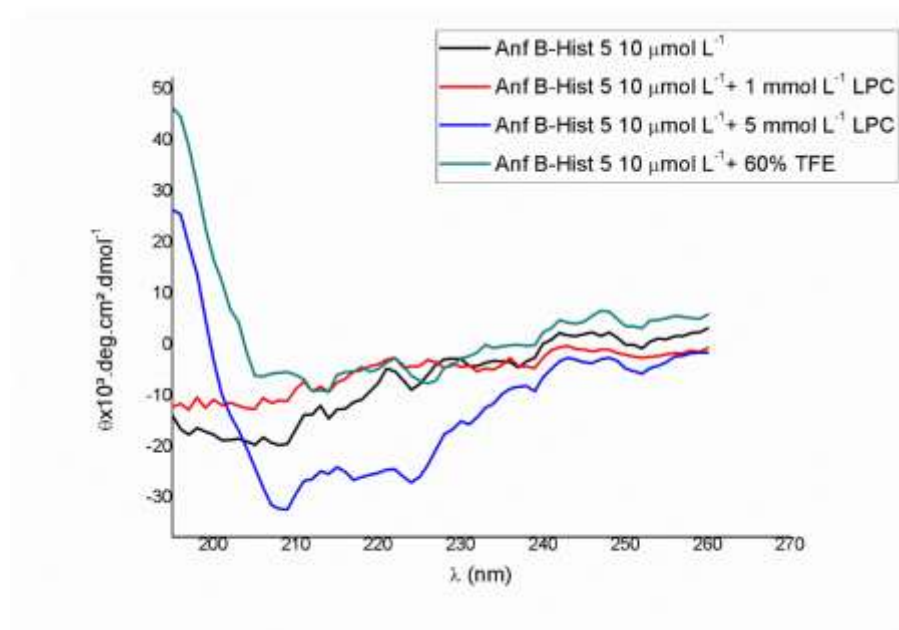


Figura 35: Espectros de CD do peptídeo Anf B-Hist 5 em solução de PBS, LPC nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹ e em solução de TFE 60%. O peptídeo Anf B-Hist 5 foi utilizado na concentração de 10 μmol L⁻¹ dissolvidos em PBS.



4.3. Ensaios biológicos: Citotoxicidade e Atividade Leishmanicida

Os peptídeos TSHa, TSHd e Hist 5 apresentaram, como descrito anteriormente (ABBASSI; RAJA; OURY; GAZANION *et al.*, 2013; LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017), atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum*, *T. cruzi* e *T. brucei*, nosso trabalho que estes peptídeos apresentam atividade contra *L. mexicana* com baixa citotoxicidade e boa seletividade (Tabela 3) quando comparados à anfotericina B. Importante ressaltar que os peptídeos bioconjugados Anf B*-TSHa, Anf B (RC) -TSHa, Anf B*-TSHd, Anf B-Hist 5 e o dímero (TSHa)₂K apresentaram maiores valores de seletividade, mostrando que as estratégias adotadas de bioconjugação e dimerização são relevantes (Tabela 3).

O fármaco Anf B é um agente no tratamento de diversas infecções, inclusive para leishmaniose cutânea, no entanto esta molécula apresenta efeitos colaterais e toxicidade descritos. A Anf B pode causar efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos, calafrios, febre, hipertensão ou hipotensão e hipóxia e além disso uma grande índice de nefrotoxicidade dos quais as manifestações clínicas da nefrotoxicidade da Anf B incluem insuficiência renal, hipocalemia, hipomagnesemia, acidemia metabólica e poliúria devido ao diabetes insípido nefrogênico, a partir disso fica evidente que a bioconjugação da Anf B aos peptídeos e a estratégia da dimerização diminuiu a citotoxicidade desses compostos frente a Anf B, aumentando consideravelmente a seletividade dos mesmos (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Outro dado importante é que mesmo após o tratamento das formas amastigotas estendido para 48 horas, todos os compostos testados mantiveram sua atividade biológica, com alta seletividade para o parasita e não para a célula do hospedeiro, isto é identificado pelo alto índice de seletividade dos compostos e principalmente os bioconjugados (Tabela 3).

Tabela 3: Dados dos ensaios biológicos realizados com *L. mexicana*: ensaios anti-promastigota, anti-amastigota dos quais foi determinado o IC_{50} (que é concentração capaz de matar 50% dos parasitos) e citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais de camundongos Swiss dos quais foram determinados o CC_{50} (concentração capaz de matar 50% das células) e o índice de seletividade IS (que é a razão do CC_{50} pelo IC_{50} em amastigotas, que indica o quanto os compostos são seletivos aos parasitas e não os hospedeiros).

Compostos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) promastigota	IC ₅₀ amastigota (μmol L ⁻¹) - 24h de tratamento	IC ₅₀ amastigota (μmol L ⁻¹) - 48h de tratamento	CC ₅₀ (μmol L ⁻¹) macrófagos peritoneais	IS amastigota (Índice de seletividade) - 24 horas de tratamento	IS amastigota (Índice de seletividade) -48 horas de tratamento
TSHa	6,3 ± 0,85*	5±0,05*	8,1±0,45*	>1000 ± 0,01*	>200	>123
Anf B*-TSHa	2,7±0,69*	1,6±1,41*	1,45±0,12*	>1000±0,03*	>645	>689
Anf B (RC) - TSHa	0,3±0,06*	0,31±0,05*	0,25±0,07*	>1000±0,06*	>3225	>4000
(TSHa) ₂ K	0,6±0,08*	0,58±0,01*	0,47±0,08*	>1000±0,06*	>1724	>2127
TSHd	2,2 ± 0,10*	7,2±0,24*	2±0,15*	100 ±0,05 *	14	50

Anf B*-TSHd	0,4±0,07*	0,95±0,1*	0,90±0,15*	>1000±0,009*	1052	>1112
Hist 5	4,0 ± 0,95*	8,0±2,2*	5,6±0,92*	>1000 ± 0,04*	125	>178
Anf B-Hist 5	0,8 ± 0,20*	0,4±0.05*	0,2±0.04*	>1000 ± 0,01*	2500	>5000
Anfotericina B	0,5±0,21*	0,63± 1,2 *	0,63± 1,2 *	24 ±0,02*	38	38

*Desvio Padrão

Outro dado importante que já pode ser identificados com os experimentos biológicos é que houve uma diminuição do índice de infecção (porcentagem de células infectadas x número de parasitas por células infectadas) em relação aos controles e também quando comparamos os peptídeos base do trabalho com os bioconjugados, mesmos aqueles quais a Anf B não teve sua estrutura completa acoplada ao peptídeo ou no caso do peptídeo TSHa que ao acoplar em solução a Anf B formou uma reação colateral no processo (Figuras 36,37 e 38) o mesmo ocorreu também após 48 horas de tratamento (Figuras anexas 9,10,11).

Para todos os bioconjugados houve uma diminuição do índice de infecção em 6,5 vezes na maior concentração testada em comparação às células infectadas que não foram tratadas e em comparação com a droga controle Anf B o índice de infecção foi diminuído em até 3,5 vezes e além disso o bioconjugado que foi responsável por causar a menor redução do índice de infecção foi o bioconjugado Anf B-Hist 5 (Figura 37).

Durante o processo de infecção, os amastigotas se replicam dentro dos macrófagos e são transmitidos para células saudáveis, levando à amplificação da infecção e para isso há transferência de amastigotas de células infectadas para células saudáveis (OUALHA; BARHOUMI; MARZOUKI; HARIGUA-SOUIAI *et al.*, 2019).

Dados da literatura mostram que peptídeos antimicrobianos foram capazes de diminuir o índice de infecção em *L. amazonensis*, no qual destacamos o peptídeo Filoseptina-1, (PS1), todos os bioconjugados obtidos neste trabalho e o efeito assim como para o peptídeo PS1 a ação dos peptídeos em amastigotas foram concentração dependente, quanto maior a concentração testada maior foi a diminuição do índice de infecção (KÜCKELHAUS; AQUINO; BORGES; MOREIRA *et al.*, 2020).

Podemos sugerir que os efeitos dos bioconjugados nos amastigotas devem ocorrer dentro dos vacúolos parasitóforos, os compostos devem interagir com as membranas celulares dos macrófagos e posteriormente com a membrana celular do parasita. Pode haver alterações no fluxo de sódio e potássio e consequente aumento do volume celular e ruptura da célula do parasita, através de mecanismos de ação na membrana por formação de poro ou por carpet like (EL AMRI; LACOMBE;

ZIMMERMAN; LADRAM *et al.*, 2006; KÜCKELHAUS; AQUINO; BORGES; MOREIRA *et al.*, 2020).

Outro mecanismo que pode explicar essa diminuição do índice de infecção é a interferência dos bioconjugados nas vias metabólicas do parasita, como exemplo três análogos de magainina (MG-H1,-H2 e MG-F5W magainin-2) mostraram que esses peptídeos diminuem a produção de ATP em um padrão dose-dependente em culturas de *Leishmania donovani*, causando a morte de parasitas (GUERRERO; SAUGAR; MATSUZAKI; RIVAS, 2004).

Figura 36: Efeito *in vitro* Anf B*-TSHa X Anf B (RC)- TSHa X (TSHa)₂K X TSHa X Anf B amastigotas intracelulares de *L. mexicana*. O índice de infecção foi calculado após 24 h de tratamento com os IC₅₀ de cada composto. O controle negativo é amastigota intracelulares de *L. mexicana* não tratadas e os tratamentos são com os peptídeos e Anf B, as concentrações representadas são 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados são expressos como médias mais os desvios padrão (DP) para 3 experimentos independentes com análise Anova Two-Way ($P < 0,05$). No qual um (*) indica diferenças estatísticas entre os compostos testados (*) e (**) indicam diferença estatística entre as concentrações testadas em relação ao controle positivo (Sem Tratamento) e entre os compostos testados.

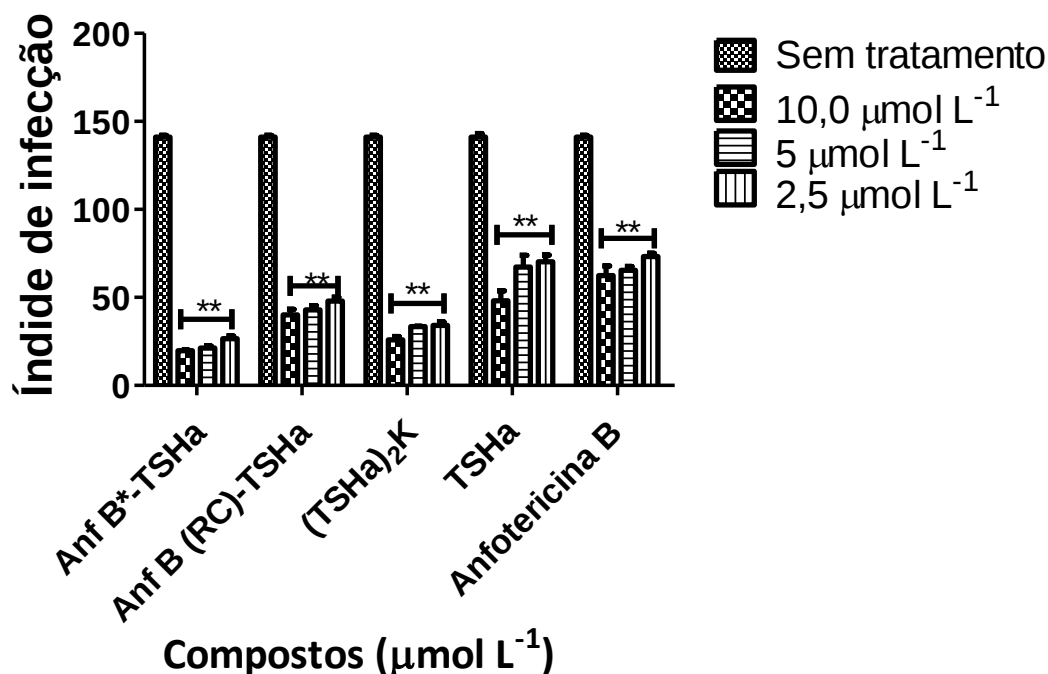


Figura 37: Efeito in vitro Anf B-Hist 5 X Hist 5 X Anf B em amastigotas intracelulares de *L. mexicana*. O índice de infecção foi calculado após 24 h de tratamento com os IC₅₀ de cada composto. O controle negativo é amastigota intracelulares de *L. mexicana* não tratadas com os peptídeos, as concentrações representadas são 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados são expressos como médias mais os desvios padrão (DP) para 3 experimentos independentes com análise Anova Two-Way ($P < 0,05$). No qual um (*) indica diferenças estatísticas entre os compostos testados (*) e (**) indicam diferença estatística entre as concentrações testadas em relação ao controle positivo (Sem Tratamento) e entre os compostos testados.

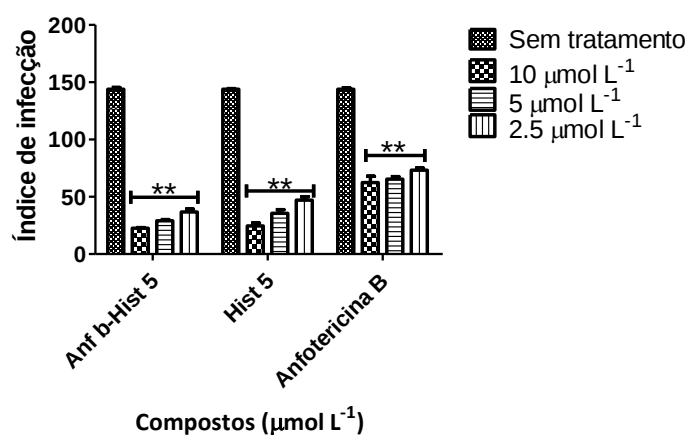
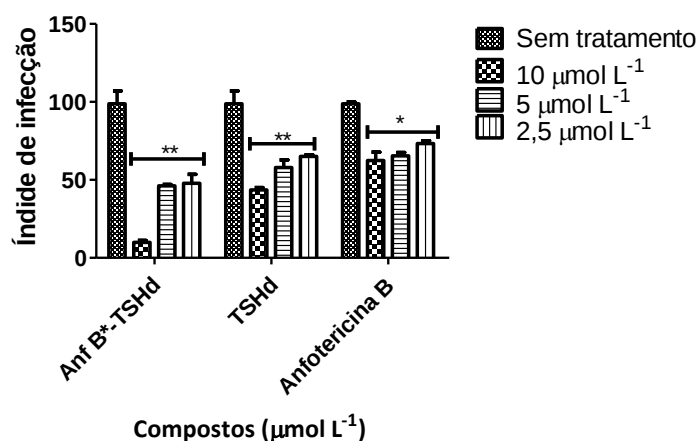


Figura 38: Efeito in vitro Anf B*-TSHd X TSHd X Anf B em amastigotas intracelulares de *L. mexicana*. O índice de infecção foi calculado após 24 h de tratamento com os IC₅₀ de cada composto. O controle negativo é amastigota intracelulares de *L. mexicana* não tratadas com os peptídeos, as concentrações representadas são 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados são expressos como médias mais os desvios padrão (DP) para três experimentos independentes com análise Anova Two-Way ($P < 0,05$). No qual um (*) indica diferenças estatísticas entre os compostos testados (*) e (**) indicam diferença estatística entre as concentrações testadas em relação ao controle positivo (Sem Tratamento) e entre os compostos testados.



4.4. Estudo de mecanismo de ação dos bioconjugados com Anf B

Com bases nos ensaios biológicos, temos que os temos que os peptídeos em estudo possuem carga positiva, facilitando a interação com parasitas na sua forma intracelular por forças eletrostáticas, i.e., os peptídeos podem ter sua permeação facilitada através da membrana plasmática da célula hospedeira, bem como a do vacúolo parasitóforo, podendo atingir o seu alvo final, o parasita intracelular (GELHAUS; JACOBS; ANDRÄ; LEIPPE, 2008). A Anf B conjugada aos peptídeos pode, ainda, estar amplificando a potência dos peptídeos em estudo, já que esta é capaz de alterar a permeabilidade da membrana do parasita, podendo desencadear um à morte celular (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; SAHA; MUKHERJEE; BHADURI, 1986). Além do mecanismo de poros os peptídeos conjugados podem, ainda, estar redistribuindo componentes da membrana, tais como esteróis, formação de microdomínios fosfolipídicos específicos, ou mesmo interação direta com proteínas de membrana e alteração de sua função. (MARTINS; VIEIRA; FADEL; SANTANA et al., 2017) e ressaltamos ainda o ganho na seletividade que todos os bioconjugados apresentaram tanto para a forma promastigota quanto a amastigota, frente a droga controle anfotericina B.

A fim de entender o tipo de interação com as membranas biológicas e permeação dessas moléculas, foram realizados estudos de permeabilização de membrana com LUVs, ensaios de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência confocal e de fluorescência, como descritos a seguir.

4.4.1. Ensaios de permeabilização de vesículas

4.4.1.2 Peptídeo TSHa e bioconjugados

Um dos fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose é a Anf B, o qual possui como mecanismo de ação em *Leishmania* a afinidade por membranas com ergosterol. Este medicamento se liga ao ergosterol e forma poros na membrana do parasita, afetando a permeabilidade celular, levando à perda de cátions como o K^+ , e desencadeia um processo de morte celular (SHIRZADI, 2019). No entanto, os parasitas vêm desenvolvendo mecanismos de resistência a Anf B, além disso este fármaco apresenta problemas de toxicidade e efeitos colaterais para os pacientes, o

que exige o desenvolvimento de tratamentos mais seletivos para o parasita e com menor toxicidade.

Para isto está sendo desenvolvida a estratégia da bioconjugação com peptídeos antimicrobianos, que possuem afinidade pela membrana dos parasitas. Esperamos que estes compostos aumentem a seletividade em relação à Anf B e quem sabe a potência da mesma.

Para entender a ação dos peptídeos sobre a membrana lipídica e relacionar com o seu mecanismo de ação, foram realizados ensaios de vazamento de carboxifluoresceína (CF) interiorizada em miméticos de membrana. Neste ensaio foram utilizadas vesículas de POPC: Colesterol (COL) (5:1) e POPC:POPS (Fosfatidilserina): Ergosterol (1:13:3) todas com CF encapsulada em seu interior.

Esses miméticos de membrana foram planejados considerando que a composição de fosfolipídios e esteroides da membrana da *Leishmania* variam em relação à membrana do hospedeiro (DOS SANTOS; MUXEL; ZAMPIERI; POMORSKI *et al.*, 2013; OLIVEIRA; FIGUEIREDO; REZENDE; VERANO-BRAGA *et al.*, 2020). A membrana celular da *Leishmania* é formada principalmente por fosfolipídios de carga negativa, sendo os principais o fosfatidilinositol, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina, os quais são ancorados ao glicocálix. Outro ponto importante é que a constituição desta membrana varia de acordo com a morfologia do parasita e o seu estágio de desenvolvimento, sendo mais negativa que a membrana celular de mamíferos, o que permite que os PAMs catiônicos se liguem mais facilmente (CABEZAS; LEGENTIL; ROBERT-GANGNEUX; DALIGAULT *et al.*, 2015).

Todos os estudos foram baseados na membrana da forma promastigota, que é caracterizada por conter principalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e ergosterol, além de diglicerídeos e glicolipídios contendo manose e galactose (DUEÑAS-ROMERO; LOISEAU; SAINT-PIERRE-CHAZALET, 2007). Na forma amastigota de *Leishmania*, há maior concentração de ácidos graxos e colesterol, enquanto os triglicerídeos e o ergosterol diminuem durante a transição entre promastigotas para amastigotas. Com relação às classes de fosfolipídios, encontramos maior proporção de esfingomielina e fosfatidilserina e menor proporção de fosfatidilinositol e lisofosfatidiletanolamina (BOUAZIZI-BEN MESSAOUD; GUICHARD; LAWTON; DELTON *et al.*, 2017).

A ação do peptídeo TSHa nas vesículas de POPC:COL, que mimetizam a membrana da célula hospedeira (Macrófagos), na concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não

apresentou liberação de CF, enquanto na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a permeabilização foi cerca de 38. Quando comparamos com o bioconjugado Anf B*-TSHa em ambas as concentrações testadas, a permeabilização aumentou para cerca de 50% de liberação de CF (Figuras 38 e 39). Estes dados demonstram que a bioconjugação potencializou a interação com a membrana dos peptídeos na membrana. Em miméticos de membrana de *Leishmania* POPC:POPS:Ergosterol houve maior permeabilização para todos os compostos testados. No caso do bioconjugado Anf B*-TSHa a liberação de CF foi de quase 100%, mostrando que o acoplamento da Anf B ao peptídeo TSHa potencializou a permeabilização desse peptídeo.

Figura 38: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos TSHa e Anf B*-TSHa em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

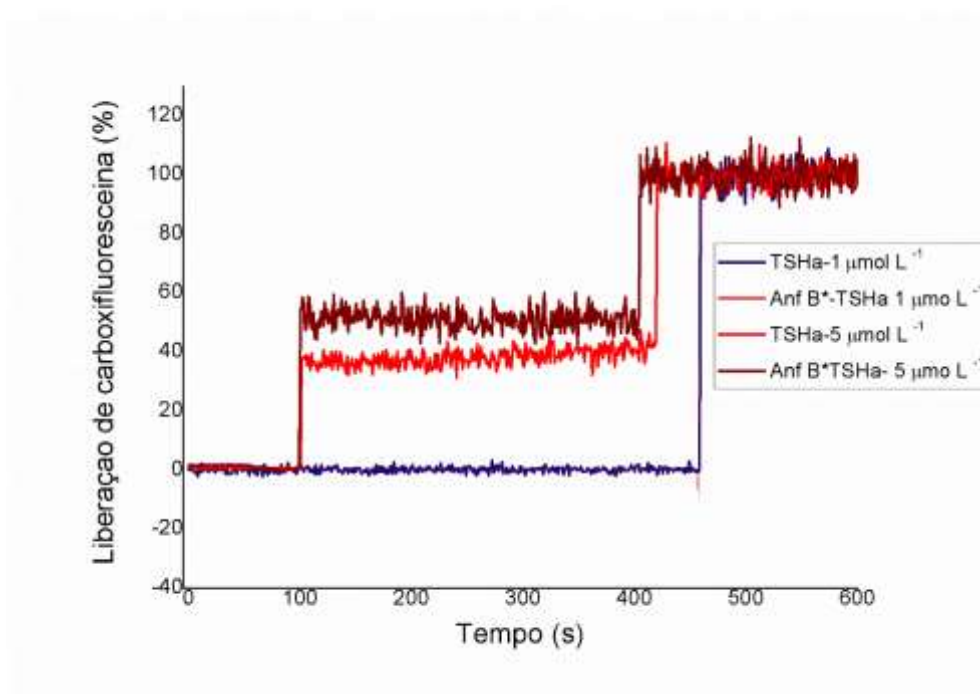
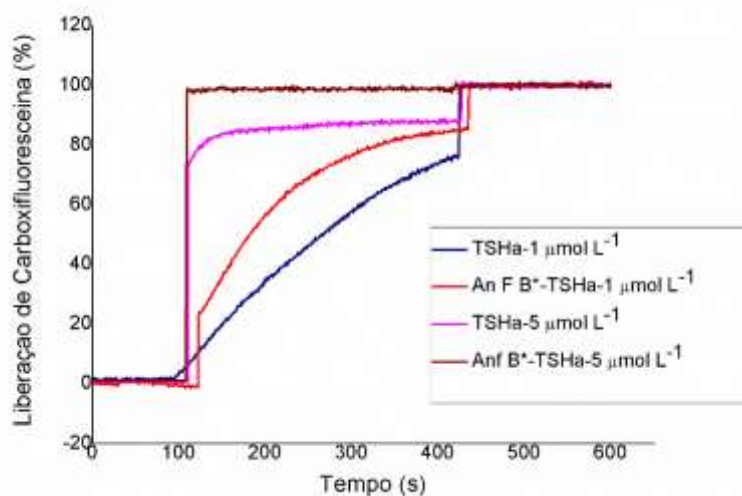


Figura 39: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelos peptídeos TSHa e Anf B*- TSHa em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Os resultados também mostraram uma dependência entre a concentração e a liberação de CF. Essa dependência está associada com o mecanismo de ação por formação de poros, quanto mais peptídeo – maior a quantidade de poros é maior (RUSSELL; KENNEDY; SPUCHES; VENUGOPAL *et al.*, 2010).

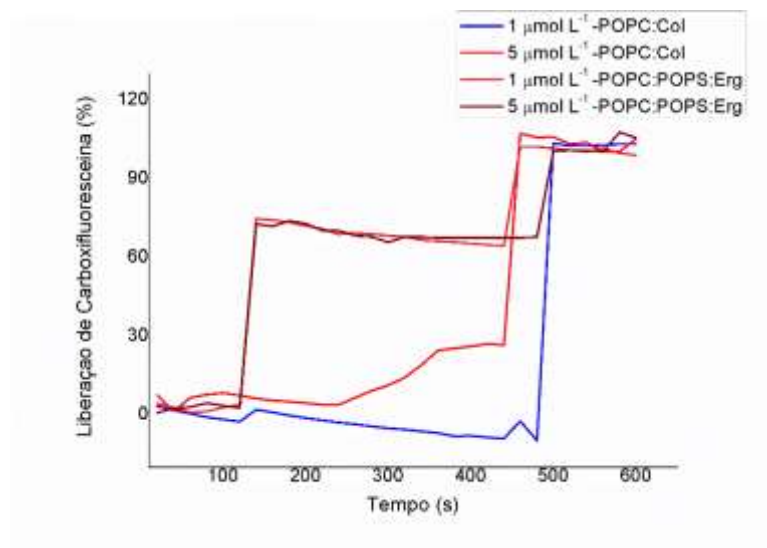
Outro ponto importante já descrito pela literatura é que a estrutura em alfa hélice dos peptídeos da classe das temporinas permite que estas interajam com a membrana promovendo sua permeabilização por meio da formação de poros toroidais e agregados de canais. Em altas concentrações esses peptídeos podem agir por meio do mecanismo denominado de carpete like (MANGONI; SAUGAR; DELLISANTI; BARRA *et al.*, 2005; ZHAO; RINALDI; DI GIULIO; SIMMACO *et al.*, 2002), que é a dissolução da membrana por meio da formação de estruturas micelares como se fosse um detergente.

Os dados obtidos sugerem que o acoplamento da Anf B ao peptídeo TSHa torna estes compostos mais seletivos as vesículas que mimetizam a membrana do parasita. A seletividade deve ocorrer devido a presença dos lipídios de carga negativa nas vesículas que mimetizam a membrana do parasita, permitindo que a temporina TSHa e o bioconjugado Anf B*-TSHa, que possuem carga parcial positiva, interajam mais fortemente com a membrana do parasita em relação ao hospedeiro. Estes se

acumulam no folheto externo da bicamada e posteriormente se organizam em microdomínios na bicamada, afetando a permeabilidade da membrana, o que acarreta a liberação da CF (ANDRÉ; RAJA; HUMBLLOT; PIESSE *et al.*, 2020; BELLAVITA; FALANGA; BUOMMINO; MERLINO *et al.*, 2020; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017; ZHAO; RINALDI; DI GIULIO; SIMMACO *et al.*, 2002).

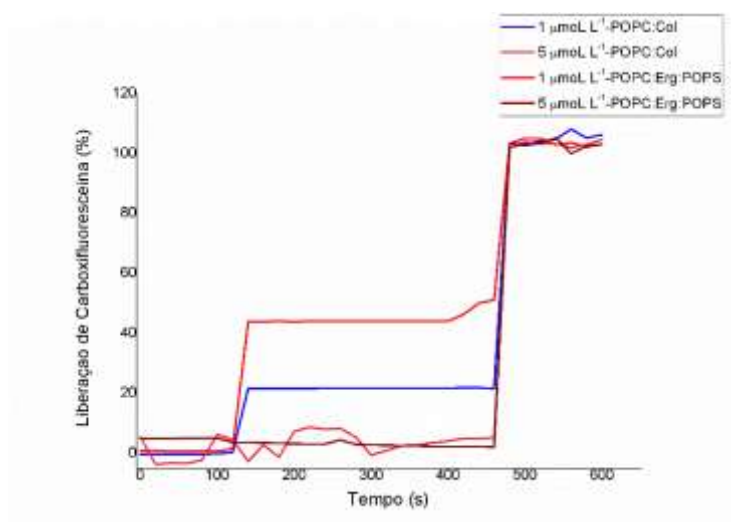
O bioconjugado AnfB (RC)-TSHa quando em contato com miméticos de membrana de células de mamíferos promoveu a liberação de cerca de 30% de CF, e quando em contato com vesículas miméticas de *Leishmania*, este valor aumentou para 100% nas concentrações testadas de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 40), o que sugere uma maior interação com a membrana, podendo ser independente da concentração e acarretando o mecanismo chamado de carpet like. Neste mecanismo, o peptídeo pode estar sendo adsorvido na superfície da vesícula e orientando-se paralelamente à esta, e quando a concentração superficial atinge um valor crítico, este rompe a integridade da estrutura vesícula levando ao colapso da membrana e vazamento da CF (LI; KOH; LIU; LAKSHMINARAYANAN *et al.*, 2017). O mecanismo carpet like ("carpet-like") foi descrito para outros peptídeos antimicrobianos como a aureína e cecropina, os quais mostraram uma atividade leishmanicida (AVCI; AKBULUT; OZKIRIMLI, 2018; FERNANDEZ; LE BRUN; WHITWELL; SANI *et al.*, 2012). Além disso, outros peptídeos da classe das temporinas também apresentaram o mecanismo de carpet like quando testados em alta concentração, como a temporina A e B que apresentaram atividade leishmanicida frente à *L. mexicana* e seletividade com vesículas de carga negativa, como as da forma promastigota do parasita. (CHADBOURNE; RALEIGH; ALI; DENNY *et al.*, 2011; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017).

Figura 40: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Anf B (RC)- TSHa em vesículas de POPC:COL (5:1) e POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



O peptídeo dimérico $(\text{TSHa})_2\text{K}$ também foi capaz de permeabilizar as vesículas de POPC: POPS: Ergosterol, nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com taxa de liberação de 20 e 45% de CF (Figura 41), respectivamente, sendo concentração dependente, isto é, mecanismo de formação de poros e similar ao descrito para o peptídeo TSHa.

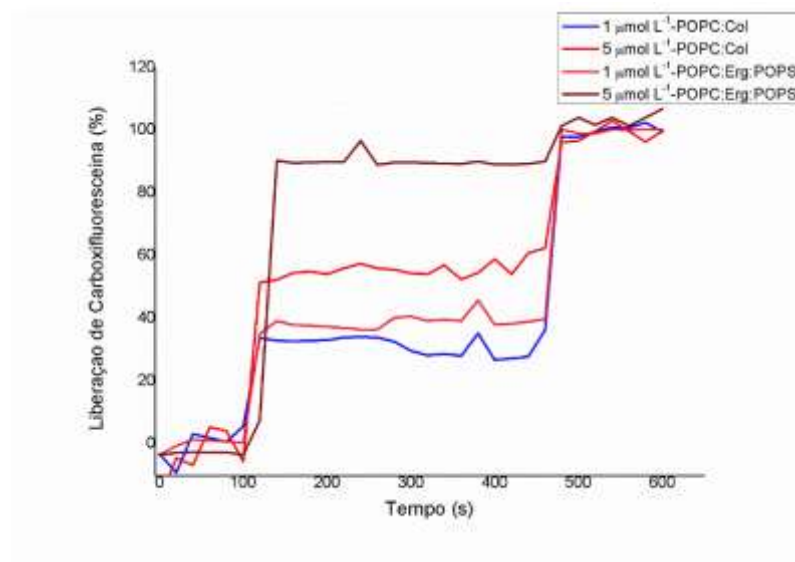
Figura 41: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo $(\text{TSHa})_2\text{K}$ em vesículas de POPC: COL (5:1) e POPC:POPS:Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Os estudos de permeabilização também foram realizados com o composto Anf B, sendo verificado danos em ambas as vesículas testadas (Figura 42), com valores maiores em POPC:COL que as obtidas para os peptídeos, indicando menor seletividade entre os dois tipos de vesículas testadas. Outro ponto importante é que Anf B é descrita por levar a formação de poros na membrana do parasita, levando à sua morte, batendo com a dependência da permeabilização em função da concentração (MBONGO; LOISEAU; BILLION; ROBERT-GERO, 1998; SHIRZADI, 2019).

Isto posto, a associação destes estudos realizados com membranas miméticas com os dados de seletividade sugere que a conjugação do peptídeo TSHa com a Anf B pode estar contribuindo para a maior seletividade do composto, já que a seletividade dos conjugados foi pelo menos 100 vezes maior que aquele apresentado pela Anf B (Tabela 3).

Figura 42: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo composto Anf B em vesículas de POPC:COL (5:1) e POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$



4.4.1.3. Peptídeo TSHd e bioconjugados.

O peptídeo TSHd e o seu bioconjugado Anf B*-TSHd conforme descrito em nossos resultados anteriores, possuem uma atividade leishmanicida com baixa

citotoxicidade e um alto valor de IS > 1000, mostrando ser mais seletivo para o parasita que para as células hospedeiras.

O peptídeo TSHd e seu bioconjugado quando testados com as vesículas POPC:COL apresentaram um baixo valor de liberação de CF sendo de no máximo de 2,5% para o peptídeo TSHd e de 5% para o bioconjugado (Figuras 43 e 44). Isto é corroborado pelo fato de pertencer à classe das temporinas, cujo principal mecanismo de ação descrito é a ação direta na membrana somente dos parasitas (ABBASSI; RAJA; OURY; GAZANION *et al.*, 2013).

Figura 43: Gráfico da liberação de CF pelo composto peptídeo TSHd em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF em seu interior- concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

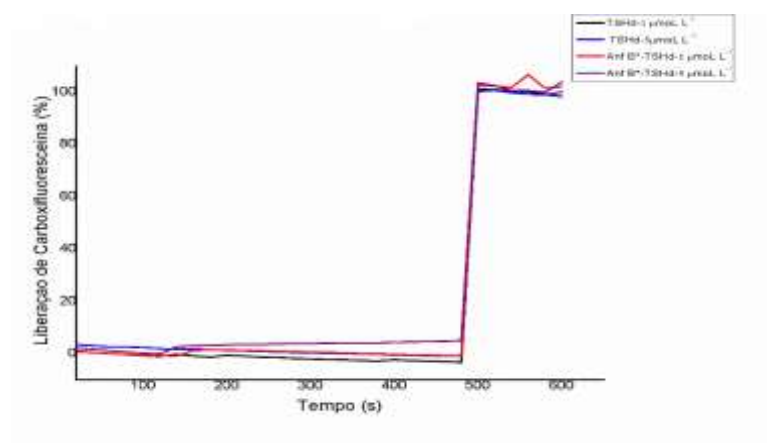
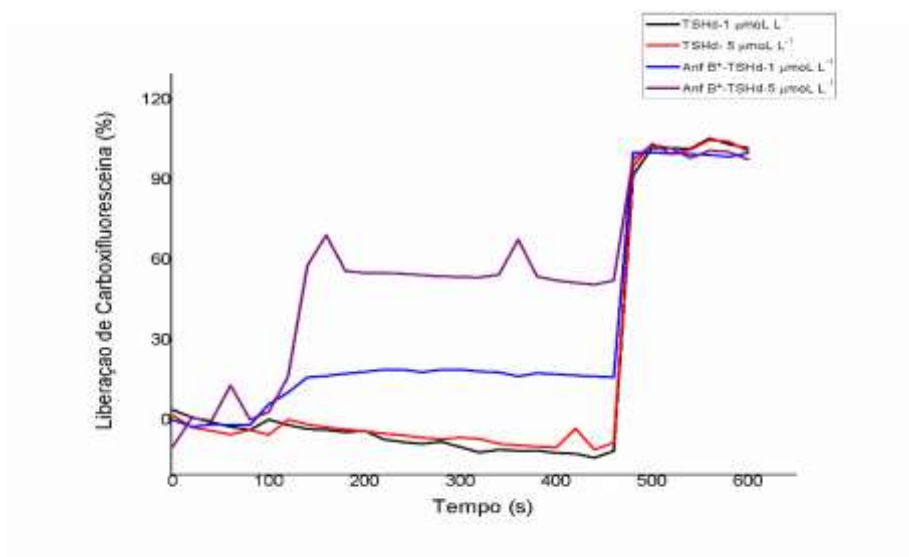


Figura 44: Gráfico da liberação de CF pelo composto Anf B*-TSHd em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



No caso dos miméticos de membrana representando a membrana do parasita, o peptídeo TSHd não promoveu permeabilização da bicamada, já o bioconjugado na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ promoveu uma taxa de liberação de CF de 60%, sendo desta forma, concentração dependente, indicando um possível mecanismo de ação a formação de poros (RUSSELL; KENNEDY; SPUCHES; VENUGOPAL *et al.*, 2010). O acoplamento da Anf B foi essencial para a melhora da atividade biológica do peptídeo frente ao parasita, ocasionando a formação de poros na membrana e desencadeando um processo de morte celular.

4.4.1.4. Peptídeo Hist 5 e bioconjugado.

O peptídeo Hist 5 e o seu bioconjugado Anf B-Hist 5 como mostrado nos resultados anteriores possuem uma atividade leishmanicida com baixa toxicidade. O bioconjugado apresentou um IC_{50} $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ frente a amastigota de *L. mexicana* com um $\text{IS} > 2500$, mostrando que este é seletivo ao parasita e não ao hospedeiro. O peptídeo Hist 5 tem como alvo no parasita uma organela importante que é a mitocôndria através da inibição da ATP sintase (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008).

O peptídeo Hist 5 e o bioconjugado Anf B-Hist 5 apresentaram baixa permeabilização frente a vesículas de POPC:COL (Figura 45). Em contato com vesículas de POPC: POPS: Ergosterol, o peptídeo Hist 5 apresentou baixa permeabilização evidenciando que o mecanismo desse não deve ser na membrana do parasita e sim um alvo intracelular como já descrito (Figura 46). Em vesículas contendo ergosterol o bioconjugado mostrou atividade concentração dependente, apresentando um valor de permeabilização de 60%, demonstrando que a conjugação com a Anf B foi essencial para a ação na membrana deste peptídeo.

Figura 45: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Hist 5 e bioconjugado Anf B-Hist 5 em vesículas de POPC:COL (5:1) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

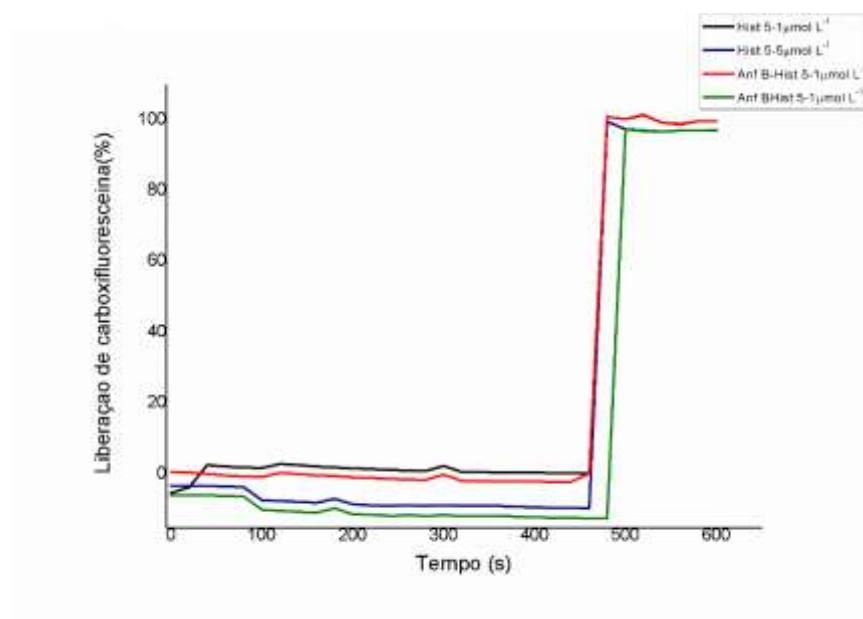
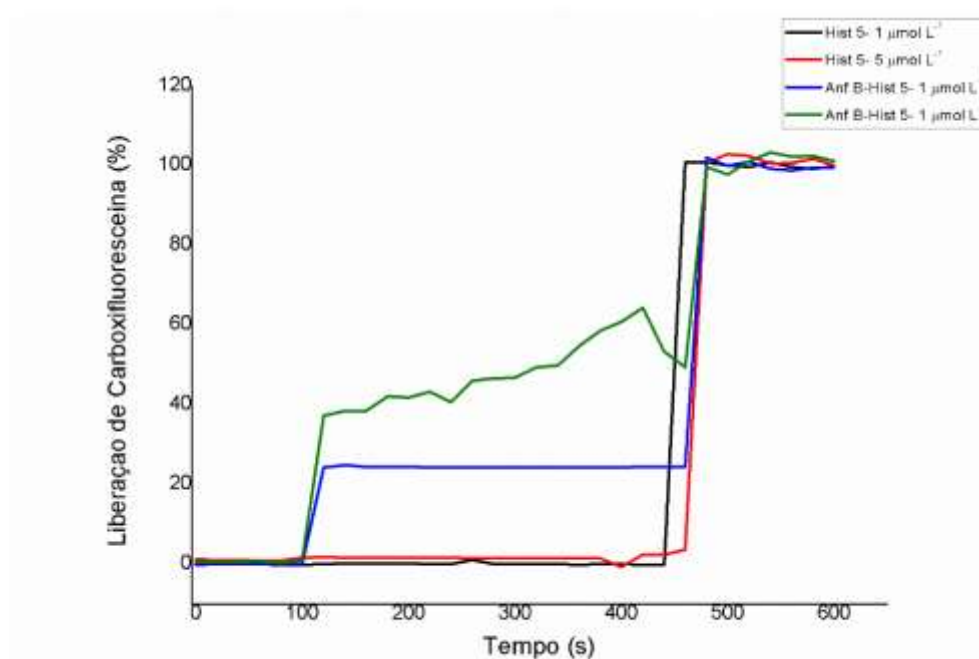


Figura 46: Gráfico da liberação de carboxifluoresceína pelo peptídeo Hist 5 e bioconjugado Anf B-Hist 5 em vesículas de POPC: POPS: Ergosterol (1:13:3) contendo CF em seu interior - concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



4.4.2. Citometria de fluxo

Para comprovar o mecanismo de ação dos peptídeos na membrana, ensaios de citometria de fluxo foram realizados utilizando PI. A citometria de fluxo tem sido considerada mais confiável para estudos de suscetibilidade celular, pois fornece informações intrínsecas das células, como tamanho e complexidade (BENADUCCI; MATSUMOTO; SARDI; FUSCO-ALMEIDA *et al.*, 2015). O uso de fluorocromos permite a avaliação de uma ampla gama de parâmetros fisiológicos ou morfológicos como integridade da membrana, pH, potencial de membrana e viabilidade.

Os resultados aqui apresentados foram expressos como intensidade de fluorescência de células de *L. mexicana* marcadas com PI, considerando que eventuais danos causados na membrana do parasita, facilita a entrada de PI para o interior da célula, o núcleo. Nestes ensaios utilizou-se as concentrações baseadas no IC₅₀ de cada composto, sendo utilizados os valores de 2x IC₅₀, 1x IC₅₀, ½ x IC₅₀ e ¼ x IC₅₀. Os dados para cada peptídeo e respectivos bioconjugados estão descritos a seguir

4.4.2.1. Peptídeos TSHa e bionconjugados

Os dados aqui obtidos indicam que as diferentes concentrações de Anf B provocaram nas concentrações testadas fez com a membrana dos parasitas sofressem danos, houve uma alta marcação por PI, no qual na figura (Figura 47-B), com 44 % células marcadas com PI positivas onde na concentração de 1xIC₅₀ foi de 44 % células PI positivas e as demais concentrações estão representadas no gráfico de parasitas PI positivas por concentrações de compostos (Figura 48). A partir desse gráfico vimos que há danos em todas as concentrações testadas, chegando a um dano de quase 70% na concentração de 2x IC₅₀

Para o peptídeo TSHa na concentração de 1x IC₅₀ as células marcadas com PI foram de 37.2 % (Figura 47-c) do qual quanto maior a concentração testada maior foi a permeabilização sendo cerca de 38% de células marcadas com PI (Figura 48) e a literatura já descrevia como mecanismo de ação do peptídeo TSHa a permeabilização de membrana por formação de poros (RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017).

Com relação ao bioconjugado Anf B*-TSHa na concentração de $2x$ IC₅₀ foram 49,9 % de células PI positivas (Figura 48), mostrando que o acoplamento da Anf B ao peptídeo TSHa potencializou a sua ação na membrana. Outro ponto importante é que na concentração de $1x$ IC₅₀ do peptídeo Anf B*-TSHa a porcentagem de parasitas marcados com PI foi de 66,5 % (Figura 47-d) demonstrando que nesta concentração o peptídeo já está causando um alto dano na membrana dos promastigotas de *L. mexicana*, comprovando os mesmos dados obtidos pelos ensaios de permeabilização de vesículas que na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ a vesícula já teve toda sua membrana dissolvida e a permeabilização foi de quase 100%, indicando o mecanismo de capert-like e esta concentração se aproxima da concentração de IC₅₀ do peptídeo Anf B*-TSHa que foi utilizada nos ensaios de citometria.

Figura 47- Análise de dano de membrana por citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* na concentração de 5×10^6 células/mL e marcadas com PI ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 20 minutos. Em (a) Parasitas sem tratamento marcados com PI, em (b) Parasitas tratados com Anf B concentração de $1x$ IC₅₀, em (c) Tratamento com TSHa na concentração de $1x$ IC₅₀, em (d) Parasitos tratados com Anf B*-TSHa na concentração de $1x$ IC₅₀ e em (e) Parasitos tratados com (TSHa)₂K na concentração de $1x$ IC₅₀.

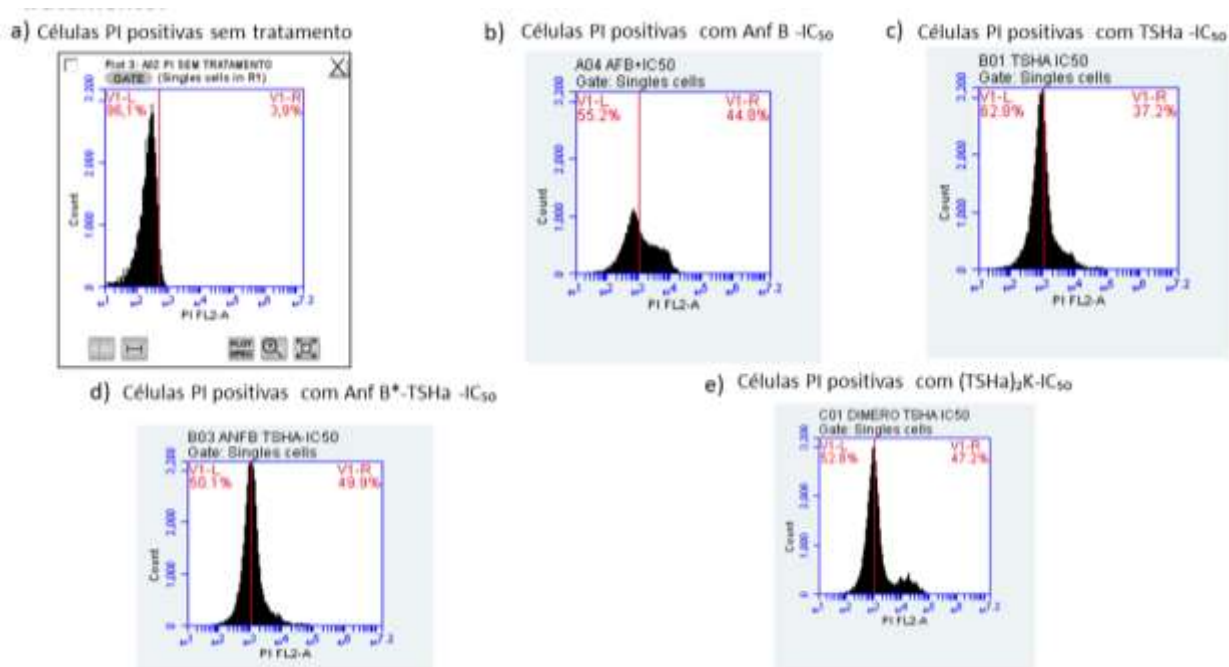
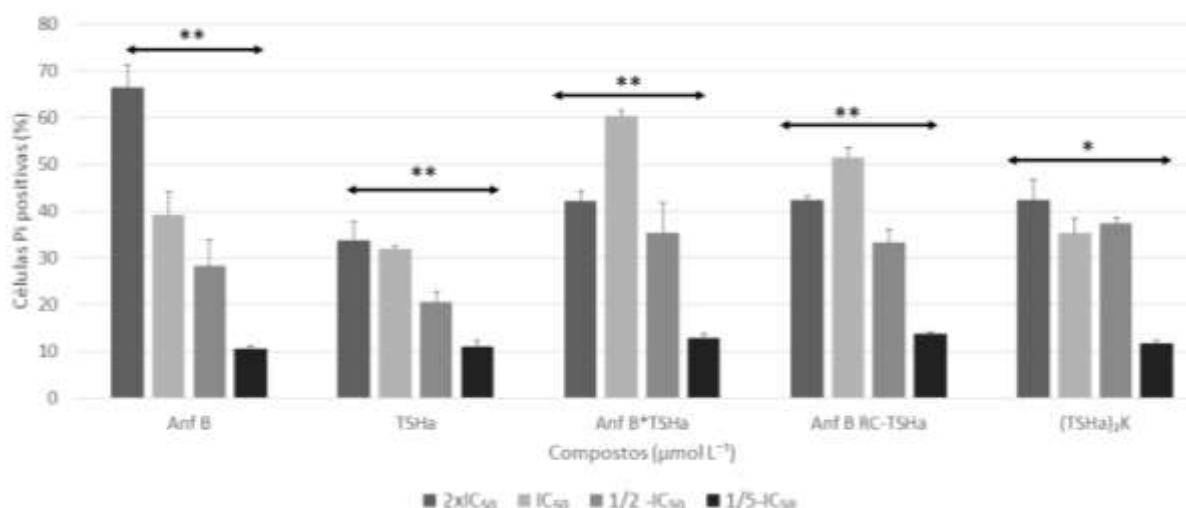


Figura 48-Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com iodeto de propídio (PI) frente aos tratamentos com Anf B, TSHa, Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e (TSHa)₂K, nas concentrações de 2x IC₅₀, IC₅₀, 1/2 IC₅₀ e 1/5 IC₅₀. Todos os dados receberam análise estatística (Anova two-way e Teste de Tukey com significância com p-valor<0,05 entre os compostos testados e significância com p-valor< 0,01 para as concentrações testadas). Os resultados apresentaram diferença estatística entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas de cada composto e os compostos testados (**).



Com relação ao peptídeo Anf B-(RC) -TSHa este apresentou o mesmo comportamento que o bioconjugado Anf B*-TSHa, apresentando valor de parasitos marcados com PI na concentração de 1x IC₅₀ de 50,2% de (Figura 48), demonstrando que o acoplamento da Anf B é essencial para potencializar o mecanismo de ação do peptídeo TSHa. Além disso há diferenças dos mecanismos de ação entre o peptídeo TSHa e seus bioconjugados resultantes do acoplamento da Anf B, do qual o mecanismo de ação dos bioconjugados deve ser provavelmente a dissolução da membrana, mesmo em menores concentrações de composto.

O peptídeo dímérico (TSHa)₂K também é responsável por causar danos na membrana da forma promastigota de *L. mexicana*, na concentração de 1x IC₅₀ houve 38,6 % de parasitas células marcadas com PI (Figura 47 d), além disso o valor de permeabilização das membranas dos parasitas foi diretamente proporcional às concentrações utilizadas, corroborando para a hipótese da molécula ter um mecanismo de formação de poros na membrana (LI; KOH; LIU; LAKSHMINARAYANAN *et al.*, 2017).

Um dado importante além da carga positiva dos peptídeos para a interação com a membrana do parasita, é a presença do glicocálice que é composto principalmente por lipofosfoglicano (LPG) e proteofosfoglicano (PPG) que confere mais carga negativa a essa estrutura e facilita ainda mais a interação com a membrana do parasita. Dados da literatura mostram que a ausência de LPG e PPG contribuem para a resistência da forma promastigota de *L. mexicana* (EGGIMANN; SWEENEY; BOLT; ROZATIAN et al., 2015), sendo assim o pequeno tamanho, a baixa carga das temporinas e a ação conjunta com Anf B facilitam a difusão do glicocálice para a membrana plasmática.

Para o peptídeo TSHa e o dímero (TSHa)₂K na concentração de 1x IC₅₀, a morte dos parasitas deve estar correlacionada com a permeabilização/despolarização da membrana plasmática, sem a perda de integridade da membrana plasmática. Já para concentrações superiores ao 1x IC₅₀ e para os bioconjugados com Anf B houve uma perda da integridade da membrana plasmática.

Os dados também mostraram que não houve dano na membrana e o PI não se integrou ao DNA em parasitas sem tratamento, pois somente foi captado pelo equipamento dados de tamanho e granulosidade das células viáveis (Figura 47-a).

4.4.2.2. Peptídeo TSHd e bioconjugado

Como controle negativo para este experimento foram utilizados inóculo de parasitas que não receberam tratamento e marcadas com PI, do qual a porcentagem de parasitos PI positivos foi baixa, como esperado (Figura 49-a).

Para os ensaios realizados em todas as concentrações testadas 2x IC₅₀, 1x IC₅₀, ½ IC₅₀ e ¼ do IC₅₀ houve dano na membrana. Com a droga controle Anf B (Figura 49 -b) em todas as concentrações testadas causou danos nas membranas do parasita, com alta marcação por PI (Figura 50).

O peptídeo TSHd na concentração de 1x IC₅₀ houve uma porcentagem de células marcadas com PI de 37,2% (Figura 49-c), além disso essa porcentagem de dano a membrana foi dependente da concentração, com o aumento da concentração houve aumento na permeabilização (Figura 50).

Para o bioconjugado Anf B*-TSHd na concentração de $1 \times IC_{50}$ a porcentagem de parasitas marcados com PI foi de 36,2 e a permeabilização da membrana foi concentração dependente, evidenciando que tanto o peptídeo TSHd e o eu bioconjugado apresentam como possível mecanismo de ação a formação de poros.

Figura 49- Análise de dano de membrana por citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* na concentração de 5×10^6 células/mL e marcadas com PI ($80 \mu g mL^{-1}$) por 20 minutos. Em (a) Parasitas sem tratamento marcados com PI, em (b) Parasitas tratados com Anf B concentração de $1 \times IC_{50}$, em (c) Tratamento com TSHd na concentração de $1 \times IC_{50}$ e em (d) Parasitos tratados com Anf B*-TSHd na concentração de $1 \times IC_{50}$.

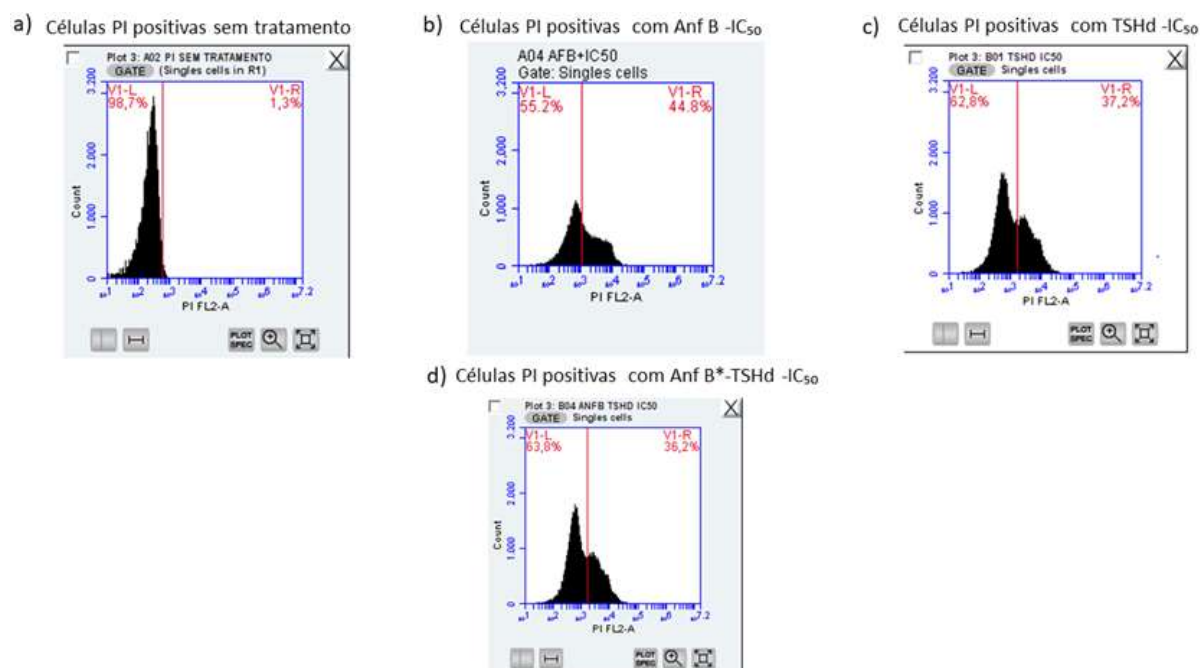
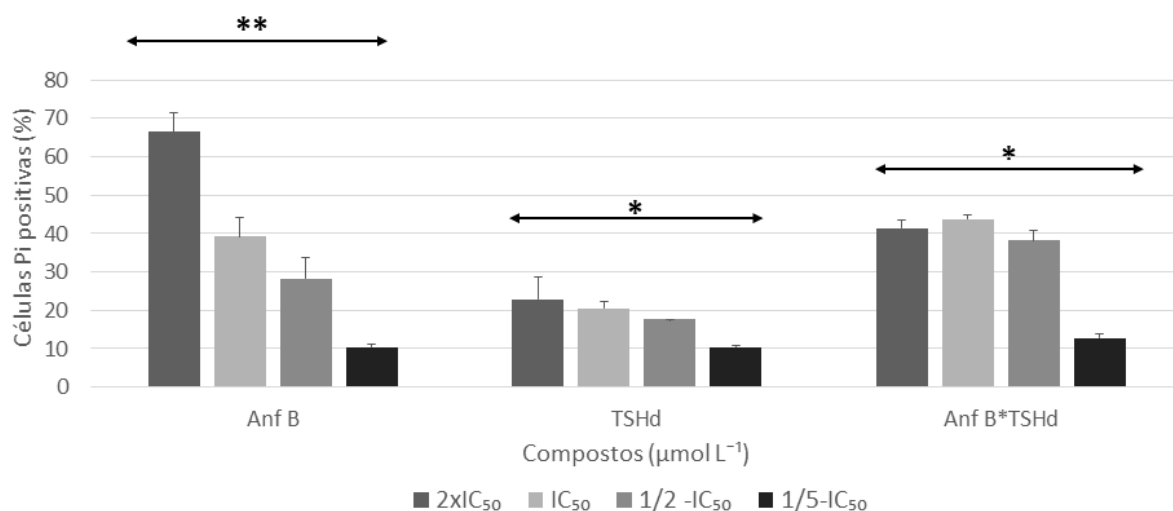


Figura 50- Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com iodeto de propídio (PI) frente aos tratamentos com Anf B, TSHd, Anf B*-TSHd nas concentrações 2x IC₅₀, IC₅₀, ½ IC₅₀ e 1/5 IC₅₀. Todos os dados receberam análise estatística (Anova two-way e Teste de Tukey com significância p-valor<0,05 entre os compostos testados e significância com p-valor< 0,01 para as concentrações testadas). Os resultados apresentaram diferença estatística entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas de cada composto e os compostos testados (**).



Um ponto muito importante deste trabalho é a seletividade dos bioconjugados a membrana do parasita e não a do hospedeiro, isto se dá pela diferença no conteúdo lipídico aniônico exposto de cada uma, a membrana da *Leishmania* é mais negativa principalmente pela presença fosfatidilserina e fosfatidilglicerol e além disso outro componente importante é a presença do ergosterol que é essencial para a formação dos poros (MCCALL; EL AROUSSI; CHOI; VIEIRA *et al.*, 2015). Em células fúngicas que tiveram a síntese do ergosterol inibido, não houve interação de peptídeos antimicrobianos e além disso houve um processo de morte celular, mostrando a essencialidade do ergosterol (KODEDOVÁ; SYCHROVÁ, 2017).

Acreditamos que possivelmente o mecanismo de poros para o bioconjugado seja o poro toroidal, e há uma interação de dos bioconjugados com o grupo de fosfolipídios de carga negativa, do qual estes se estruturam em alfa-hélice, interagindo com os grupos carboxila dos fosfolipídios de membrana e estes vão penetrando mais profundamente na membrana, formando poros de forma toroidal, que ocasiona distúrbio lipídico significativo e alteração da curvatura da membrana,

desencadeando um processo de morte celular (LI; KOH; LIU; LAKSHMINARAYANAN *et al.*, 2017; PITALE; KAUR; BAGHEL; KAUR *et al.*, 2020). Este mecanismo já foi descrito para outros peptídeos com ação leishmanicida descrito como os peptídeos melitina e halictina-2, dentre outros (EL-DIRANY; SHAHROUR; DIRANY; ABDEL-SATER *et al.*, 2021; PITALE; KAUR; BAGHEL; KAUR *et al.*, 2020; TORRENT; PULIDO; RIVAS; ANDREU, 2012).

4.4.2.3. Peptídeo Hist 5 e bioconjugado

Para o peptídeo Hist 5 em todas as concentrações testadas houve baixa porcentagem de células marcadas com PI (Figura 51 c e 52), o que corrobora com os dados obtidos em permeabilização de vesículas no qual a taxa de liberação de CF foi baixo para os miméticos de membrana do parasita e além disso a literatura descreve como principal alvo do peptídeo Hist 5 como sendo a mitocôndria.

Em relação ao bioconjugado Anf B-Hist 5, destacando que este é o único com a estrutura completa da anfotericina B, a porcentagem de parasitos PI positivos em todas as concentrações testadas foi em torno de 37% (Figura 51-d e 52), neste caso fica evidenciado que a conjugação da Anf B é responsável pela formação de poros na membrana da forma promastigota de *L. mexicana* (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; CUNHA; LEÃO; DE CASSIA SOLER; LINDOSO, 2015; SAHA; MUKHERJEE; BHADURI, 1986; SHIRZADI, 2019).

Para este bioconjugado específico o possível mecanismo de ação deve ser diferente dos demais descritos até agora, acreditamos que haja formação de poros pela Anf B o que permite a entrada do peptídeo no interior do parasita, fazendo com que este aja em seu alvo intracelular a mitocôndria, ocasionando assim a inibição da ATP sintase (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008).

Outros peptídeos também atuam na inibição da ATP sintase como por exemplo a lactoferrina, defensinas, batenecina e catelicidina atuando tanto como antiparasitários, antifúngicos e antibacterianos (CHAPPLE; HUSSAIN; JOANNOU; HANCOCK *et al.*, 2004; EDGERTON; KOSHLUKOVA; ARAUJO; PATEL *et al.*, 2000). O mecanismo de ação do peptídeo Hist 5 está bem descrito para o fungo *Candida albicans*, , este peptídeo é responsável pela liberação seletiva de ATP, em células fúngicas metabolicamente ativas e com membranas permeabilizadas, a partir disso o aumento na concentração do ATP extracelular pode servir como um potencializador

para a morte celular, além de facilitar a captação adicional de peptídeos ou funcionar como um sinal adicional para ativar o sistema imune inato do hospedeiro no local da infecção, este mecanismo pode ocorrer para outras células eucarióticas que no caso do bioconjugado Anf B-Hist 5 este efeito pode ser potencializado pela ação conjunta da Anf B (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007).

Dados da literatura corroboram que o peptídeo Hist 5 ocasiona uma diminuição da atividade F1F0-ATPase sensível à oligomicina, sendo este um alvo essencial para sua atividade leishmanicida (LUQUE-ORTEGA; VAN'T HOF; VEERMAN; SAUGAR *et al.*, 2008), outro peptídeo que teve a mesma atividade descrita como inibidor de ATP sintase é a melitina (DÍAZ-ACHIRICA; PRIETO; UBACH; ANDREU *et al.*, 1994).

Todo esse processo deve ocasionar um colapso bioenergético que pode desencadear um processo de morte celular, que não tem como alvo a membrana celular, por isso o acoplamento da Anf B foi somente como um carreador do peptídeo até seu alvo intracelular tanto na forma promastigota quanto amastigota.

Figura 51- Análise de dano de membrana por Citometria de fluxo da forma promastigota de *L. mexicana* na concentração de 5×10^6 células/mL e marcadas com PI ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 20 minutos. Em (a) Parasitas sem tratamento marcados com PI, em (b) Parasitas tratados com Anf B concentração de IC_{50} , em (c) Tratamento com Hist 5 na concentração de IC_{50} e em (d) Parasitos tratados com Anf B-Hist 5 na concentração de IC_{50} .

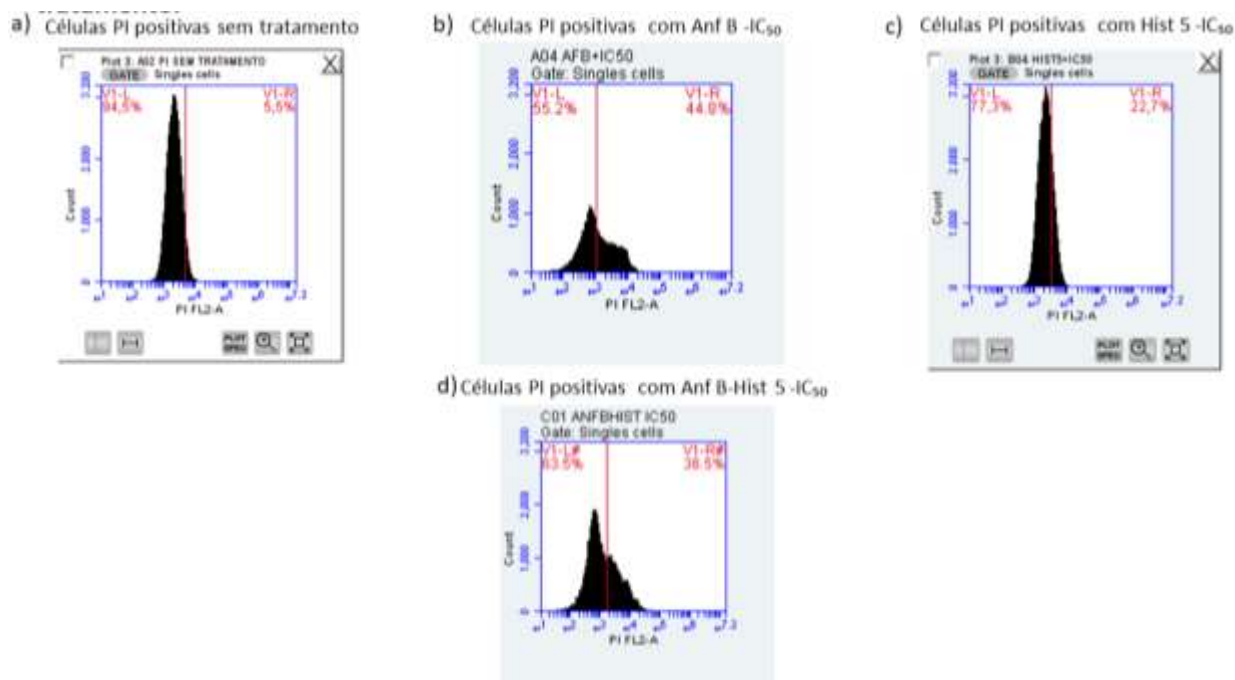
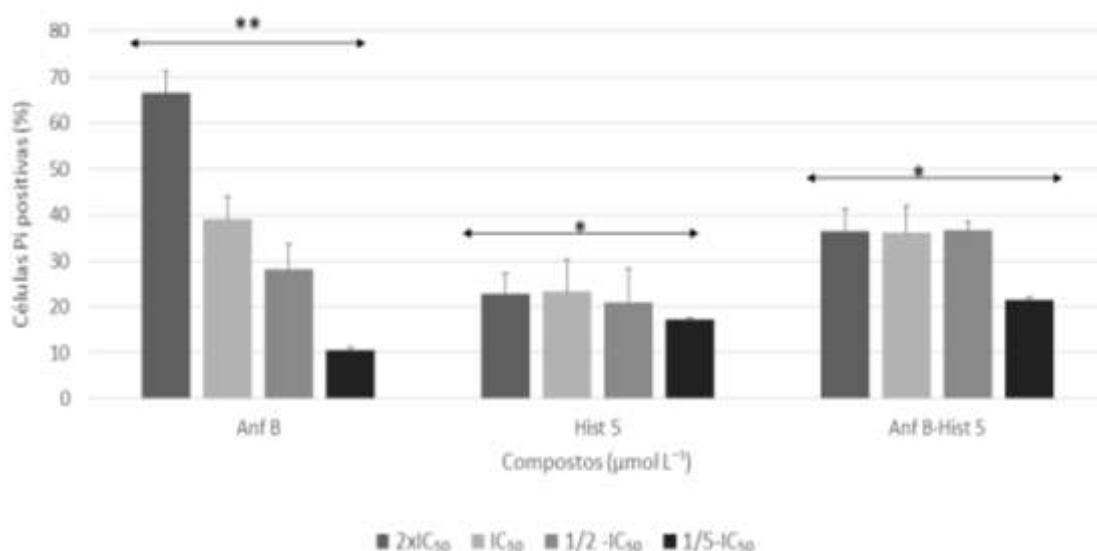


Figura 52-Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota marcadas com PI frente aos tratamentos com Anf B, Hist 5, Anf B- Hist 5 nas concentrações $2\times IC_{50}$, IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$ e $\frac{1}{5} IC_{50}$. Todos os dados receberam análise estatística (Anova two-way e Teste de Tukey com significância com $p\text{-valor}<0,05$ entre os compostos testados e significância com $p\text{-valor}<0,01$ para as concentrações testadas). Os resultados apresentaram diferença estatística entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas de cada composto e os compostos testados (**).



4.4.3. Microscopia de fluorescência

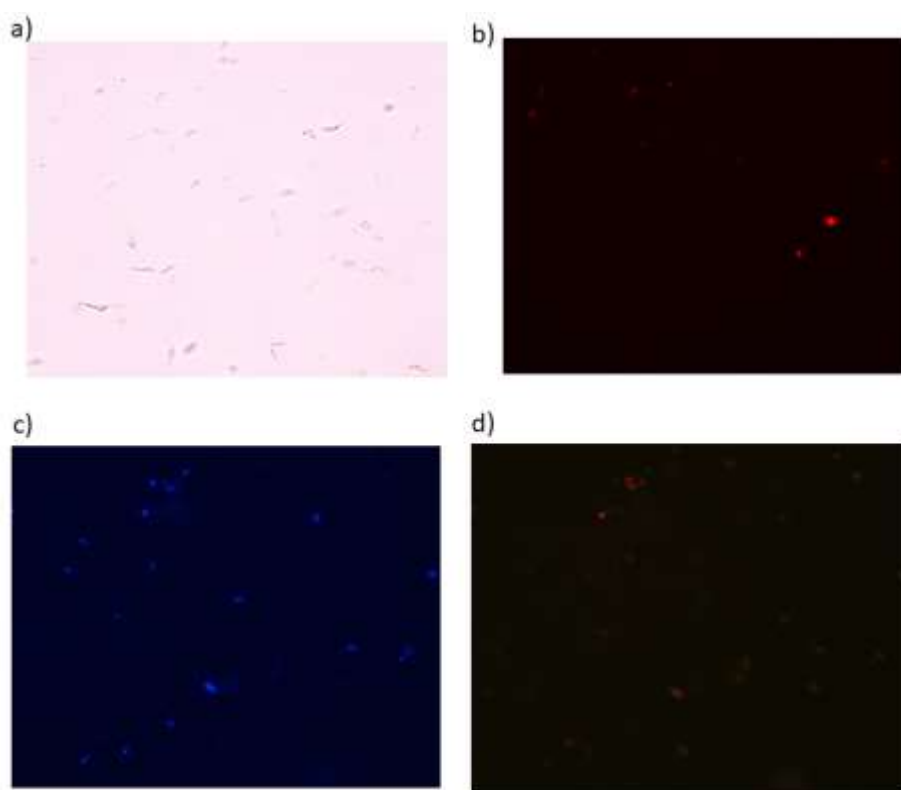
4.4.3.1. Peptídeo TSHa e seus bioconjugados.

Para os ensaios de microscopia de fluorescência, foram utilizados 2 fluoróforos o Hoechst que marca DNA fita dupla sendo permeável às membranas celulares, marcando células viáveis e o PI que é um intercalante de DNA e é responsável somente por marcar células que sofreram algum tipo de dano na membrana. Sendo assim para controle negativos cultura de *L. mexicana* sem tratamento (Figura 53-a)

foram incubadas com os diferentes fluoróforos, do qual foi observado uma alta marcação por Hoechst (Figura 53-c) indicando que as células estão viáveis e baixa marcação por PI (Figura 53-b).

O fluoróforo Hoechst foi escolhido por marcar DNA, no entanto ele é permeável às membranas celulares, marcando células viáveis, já o PI é responsável somente por marcar células que sofreram algum tipo de dano na membrana. Portanto, a partir da razão de células marcadas com PI pelas células marcadas Hoechst é possível determinar a porcentagem de células que sofreram algum tipo de dano na membrana.

Figura 53- Ensaio de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.



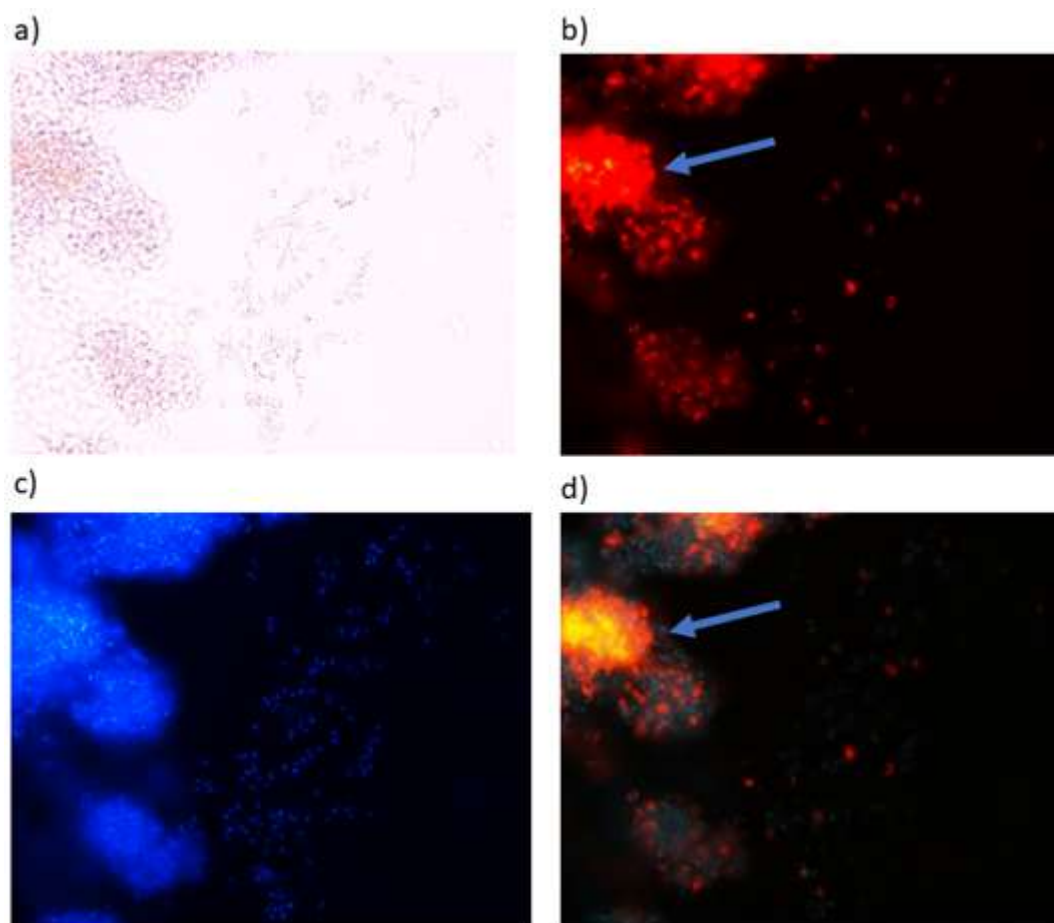
Para os tratamentos foram utilizados os peptídeos TSHa e os bioconjugados resultantes dele Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e o peptídeo dímérico (TSHa)₂K, nas concentrações de 2,5 e 1, 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por diferentes intervalos de tratamento 2 e 24 horas a fim de avaliar o mecanismo de ação dessas moléculas e também se o tempo de exposição aos compostos podem interferir em sua ação na membrana. A fim de representação selecionamos 2 compostos para representar os ensaios de microscopia, os demais compostos e tratamentos estarão nas figuras em anexo.

Como já demonstrado pelos ensaios de permeabilização de vesículas e pelos ensaios de citometria de fluxo, o peptídeo TSHa e os bioconjugados provavelmente devem possuir um mecanismo de ação no parasita vinculado a membrana, com diferenças nos tipos de mecanismos de membrana entre os peptídeos TSHa, (TSHa)₂K e os bioconjugados Anf B*-TSHa e Anf B (RC)-TSHa. Para o primeiro grupo sugerimos um mecanismo de ação na membrana vinculado a formação de poros, enquanto os bioconjugados com Anf B devem possuir um mecanismo vinculado com a dissolução da membrana, um mecanismo detergente.

Os ensaios de microscopia vieram corroborar estas informações, para o peptídeo Anf B*-TSHa na concentração de 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ que é praticamente metade da concentração do IC₅₀ deste peptídeo para a forma promastigota depois de 24 horas de tratamento houve alta marcação por PI (Figura 54-b), lembrando que o PI só é permeável em células que sofreram algum tipo de dano ou que haja formação de poros que permitam sua entrada. A marcação por Hoechst ocorreu na grande maioria das células indicando sua viabilidade.

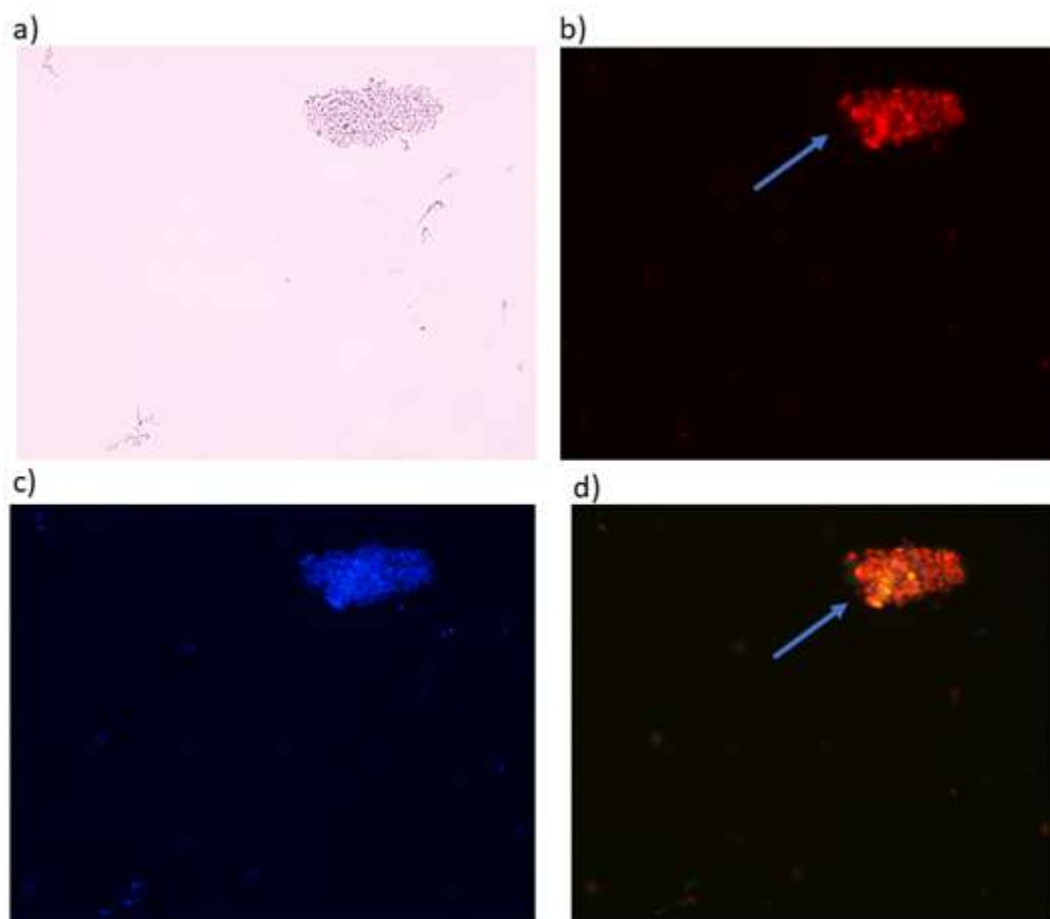
Além disso é observado nos ensaios de microscopia, é que a formação de conglomerados de parasitos e que muitos estão perdendo sua forma base, o que pode indicar uma dissolução da membrana como é previsto para o mecanismo de Carpet like (MAHLAPUU; BJÖRN; EKBLOM, 2020; RAI; FERRÃO; PALMA; PATRICIO *et al.*, 2022) e além disso isto é um indício que os parasitas estão entrando em processo de morte celular, do qual a marcação por PI ficou mais evidente (GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012).

Figura 54: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHa por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI por 5 minutos, no qual há uma flecha azul indicando conglomerados de parasitas e alta marcação por PI; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações sendo evidenciado a flecha azul que indica marcação por PI.



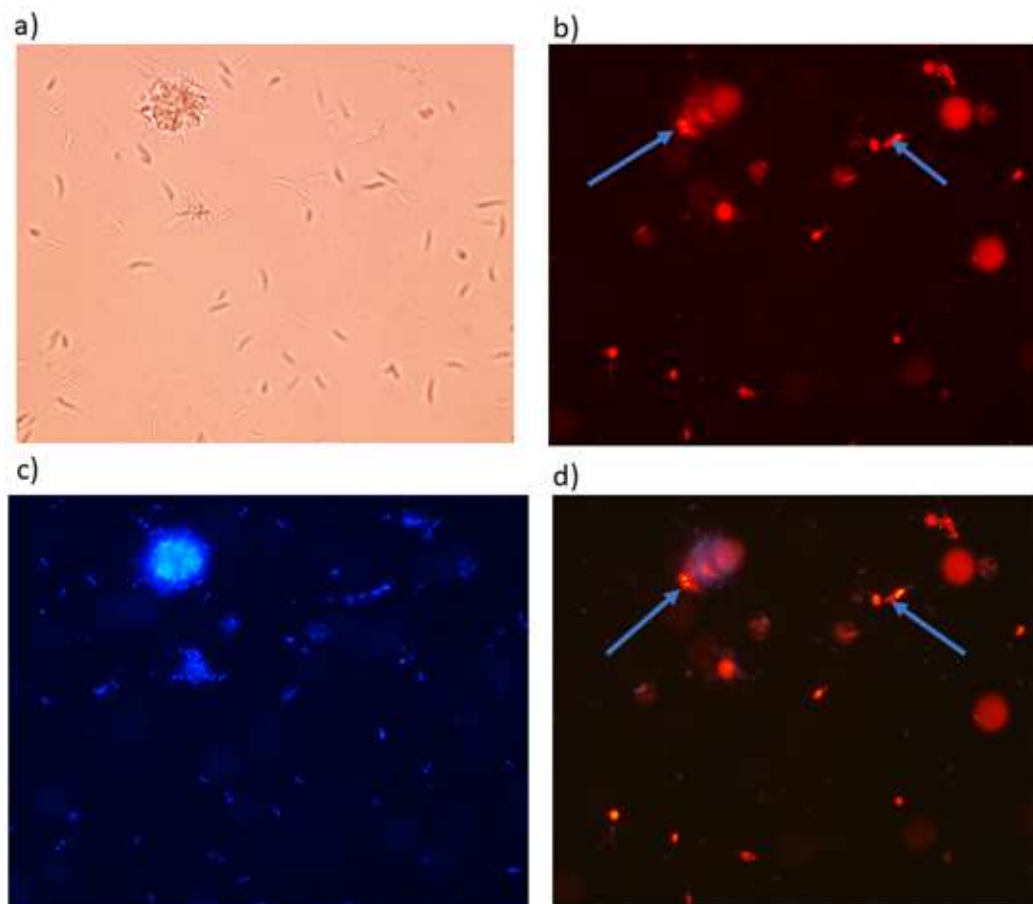
Para o peptídeo Anf B*-TSHa na concentração próxima ao IC_{50} - $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um menor tempo de tratamento (2 horas), os parasitas sofreram um dano na membrana, apresentando uma marcação por PI (Figura 55-b) e houve formação dos conglomerados que demonstram que os parasitas estão iniciando um processo de morte celular, este é um importante indício do mecanismo de ação na membrana via carpet like, porque mesmo com menor tempo de exposição a membrana do parasita deve estar sendo dissolvida.

Figura 55: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHa por 2 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de por 5 minutos no PI qual há uma flecha azul indicando conglomerados de parasitas e alta marcação por PI; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações sendo evidenciado a flecha azul que indica marcação por PI.



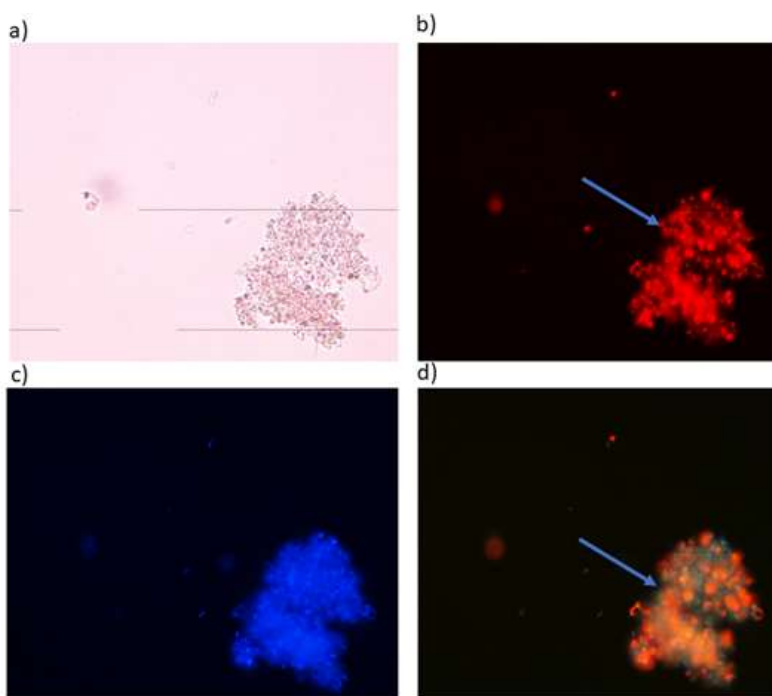
O outro bioconjugado Anf B (RC)-TSHa também apresentou danos na membrana na concentração de $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração próxima ao IC_{50}) com 24 horas de tratamento, houve alta marcação por PI (Figura 56-b) e também há marcação com Hoechst para indicar que há ainda células viáveis (Figura 56-c), outro ponto importante é que nesta imagem de microscopia observamos que há mais parasitas com perda de forma e há formação de conglomerados de células.

Figura 56: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1.25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC) -TSHa por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos com flechas em azul que indicam parasitas com dano de membrana; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações e também há fechas em azul que indicam parasitas com dano na membrana.



Quando ocorre um aumento na concentração do peptídeo Anf B-(RC) -TSHa $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$) com um tempo de tratamento menor (2 horas) (Figura 57), há danos na membrana do parasita com a formação do conglomerado de células em processo de morte. Fica evidente também que quanto maior a concentração do composto utilizado maior pode ser os danos que os parasitas podem sofrer.

Figura 57: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC) -TSHa por 2 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos com destaque para a seta em azul que indica conglomerados de parasitas que estão com alta marcação por PI; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações que contém uma seta em azul indicando a marcação por PI no merge.

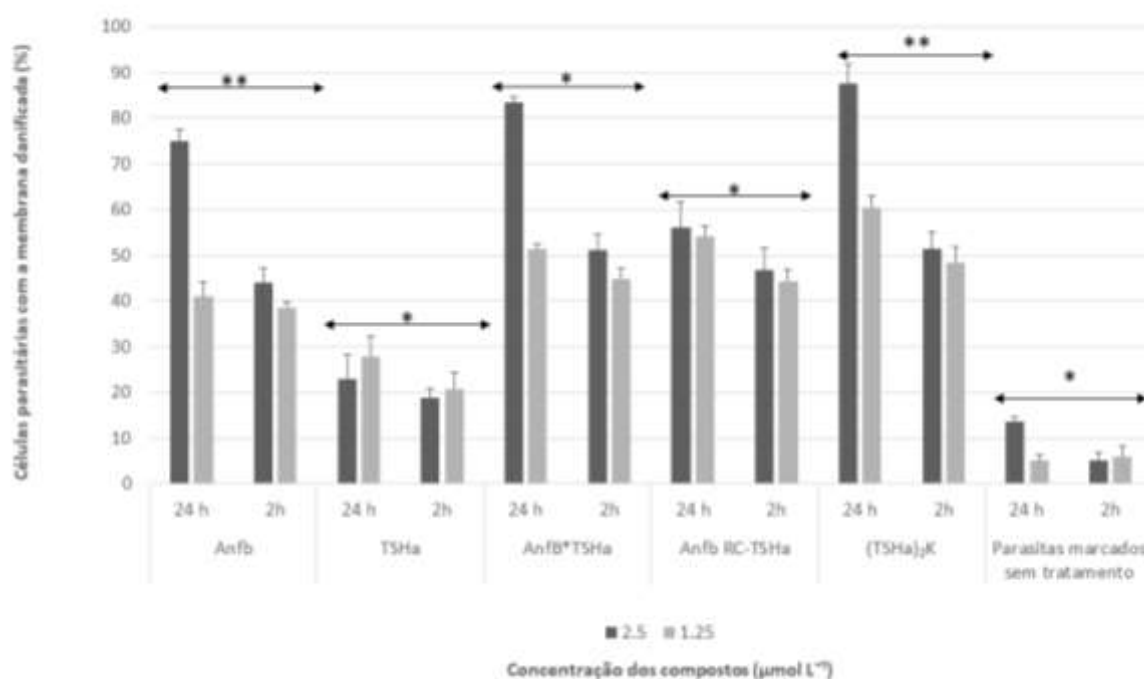


A figura 58 representa uma computação numérica dos danos que os parasitas sofrem em todas as condições de tratamento. A partir destes dados podemos concluir que tanto a droga controle Anf B, o peptídeo TSHa e o dímero $(\text{TSHa})_2\text{K}$ causam danos na membrana e também o dano sofrido é concentração dependente quanto maior a concentração do composto maior o dano sofrido. Outro ponto importante é que quanto maior o tempo de tratamento maior foi o dano sofrido, todos esses dados corroboram para o mecanismo de formação de poros já descrito.

Para os bioconjugados, houve alta porcentagem de células que sofreram algum tipo de dano (Figura 58), mesmo em concentrações que estavam abaixo do valor de IC_{50} dos compostos para a forma promastigota e além disso mesmo com o tempo de tratamento menor houve um grande número de parasitos que sofreram danos. Do qual destacamos que o peptídeo Anf B*-TSHa apresentou maior

porcentagem de células com dano em 24 horas na concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do que a droga controle e ambos os bioconjugados destacando a potência destes compostos e com alta seletividade como já discutido anteriormente.

Figura 58-Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com iodeto de propídio (PI) pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, TSHa, Anf B*-TSHa, Anf B (RC)-TSHa e (TSHa)₂K nas concentrações 1,25 e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento. Todos os dados receberam análise estatística (Anova two-way e Teste de Tukey com significância com $p\text{-valor} < 0,05$ entre os compostos testados e significância com $p\text{-valor} < 0,01$ para as concentrações testadas). Os resultados apresentaram diferença estatística entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas de cada composto e os compostos testados (**).

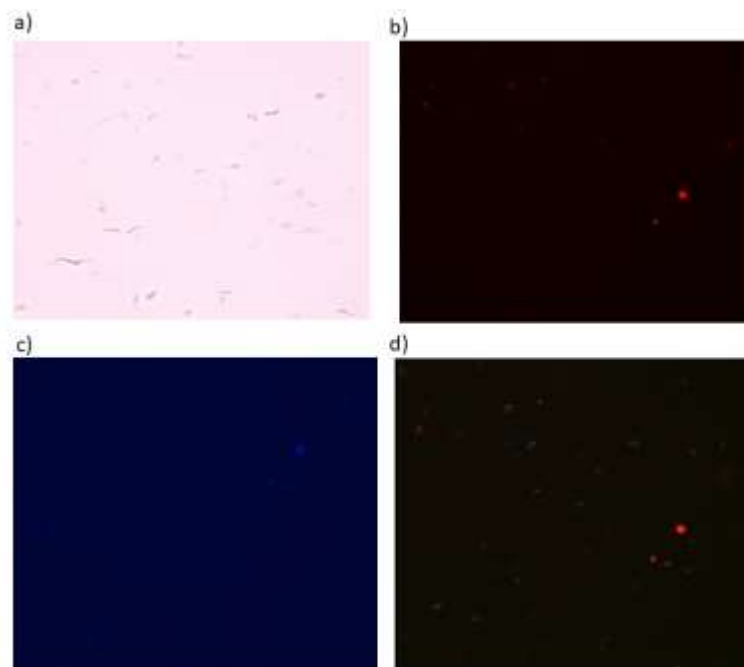


4.4.3.2. Peptídeo TSHd e Anf B*-TSHd

Com as mesmas condições descritas para os experimentos com o peptídeo TSHa e os seus bioconjugados foram realizados para o peptídeo TSHd e Anf B*-TSHd. Sendo assim utilizou-se para controle negativo cultura de *L. mexicana* sem tratamento (Figura 59-a que foram incubadas com os diferentes fluoróforos, no qual

foi observado uma alta marcação por Hoechst (Figura 59-c) indicando que as células estão viáveis e baixa marcação por PI (Figura 59-b).

Figura 59- Ensaio de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 24 horas para o experimento com o peptídeo TSHd e Anf B*-TSHd. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.



Dando enfoque ao bioconjugado Anf B*-TSHd que resultados anteriores demonstraram que o possível mecanismo de ação desse peptídeo é na membrana, através da sua desestabilização pela formação de poros toroidais e estes resultados são corroborados com os dados de microscopia de fluorescência.

Na concentração $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($3 \times \text{IC}_{50}$) para a forma promastigota em 24 horas de tratamento, o bioconjugado apresentou um grande número de células com dano na membrana, evidenciado pela marcação por PI (Figura 60-b) e quando a concentração do bioconjugado utilizada aumentou para $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ mesmo com um intervalo de tratamento menor (2h) ainda evidenciou-se danos na membrana (Figura 61-b) e conglomerados de células que podem estar em um processo de morte, corroborando assim que o danos nas membranas são dose dependentes, sendo o provável mecanismo para isso a formação dos poros (BECHINGER; GORR, 2017;

KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; TORRENT; PULIDO; RIVAS; ANDREU, 2012; ZHANG; YAN; MENG; HONG *et al.*, 2021).

Figura 60: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHd por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos com flechas em azul indicando parasitas com dano de membrana; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações, flechas em azul indicam células marcadas com PI.

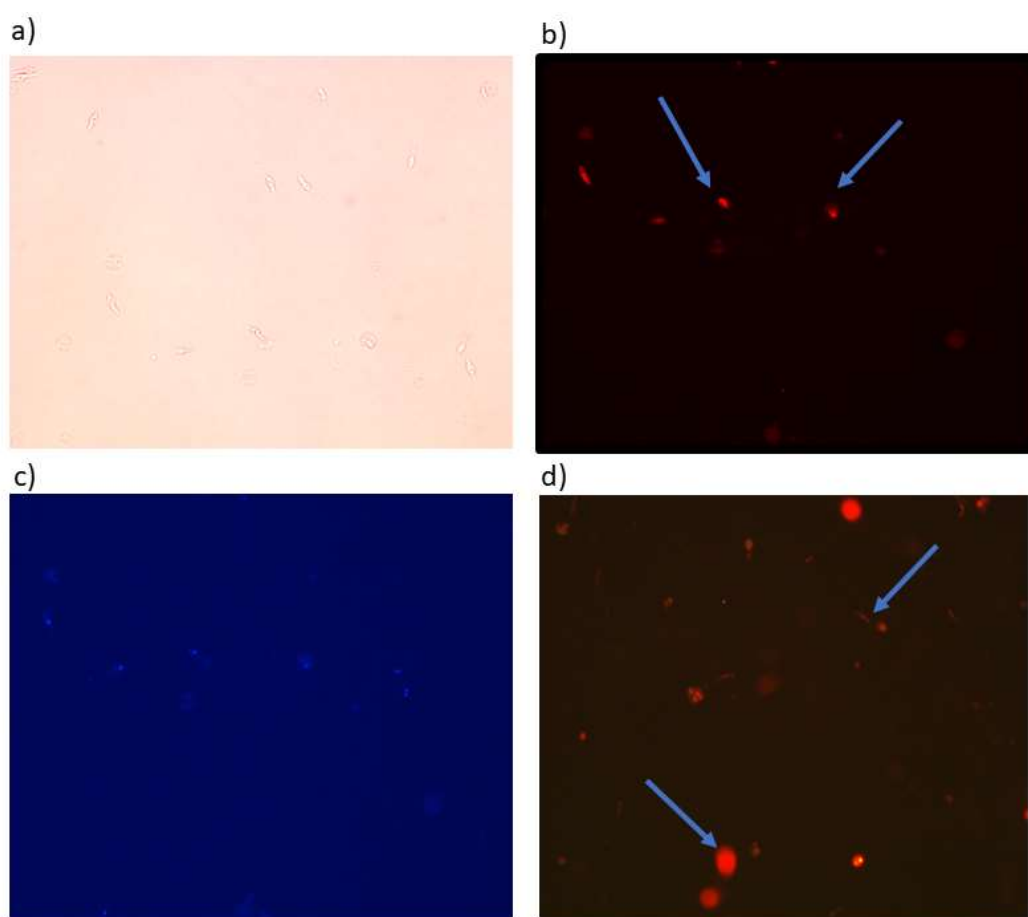
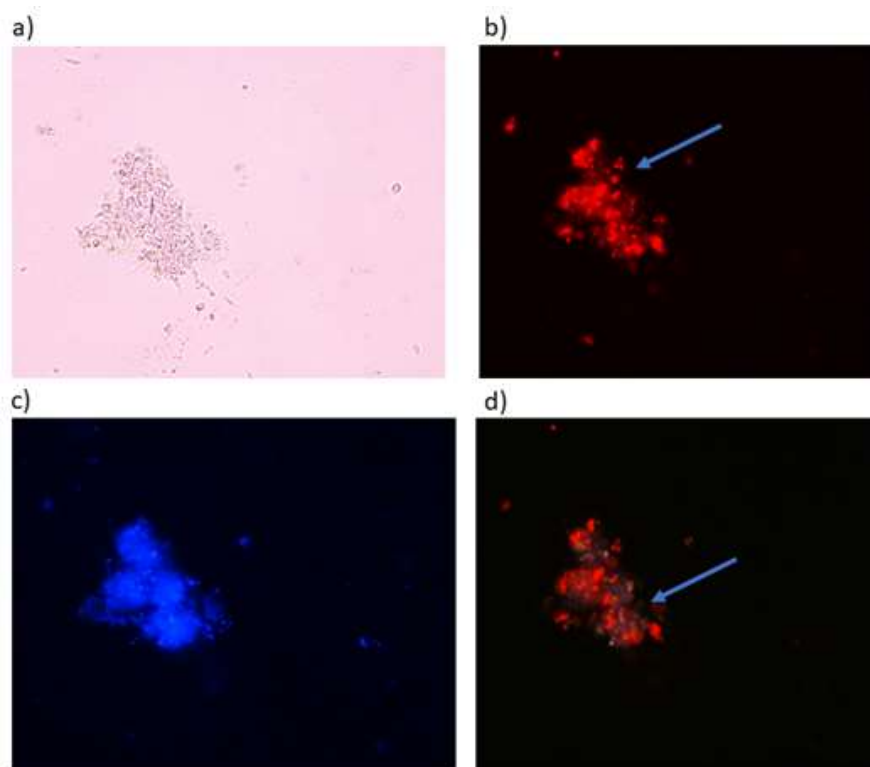
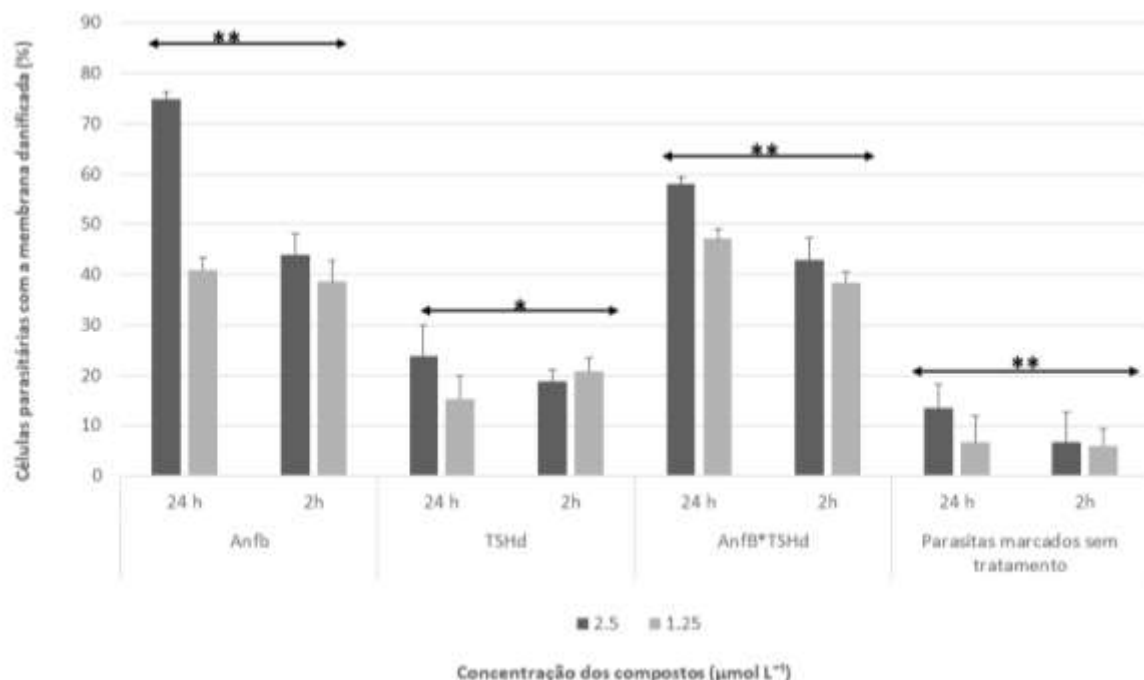


Figura 61: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B*-TSHd por 2 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos com setas em azul indicando conglomerados de parasitas com alta marcação por PI; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações e a seta em azul indica parasitas com marcação por PI.



Outro dado importante que podemos concluir a partir dos ensaios de microscopia é que o acoplamento da Anf B ao peptídeo TSHd foi essencial para potencializar sua ação frente a *Leishmania*, pois a partir do gráfico de porcentagem parasitos com danos na membrana fica evidente que o peptídeo TSHd em relação a droga controle e ao bioconjugado apresentou um valor inferior de parasitos com danos na membrana sendo cerca de 25% dos parasitas com danos na membrana (Figura 62). O bioconjugado Anf B*-TSHd mesmo com parte da estrutura faltante da Anf B apresentou um alto valor de parasitos com dano na membrana.

Figura 62-Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com PI pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, TSHd, Anf B*- TSHd, nas concentrações 1,25 e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento. Todos os dados receberam análise estatístico (Anova two-way e Teste de Tukey com significância com $p\text{-valor} < 0,05$ entre os compostos testados e significância com $p\text{-valor} < 0,01$ para as concentrações testadas). Os resultados apresentaram diferença estatística entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas de cada composto e os compostos testados (**).



Destacamos ainda que o IS do bioconjugado Anf B*-TSHd para a forma amastigota é de 1112 sendo cerca de 29x mais seletivo para o parasita do que a droga padrão para o tratamento Anf B, do qual acreditamos que mesmo para a forma amastigota o mecanismo de ação deva estar ligado a membrana. Dados da literatura apontam que as temporinas podem atingir as formas amastigotas de *Leishmania* no fagolisossomo para matá-las (ABBASSI; OURY; BLASCO; SERENO et al., 2008; ABBASSI; RAJA; OURY; GAZANION et al., 2013; ANDRÉ; RAJA; HUMBLLOT; PIESE et al., 2020; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT et al., 2017; ZHAO; RINALDI; DI GIULIO; SIMMACO et al., 2002) ou agir quem sabe em sinergia com outros mensageiros intracelulares, como o óxido nítrico (NO), que são conhecidos por estarem envolvidos na morte de amastigotas de *Leishmania* (LIEW; MILLOTT; PARKINSON; PALMER et al., 1990; WANASEN; SOONG, 2008).

Em sua ação na forma amastigota pode-se acreditar de acordo com um processo semelhante (translocação de membrana ou pinocitose), as temporinas poderiam entrar no macrófago e atingir amastigotas de *Leishmania* no vacúolo parasitóforo.

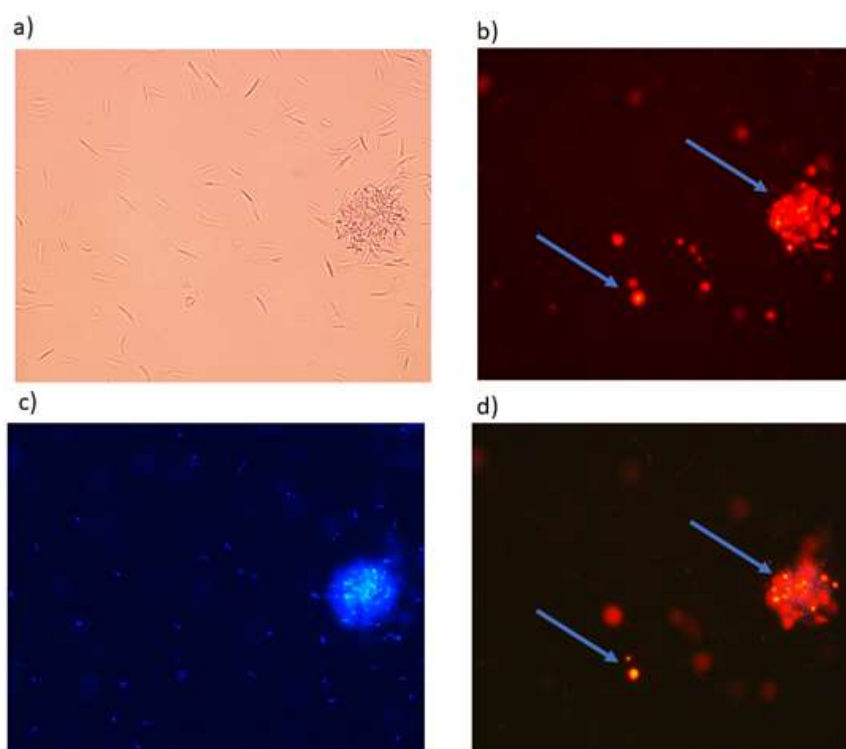
Este direcionamento específico para a membrana do vacúolo parasitóforo pode se dar pela presença do LPG que confere carga mais negativa ao vacúolo parasitóforo e a partir da carga positiva das temporinas deste trabalho e dos bioconjugados eles interagiriam com o vacúolo, formariam um poro e agiriam na forma amastigota e este efeito foi potencializado com a conjugação da Anf B nos peptídeos TSHa e TSHd (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017)], no entanto não pode se excluir os fatores que podem contribuir para a morte do parasita como a síntese NO e outro ponto essencial é todos os bioconjugados de temporinas com Anf B não apresentaram citotoxicidade perante a macrófagos peritoneais, evidenciando a seletividade dos mesmos.

4.4.3.3. Peptídeo Hist 5 e bioconjugado

Para este estudo serão mostradas as imagens referentes ao bioconjugado Anf B-Hist 5. Focando no bioconjugado Anf B-Hist 5 que é o único com a estrutura completa da Anf B liga a região N-terminal do peptídeo, na concentração 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Próximo ao $\text{IC}_{50\text{promastigota}}$) com o tempo de tratamento de 24 horas houve uma porcentagem de células que sofreram danos na membrana apresentando marcação por PI (Figura 63-b), no entanto em menor proporção quando comparadas aos peptídeos bioconjugados derivados das temporinas TSHa e TSHd.

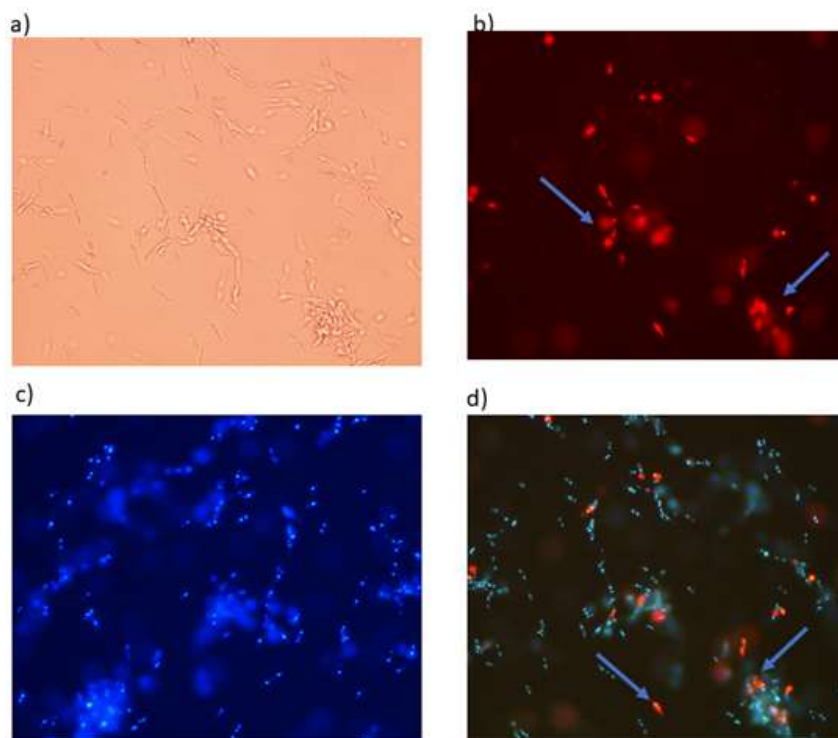
Outro ponto é que nesta concentração é evidenciado a marcação por Hoechst, demonstrando que mais células têm a sua membrana intacta. Esses dados corroboram com os dados de citometria e de permeabilização do qual foi evidenciado que o acoplamento da Anf B ao peptídeo foi importante para causar danos na membrana do parasita e permitir assim a sua internalização e que este agisse em seu alvo intracelular que é a mitocôndria.

Figura 63: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos com setas em azul indicando parasitas marcados com PI; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações com setas em azul indicando parasitas marcados com PI.



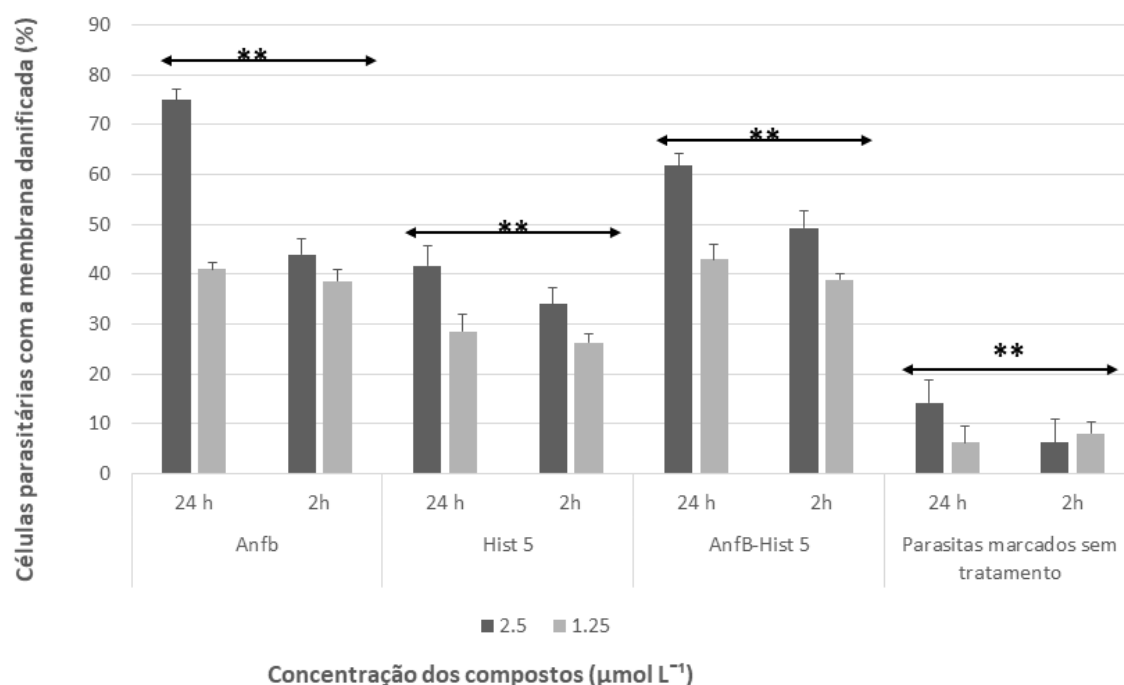
Na concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($3 \times \text{IC}_{50}$ promastigota) pelo intervalo de tratamento de 2 horas evidenciou-se danos na membrana do parasita pelo bioconjugado Anf B-Hist 5 no entanto em menor proporção (Figura 65-b). A partir destes dados podemos concluir que para haver maior permeabilização da membrana pelo bioconjugado é necessário que haja maior tempo de exposição do parasita ao bioconjugado e também isso acarretará em uma maior porcentagem de parasitos mortos.

Figura 64: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 por 2 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 5 minutos com setas em azul indicando parasitas com dano de membrana mesmo que em menor proporção; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações com setas em azul indicando parasitas com dano de membrana



Quando analisamos o experimento como um todo (Figura 66), pode-se concluir que o peptídeo sozinho possui baixa permeabilização frente a forma promastigota de *L. mexicana* de 40 % em 24 horas de tratamento e que este valor de dano a membrana só aumenta em moléculas que contam com a presença da Anf B, ou seja a Anf B é importante para aumentar a permeabilidade do peptídeo Hist 5 causando algum tipo de dano e que em conjunto com mecanismo já descrito de ação na mitocôndria poderia levar o parasita tanto na sua forma promastigota quanto a amastigota a morte.

Figura 65-Porcentagem de parasitas de *L. mexicana* na forma promastigota que sofreram danos na membrana a partir da razão de parasitas marcados com PI pelo número de parasitas marcados Hoechst frente aos tratamentos com Anf B, Hist 5, Anf B- Hist 5, nas concentrações 1,25 e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 e 24 horas de tratamento. Todos os dados receberam tratamento estatístico (Anova two-way e Teste de Tukey com significância com $p\text{-valor} < 0,05$ entre os compostos testados e significância com $p\text{-valor} < 0,01$ para as concentrações testadas). Os resultados apresentaram diferença estatística entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas de cada composto e os compostos testados (**).



4.4.4. Microscopia fluorescência confocal dos peptídeos bioconjugados com Anf B.

A técnica de microscopia confocal é gerar imagens com alto contraste por meio de seccionamento óptico. Com uma lente objetiva de alta resolução, um microscópio confocal pode gerar seções ópticas mais finas que 1 μm sem ter que cortar fisicamente a amostra. A partir disto, esta técnica pode ser usada para quantificar as intensidades e investigar o arranjo espacial de moléculas fluorescentes com alta precisão, o que é útil para atribuir a localização de moléculas em compartimentos celulares específicos ou avaliar a co-localização de diferentes moléculas (JONKMAN; BROWN; WRIGHT; ANDERSON *et al.*, 2020).

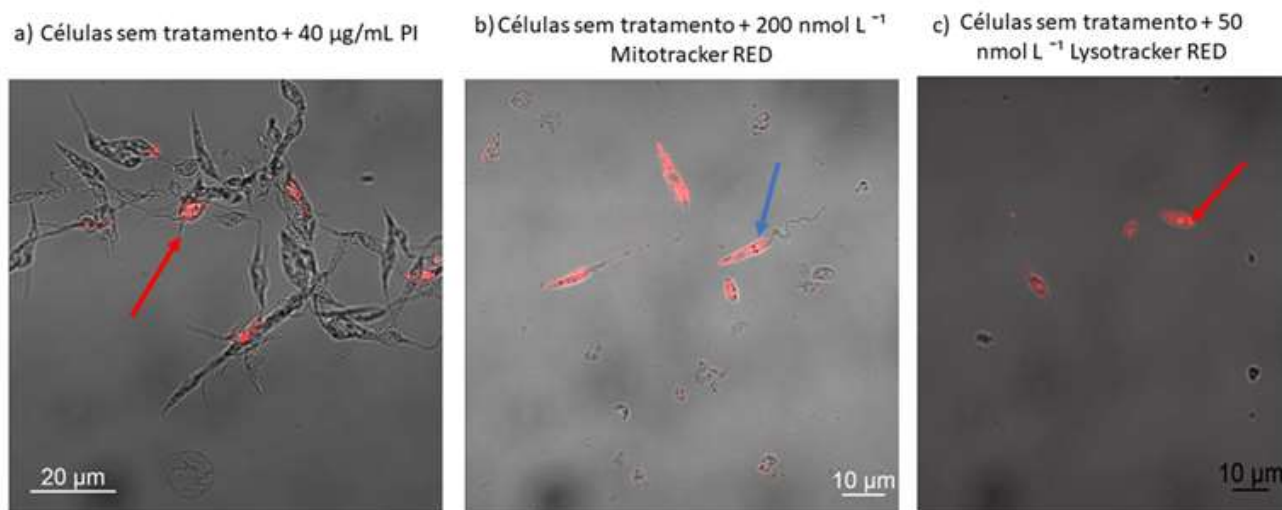
Esta técnica utiliza compostos fluorescentes que, ligados a estruturas específicas, determinam sua localização celular. A fonte de luz do microscópio confocal é formada por diversas linhas de lasers que se movem através de um *scanner* de modo a focalizar a amostra linha por linha, assim que a amostra é excitada pelo laser, esta emite fluorescência em outro comprimento de onda que é captado pelos detectores (ELLIOTT, 2020).

Para esta técnica são utilizados anticorpos e fluoróforos que geralmente são incapazes de penetrar na membrana plasmática e alcançar o citoplasma, no entanto para esta pesquisa os peptídeos bioconjugados e Anf B foram responsáveis por permear a membrana do parasita e permitir a entrada dos fluoróforos. Para esta técnica foram utilizados os seguintes fluoróforos: PI que é um intercalante de DNA e indicado dano na membrana, para estudos de co-localização utilizou-se o Mitotracker Red e o Lysotracker Red.

A cor vermelha dos fluoróforos foi escolhida pelo fato de o composto fluorescente das amostras ser a Anf B, esta tem um comprimento de emissão em 340 nm e de excitação em 350 nm, indicando que este é captado no laser azul, então para estudos de co-localização foi necessário utilizar fluoróforos que fossem excitados em comprimentos de onda diferente da Anf B (BAIBEK; ÜÇÜNCÜ; SHORT; RAMAGE *et al.*, 2021).

Como controle negativo para este ensaio foram utilizados parasitas na forma promastigota de *L. mexicana* sem tratamento, sob a marcação dos fluoróforos utilizados no trabalho (Figura 66). Foi utilizado o PI (Figura 66-a) do qual a marcação foi baixa pelo fato de poucas células sofrerem permeabilização, marcação com Mitotracker Red (Figura 66-b) que foi uma marcação específica marcando os grânulos da mitocôndria, lembrando que em tripanossomatídeos há uma única mitocôndria e o último fluoróforo utilizado foi o Lysotracker Red que é responsável por marcar o lisossomo, mas este fluoróforo em específico realiza a marcação de organelas acídicas, marcando além do lisossomo, glicosomo e acidocalisossomo (Figura 66-c).

Figura 66: Ensaio de microscopia confocal com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} sem tratamento por 5 horas de incubação. Em a) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 15 minutos do qual a flecha em vermelho indica os parasitas que foram marcados por PI; b) *L. mexicana* marcado 200 nmol L^{-1} de Mitotracker red por 20 minutos no qual a flecha em azul indica a marcação por mitotracker evidenciando os grânulos; c) *L. mexicana* marcado 50 nmol L^{-1} de Lysotracker red por 20 minutos e a flecha em vermelho indica os parasitas marcados com Lysotracker.

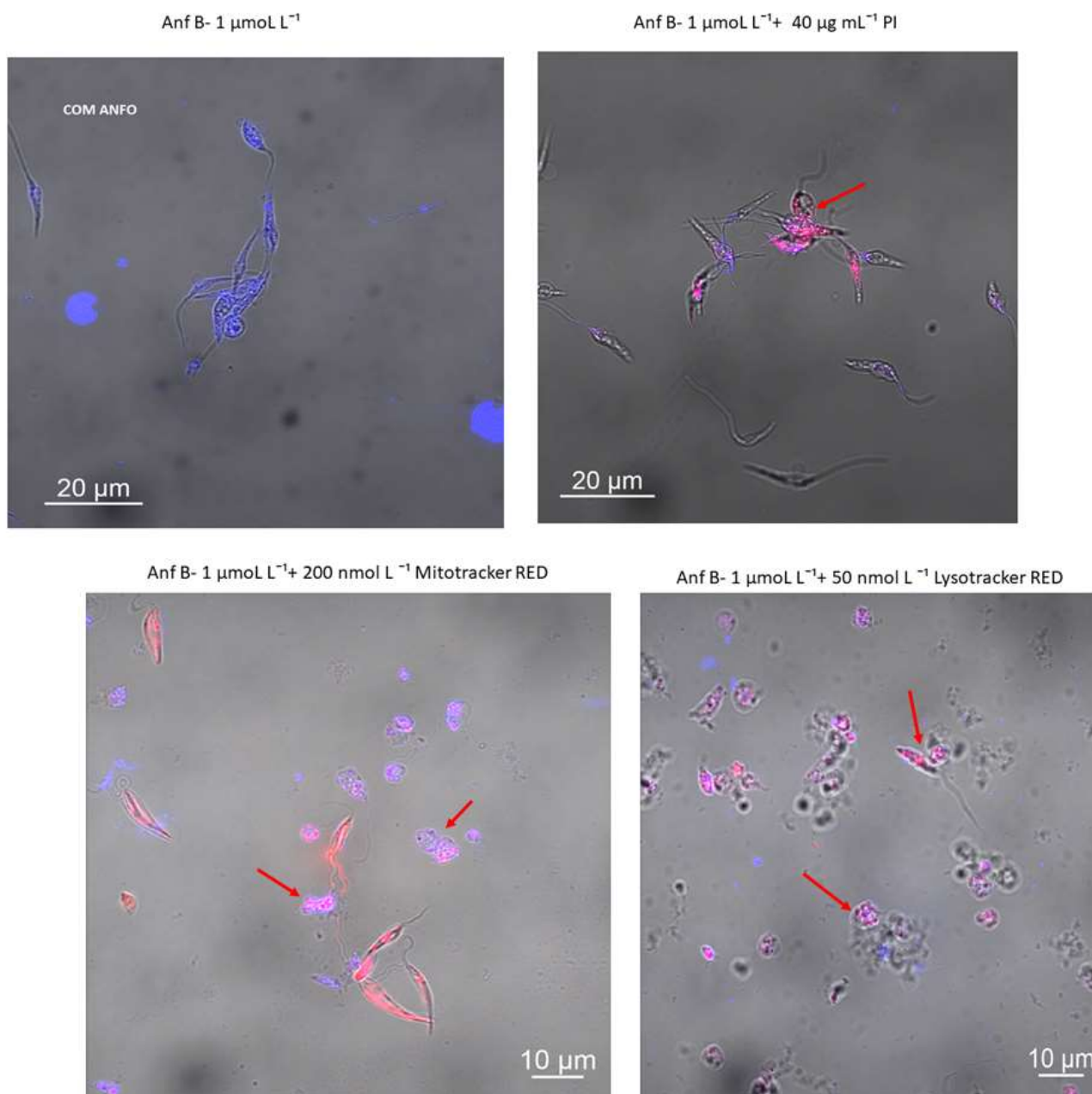


Inicialmente para entender o mecanismo de internalização dos peptídeos, foram realizados os ensaios de microscopia com a Anf B, do qual foi utilizado uma concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de composto com uma incubação de cinco horas. O tempo para esse ensaio foi determinado a partir de estudos da viabilidade do parasita frente aos compostos, sendo necessário que este mantivesse sua forma íntegra para os ensaios de confocal.

Os parasitas internalizaram a droga Anf B (Figura 67-a) mostrando que esta é capaz de formar poros na membrana como descrito na literatura. Na marcação por PI foi possível ver uma alta marcação mostrando o dano na membrana (Figura 67-b).

Em relação a marcação por Mitotracker red para o composto Anf B em parasitas com a sua estrutura íntegra só foi observado a marcação por mitotracker (Figura 68-c), já em parasitas com perda de forma e em conglomerados foi possível observar a co-localização da Anf B na mitocôndria (Figura 67-c) e o mesmo foi observado na marcação pelo lysotracker (Figura 67-d).

Figura 67: Ensaios de microscopia confocal com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação. Em a) *L. mexicana* tratada com Anf B $1 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) *L. mexicana* tratada com Anf B $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 15 minutos com flechas em vermelho indicando os parasitas que colocalizaram; c) *L. mexicana* tratada com Anf B $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ marcado com 200 nmol L^{-1} de Mitotracker red por 20 minutos com flechas em vermelho indicando os parasitas que colocalizaram; d) *L. mexicana* tratada com Anf B $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado com 50 nmol L^{-1} de Lysotracker red por 20 minutos com flechas em vermelho indicando os parasitas que colocalizaram.

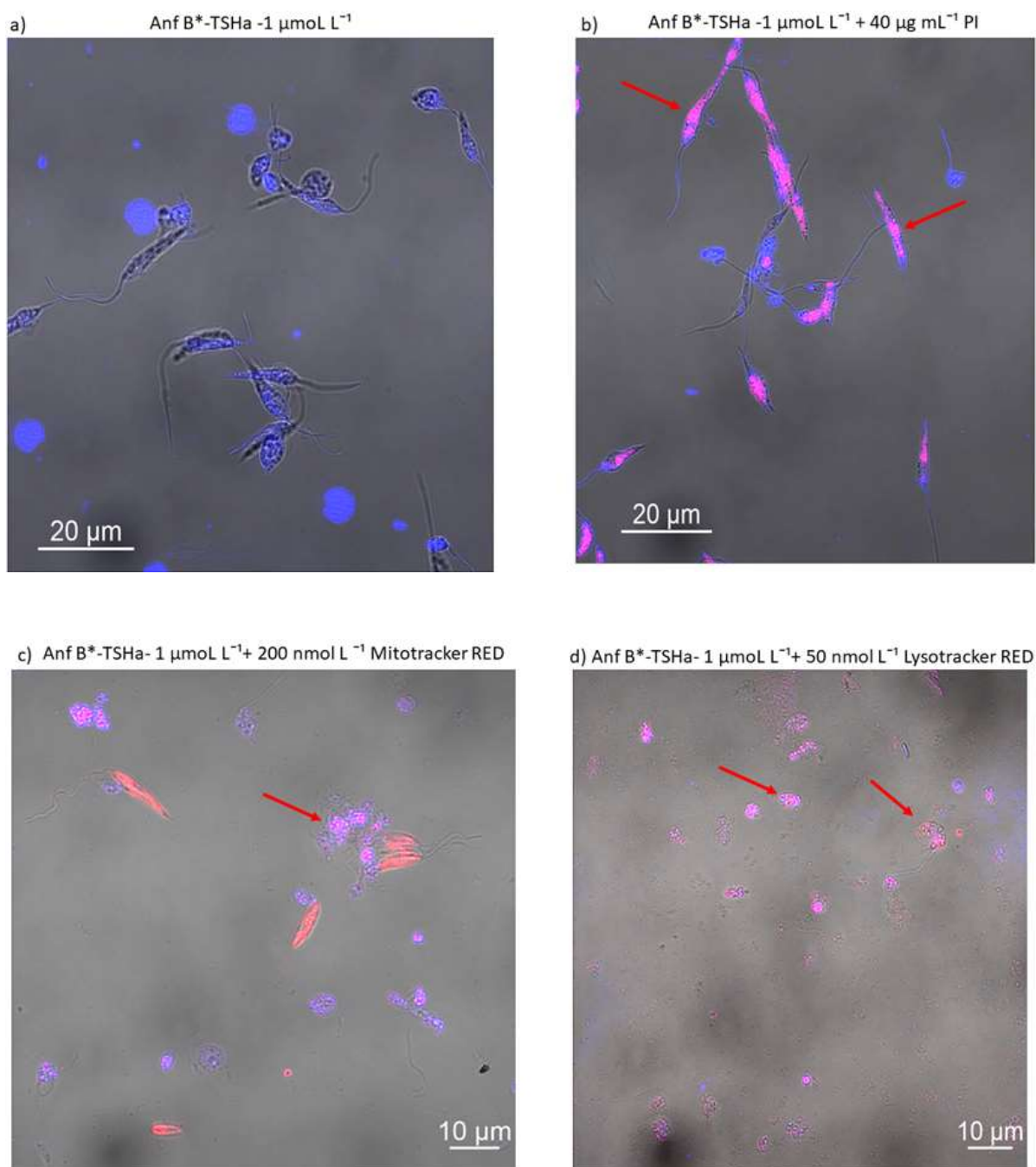


Para os peptídeos bioconjugados com Anf B o perfil de marcação observado foi semelhante ao encontrado no composto Anf B, com algumas exceções. Para os peptídeos derivados de temporina está representado o composto Anf B*-TSHa, os demais estarão nas figuras em anexo.

A internalização do composto Anf B*-TSHa foi maior pela forma promastigota de *L. mexicana*, pelo fato de o mecanismo de ação dessa molécula agir rapidamente na membrana do parasita como demonstrado pela microscopia de fluorescência, além disso o peptídeo aumentou a permeabilização da membrana em conjunto com Anf B acoplada (Figura 68-a). Outro ponto importante é que a marcação por PI foi mais intensa e mais células foram marcadas, comprovando maior dano à membrana (Figura 68-b).

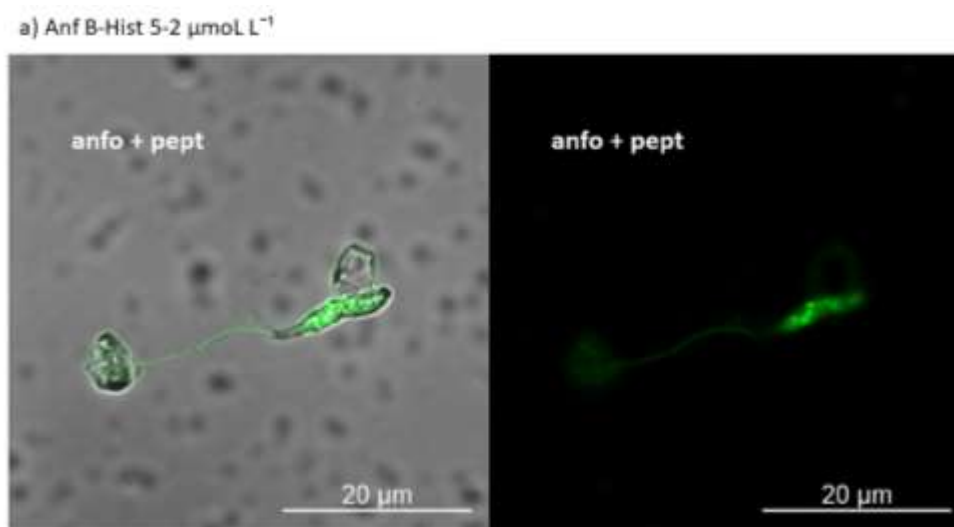
Para marcação por mitotracker red só foi possível observar colocalização em grupos de parasitos que não tinham sua forma preservada e além disso observou-se mais conglomerados de células o que indica que mais células estão em processo de morte celular (Figura 68-c). Já para a marcação por lysotracker a compartimentalização do peptídeo observou-se tanto em células em processo de morte quanto em parasitas com a sua estrutura de membranas e organelas preservados (Figura 68-d), estes demonstram que o bioconjugado é compartimentalizado na mitocôndria, em organelas acídicas e pela membrana, no entanto com algumas diferenças o que pode dar indícios de mecanismos de morte dessa molécula.

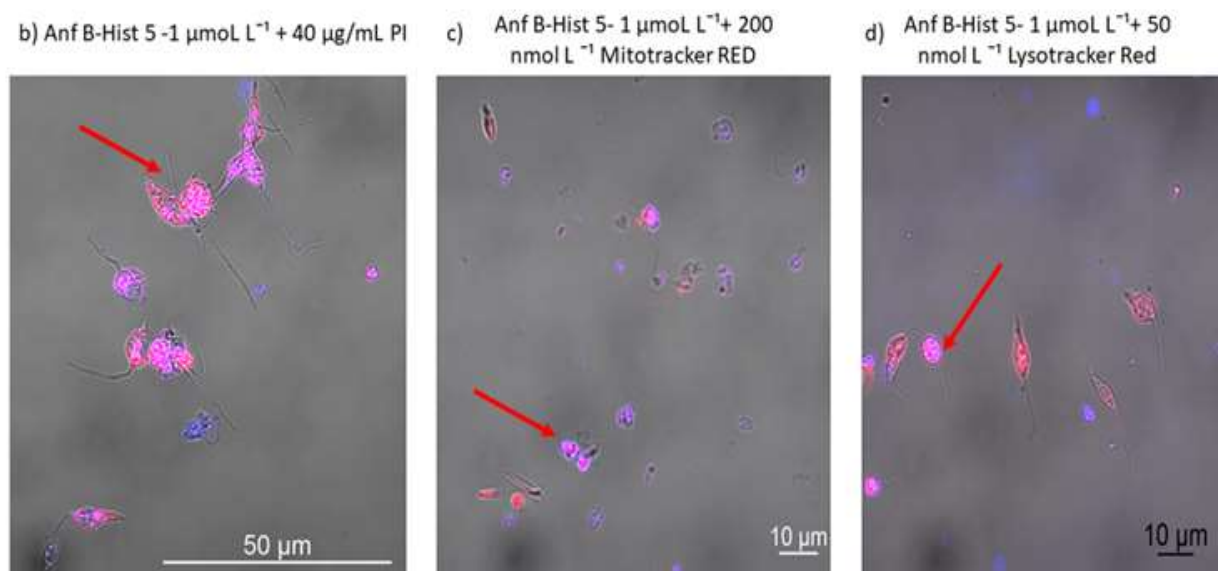
Figura 68: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B*-TSHA $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal. Em a) *L. mexicana* tratada com Anf B*-TSHA $1 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) *L. mexicana* tratada com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 15 minutos com flechas em vermelho indicando os parasitas que colocalizaram; c) *L. mexicana* tratada com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado com 200 nmol L^{-1} de Mitotracker red por 20 minutos com flechas em vermelho indicando os parasitas que colocalizaram; d) *L. mexicana* tratada com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado com 50 nmol L^{-1} de Lysotracker red por 20 minutos com flechas em vermelho indicando os parasitas que colocalizaram.



O peptídeo bioconjugado Anf B-Hist também foi internalizado pela forma promastigota de *L. mexicana* (Figura 69-a), na marcação por PI houve danos na membrana pelo bioconjugado e foi possível visualizar a marcação (Figura 69-b). Para o fluoróforo específico de mitocôndria o mitotracker red houve uma marcação mais específica em relação aos outros compostos testados, visualizando perfeitamente a colocalização em células de *Leishmania* com a forma preservada, foi possível observar as cristas mitocôndriais sendo marcadas e além disso foi possível observar mais células colocalizadas (Figura 69-c), no entanto o mesmo não aconteceu para a marcação com o lysotracker red, poucas células apresentaram colocalização em organelas acídicas, demonstrando que este bioconjugado tem provavelmente um alvo específico que é a mitocôndria (Figura 69-d).

Figura 69: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células mL^{-1} tratadas com Anf B-Hist 5 na concentração de 2 e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal. Em a) *L. mexicana* tratada com Anf B-Hist 5 - $2 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) *L. mexicana* tratada Anf B-Hist 5 - $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI por 15 minutos com flechas em vermelho indicando colocalização; c) *L. mexicana* tratada com Anf B-Hist 5- $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado com 200 nmol L^{-1} de Mitotracker red por 20 minutos flechas em vermelho indicando colocalização; d) *L. mexicana* tratado com Anf B-Hist 5 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado com 50 nmol L^{-1} de Lysotracker red por 20 minutos flechas em vermelho indicando colocalização.





Com os dados apresentados podemos concluir que os peptídeos conjugados com Anf B derivados das temporinas podem apresentar como mecanismo inicial de ação o dano na membrana, causando uma desestabilização da mesma e acarretando um processo de morte celular, após isso ele se compartimentaliza com as organelas acídicas e quando o mecanismo de morte está mais avançado com mudanças na permeabilidade da superfície, perda de forma do parasita, degradação do DNA, despolarização do potencial de membrana mitocondrial, neste momento esses compostos se compartimentaliza com a mitocôndria tornando assim sua ação leishmanicida efetiva, isto já foi visto com outros peptídeos como a catelicidina e outras temporinas (BELLAVITA; FALANGA; BUOMMINO; MERLINO *et al.*, 2020; CRAUWELS; BANK; WALBER; WENZEL *et al.*, 2019; EGGIMANN; SWEENEY; BOLT; ROZATIAN *et al.*, 2015; IORNS; GUNN; ERATH; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; LYNN; KINDRACHUK; MARR; JENSSEN *et al.*, 2011; RAJA; ANDRÉ; ABBASSI; HUMBLLOT *et al.*, 2017).

Para o bioconjugado Anf B-Hist 5 os dados encontrados corroboram para evidenciar que provavelmente o mecanismo principal desse peptídeo é a mitocôndria, como passo inicial este peptídeo permeabiliza a membrana do parasita, facilitando sua internalização, do qual este se compartilha especificamente na mitocôndria, ocasionando a inibição da ATP sintase, desencadeando efeitos na produção de ATP, desbalanço energético, o que pode acarretar em um processo de morte celular.

E os mecanismos descritos também podem estar ocorrendo na forma amastigota, do qual a presença de lisofosfoglicana no vacúolo parasitóforo facilita a internalização dos bioconjugados pela membrana, fazendo com que estes atinjam a forma amastigota.

4.5. Planejamento dos peptídeos inéditos inibidores do canal iônico MCU

4.5.1. Construção e validação do modelo por homologia

Uma outra estratégia para o desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de doenças parasitárias, é o planejamento baseado no alvo.

Sendo assim e devido à ausência da estrutura tridimensional cristalográfica da proteína MCU de *L. mexicana*, foi utilizado uma modelagem por homologia a fim da obtenção desta estrutura a fim de desenvolver a estratégia de planejamento de peptídeos que inibam este canal iônico.

Como já mencionado anteriormente, a proteína MCU de tripanosomatídeos não possui estrutura tridimensional caracterizada. O banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) contém informações do genoma de tripanosomatídeos e este indica a proteína do organismo *C. elegans* (sequência PDB: 5id3), como sendo a proteína com estrutura similar a proteína MCU de *L. mexicana*.

Outro dado importante é que, com base na sequência da proteína MCU de *L. mexicana*, e com a utilização do programa Swiss Model, que buscou no banco de dados estruturas cristalográficas de proteínas com similaridade sequencial e com a mesma função, outra estrutura também foi utilizada para a construção do modelo por homologia, a estrutura de código pdb 6DNF do microrganismo *Cyphellophora europaea*.

De acordo com os dados resultantes da análise de similaridade, a sequência do 6DNF apresentou 31,25 % de similaridade e o 5ID3 apresentou 26,56 % de similaridade (Figura 70).

Figura 70: Análise da similaridade das estruturas proteicas da proteína MCU com a sequência de *L. mexicana*, destacando as estruturas 6DNF e 5ID3 com maior similaridade com o template usado.

6DNF	6dnf.1.A	Mitochondrial calcium uniporter MCU		0.26	0.11	31.25	EM	homo-tetramer ✓	2 x CA ¹⁵ , 7 x DGG ¹⁵
	6dnf.1.A	Mitochondrial calcium uniporter MCU		0.21	0.15	21.05	EM	homo-tetramer ✓	2 x CA ¹⁵ , 7 x DGG ¹⁵
	6dnf.1.B	Mitochondrial calcium uniporter MCU		0.21	0.15	21.05	EM	homo-tetramer ✓	2 x CA ¹⁵ , 7 x DGG ¹⁵
	6o58.1.E	Calcium uniporter protein, mitochondrial		0.29	0.17	28.36	EM	hetero-16-mer Δ	2 x CA ¹⁵
	6o58.1.A	Calcium uniporter protein, mitochondrial		0.29	0.17	28.36	EM	hetero-16-mer Δ	2 x CA ¹⁵
	6o58.1.I	Calcium uniporter protein, mitochondrial		0.29	0.17	28.36	EM	hetero-16-mer Δ	2 x CA ¹⁵
5ID3	5id3.1.E	Mitochondrial Calcium Uniporter		0.28	0.01	26.56	NMR	homo-pentamer ✓	None
	5id3.1.D	Mitochondrial Calcium Uniporter		0.28	0.01	26.56	NMR	homo-pentamer ✓	None
	5id3.1.C	Mitochondrial Calcium Uniporter		0.28	0.01	26.56	NMR	homo-pentamer ✓	None
	5id3.1.B	Mitochondrial Calcium Uniporter		0.28	0.01	26.56	NMR	homo-pentamer ✓	None
	5id3.1.A	Mitochondrial Calcium Uniporter		0.28	0.01	26.56	NMR	homo-pentamer ✓	None

Com intuito de realizar estudos mais específicos entre a sequência template, a sequência de *L. mexicana* e avaliar sua especificidade como alvo terapêutico realizaram-se análises de similaridade com a sequência proteica de MCU de *L. mexicana*, *C. elegans*, *C. europaea* e a proteína MCU humana, utilizando o programa BlastP.

Ao final da análise a sequência proteica de MCU de *L. mexicana* e *C. elegans* apresentou cerca de 28,75% de identidade, a sequência de *L. mexicana* em relação a proteína humana foi cerca de 35% de identidade. Apesar da sequência molde apresentar uma maior similaridade com a da proteína humana, este pode ser um bom alvo terapêutico, pois há diferenças sequenciais entre a região do sítio ativo da proteína MCU de *L. mexicana* e a humana, podendo-se concluir que os peptídeos que serão desenvolvidos serão mais específicos para *L. mexicana*, além a sequência molde e o template de *C. elegans* apresentam resíduos do sítio ativo conservados e que diferem da proteína MCU humana permitindo assim que os peptídeos a serem desenhados possam ser específicos ao alvo.

Com a *C. europaea* a sequência da proteína de *L. mexicana* apresentou cerca de 29,71% de similaridade, dados da literatura indicam que para a construção de

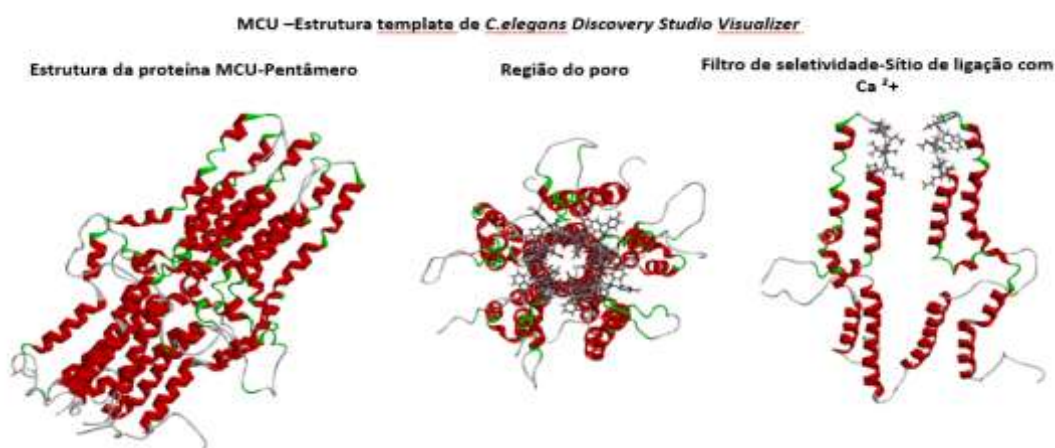
estruturas por homologia, os templates utilizados devem apresentar uma similaridade de acima de 25%, indicando que estas estruturas podem ser utilizadas (Figura 71) (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

Figura 71: Análise da similaridade das sequências das proteínas de MCU de *L. mexicana*, *H. sapiens*, *C. elegans* e *C. europaea*.

		Identidade						
MCU- <i>L.mexicana</i>	✓	conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/UJ1103]	658	658	100%	0.0	100.00%	XP_003876652
	✓	conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/UJ1103]	71.6	71.6	28%	3e-13	36.26%	XP_003875437
MCU- <i>Homo sapiens</i>	✓	calcium uniporter protein, mitochondrial isoform 3 [Homo sapiens]	61.2	61.2	28%	2e-09	35.35%	NP_001257609
	✓	calcium uniporter protein, mitochondrial isoform 1 precursor [Homo sapiens]	61.2	61.2	28%	2e-09	35.35%	NP_612366.1
	✓	calcium uniporter protein, mitochondrial isoform X1 [Homo sapiens]	61.2	61.2	28%	2e-09	35.35%	XP_016872371
	✓	unnamed protein product [Homo sapiens]	61.2	61.2	28%	2e-09	35.35%	BAG37900.1
	✓	calcium uniporter protein, mitochondrial isoform 2 precursor [Homo sapiens]	59.3	59.3	23%	9e-09	39.74%	NP_001257608
	✓	CCDC109A protein [Homo sapiens]	59.3	59.3	23%	9e-09	39.74%	AAH10682.1
MCU- <i>C.europaea</i>	✓	hypothetical protein HMPREF1541_00236 [Cyphellophora europaea CBS 101466]	55.1	55.1	51%	2e-07	29.71%	XP_008710765
	✓	Chain A, Mitochondrial calcium uniporter MCU [Cyphellophora europaea CBS 101466]	55.1	55.1	51%	2e-07	29.71%	6DNF_A
	✓	calcium uniporter regulatory subunit MCUb, mitochondrial [Homo sapiens]	55.1	55.1	66%	2e-07	23.72%	NP_060388.2
MCU- <i>C.elegans</i>	✓	calcium uniporter regulatory subunit MCUb, mitochondrial isoform X1 [Homo sapiens]	54.7	54.7	66%	3e-07	24.51%	XP_006714309
	✓	Calcium uniporter protein, mitochondrial [Caenorhabditis elegans]	54.3	54.3	41%	4e-07	28.79%	NP_500892.1

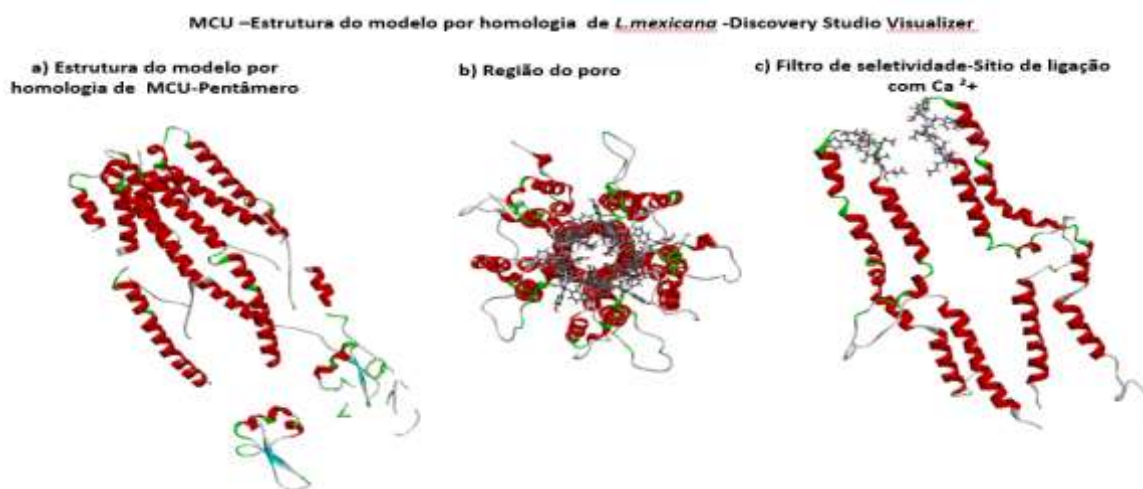
Para a realização dos estudos da docagem molecular é necessário a estrutura tridimensional da proteína. Para isso, foram construídas estruturas baseadas em homologia com *C. elegans* e *C. europaea*, utilizando o programa Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Foram construídas 2 estruturas por homologia utilizando os moldes da proteína MCU de *C. elegans* (Figura 72) e de *C. europaea*, do qual a estrutura escolhida foi a baseada em *C. elegans* do qual resultou a proteína por homologia de *L. mexicana*.

Figura 72: Estrutura da proteína MCU *C. elegans* (5id3) usada como molde para a construção do modelo por homologia.



O modelo resultante do molde 5ID3 manteve a maioria de sua estrutura conformacional se comparado com o template, outro ponto a se ressaltar é que os resíduos de carga negativa (E, D) (YOO; WU; YIN; HERZIK *et al.*, 2018), que se voltam ao centro do poro ao qual o Ca^{2+} se liga, mantiveram-se conservados no modelo por homologia (Figura 73). Após a construção do modelo, este foi otimizado e validado a fim de que se tornasse energeticamente favorável.

Figura 73: Modelo por homologia da proteína MCU de *L. mexicana*, no qual em (a) é a estrutura completa por homologia, em (b) Região do poro (c) os sítios de ligação com cálcio, destacando a presença dos íons negativos.



O modelo da proteína MCU construída foi otimizado e validado, no método semiempírico para a otimização foram utilizadas as seguintes variáveis: carga da

estrutura, solvatação, ligação peptídica, PM7 Hamiltoniano, constante dielétrica minimização energética, conformação dos resíduos, para que estes se encontrem na posição mais favorável.

A estrutura resultante do 5ID3, de acordo com os dados obtidos após a otimização, apresentou cerca de 81,9% de resíduos favoráveis no gráfico de ramachandran, sendo que o ideal seria 98 % (CHEN; ARENDALL; HEADD; KEEDY *et al*, 2010) (Figura 74), outro ponto é que há grande quantidade de outliers no ramachandran, no entanto resíduos importantes para a ligação com o cálcio se encontram na região de resíduos favoráveis (Figura 75).

Figura 74: Dados resultantes da otimização energética realizada através do método semiempírico PM7 com o programa MOPACK, destacando que os dados em vermelho se encontram fora dos parâmetros ideais.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	7.58	84 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	30	5.17% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	526	90.69% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	53	7.74% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	561	81.90% Goal: >98%
	MolProbity score	2.67	38 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	38	5.63% Goal: 0
	Bad bonds:	8 / 5920	0.14% Goal: 0%
	Bad angles:	84 / 8035	1.05% Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 20	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Cis nonProlines:	3 / 670	0.45% Goal: <0.05%

por homologia que utilizou como template *C. europaea*, apresentou um maior número de resíduos em região favorável no gráfico de Ramachandran (93 %) (Figuras 77 e 78).

Outro ponto a se destacar é que a estrutura utilizada como template neste caso o 6DNF foi cristalizada com um átomo de cálcio na região do sítio do filtro de seletividade, portanto a estrutura por homologia foi modelada da mesma forma, permitindo assim especificar quais os resíduos específicos da estrutura por homologia que interagem com cálcio, indicando possíveis alvos para o docking e ancoramentos dos peptídeos.

Figura 76: (a) Estrutura da proteína MCU *C. europaea* (6dnf) usada como molde para a construção do modelo por homologia, em (1) Proteína completa e em destaque os resíduos de carga negativa que fazem ligação com íon cálcio e em (2) Região do poro com a presença de um íon cálcio. (b) Modelo por homologia da proteína MCU de *L. mexicana*, no qual em (3) é a estrutura completa por homologia, em (4) a região do poro e sítio de ligação com cálcio.

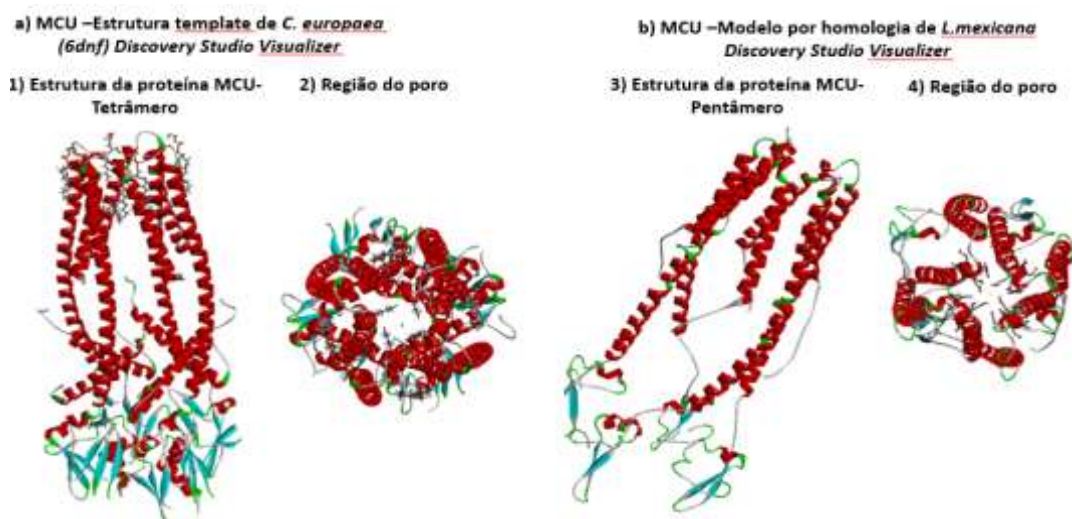
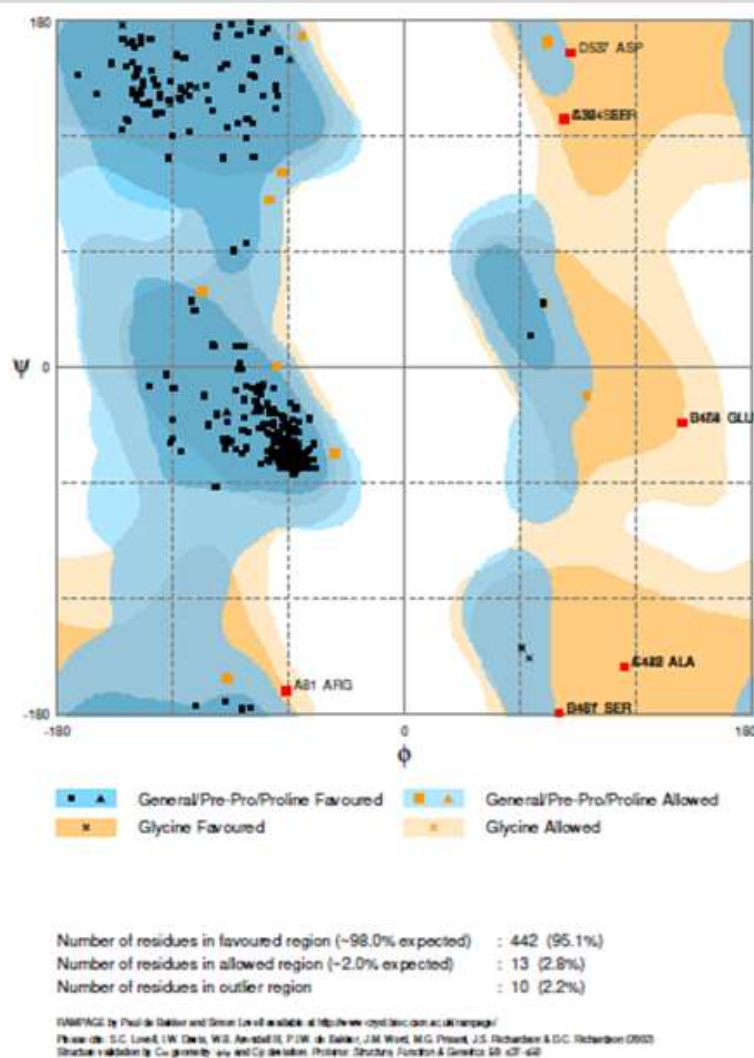


Figura 77: Dados resultantes da otimização energética realizada através do método semiempírico PM7 com o programa MOPAC, destacando que os dados em vermelho se encontram fora dos parâmetros ideais.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	7.44	84 th percentile* (N=1784, all resolutions)	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	417	98.35%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	7	1.49%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	438	93.39%	Goal: >98%
	MolProbity score ^o	1.84	84 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)	
	C β deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	172 / 4181	4.11%	Goal: 0%
	Bad angles:	54 / 5608	0.96%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 12	0.00%	Expected: $\leq$ 1 per chain, or $\leq$ 5%
	Cis nonProlines:	1 / 476	0.21%	Goal: <0.05%

Figura 78: Gráfico de Ramachandran da estrutura otimizada do MCU a partir do template do 5ID3, este gráfico representa todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ (psi) versus os ϕ (phi) nos aminoácidos de um polipeptídeo, as combinações mais estáveis de ângulos C alfa-N e C alfa-C dos resíduos de aminoácidos. Para cada resíduo em uma proteína, dois ângulos de torção ϕ (phi) e ψ (psi) determinam a conformação do esqueleto da proteína, do qual a região em azul indica os resíduos que se encontram em região mais energeticamente favorável, quanto mais afastado da região azul são as regiões de conformação menos favorável.



4.5.2. Estudo da interação do modelo por homologia de MCU de *L. mexicana* com inibidores conhecidos de MCU e planejamentos dos peptídeos inibidores de MCU.

Como descrito no relatório anterior, após a construção do modelo por homologia do MCU de *L. mexicana* baseado na estrutura de *C. elegans* (5ID3) e otimização energética, avaliou-se a interação da estrutura obtida com inibidores conhecidos de MCU: tetraciclina b, nicroX 5, mitoxantrone, KB-R793, Despiramina, DS1657051, curcumin B, ciclosporina D e ciclosporina 5, aminosalicilato, (Hexa)cetylpiridinium e assim, predizer quais são as principais estruturas químicas e átomos envolvidos na interação para posterior planejamento de peptídeos com o mesmo comportamento químico.

Não há ainda disponível a estrutura cristalográfica do MCU de *Leishmania*. Em *L. mexicana*, a proteína MCU não possui uma estrutura cristalográfica, no entanto, acredita-se que a sua conformação seja homóloga à proteína MCU de *C. elegans*, a qual consiste em uma organização pentamérica na qual o domínio transmembrana é composto por dez hélices dispostas em duas camadas concêntricas e os resíduos específicos de aspartato e glutamato, identificados como formadores do filtro de seletividade (YOO; WU; YIN; HERZIK *et al.*, 2018). Neste projeto, em estudos preliminares já conduzidos, utilizamos a proteína MCU de *C. elegans*, como modelo para criar e validar uma estrutura tridimensional de MCU de *L. mexicana* por modelagem molecular.

Para obtenção de mais informações do sítio ativo, serão realizadas comparações com proteínas de uma mesma família e também serão usados inibidores conhecidos para desenvolver o processo de docking, permitindo assim que peptídeos sejam planejados de modo a inibir a ligação do cálcio ao MCU e, consequentemente, diminuir o influxo de Ca^{2+} mitocondrial.

Os inibidores foram então ancorados com o modelo de MCU de *L. mexicana* e as principais interações químicas determinadas com auxílio do programa Discovery Studio Visualizer, sendo elas interações iônicas, empilhamento pi, ligações de hidrogênio, principalmente com resíduos de carga negativa, resíduos aromáticos, e resíduos de sítio ativo.

Um dos inibidores que foram ancorados foi o mitoxantrone, do qual este interagiu com o filtro de seletividade destacando o motivo DIME que são os resíduos que se ligam com o cálcio (ARDUINO; WETTMARSHAUSEN; VAIS; NAVAS-NAVARRO *et al.*, 2017; OXENOID; DONG; CAO; CUI *et al.*, 2016), essa inibição se baseia em uma interação eletrostática do qual parte da estrutura da molécula do mitoxantrone carregado positivamente interage com os resíduos de carga negativa do MCU ocasionando sua inibição da MCU (CHAUDHURI; CLAPHAM, 2014) (Figura 79), outro inibidor como a tetraciclina (Figura 80) interage principalmente com os átomos de glutamato da região do filtro de seletividade do poro da proteína MCU.

Figura 79: Estrutura do Modelo por homologia MCU (verde) com docking do inibidor mitoxantrona (laranja), focando na interação com o filtro de seletividade da proteína MCU.

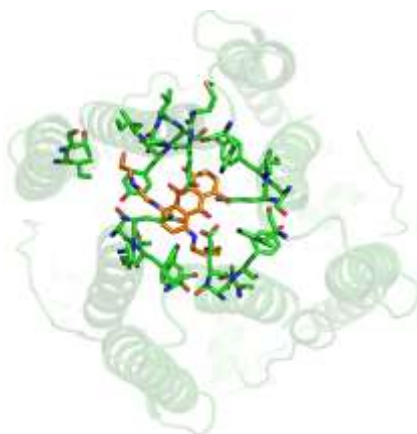
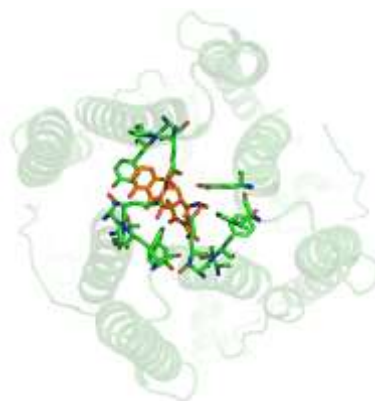


Figura 80: Estrutura do Modelo por homologia MCU (verde) com docking do inibidor tetraciclina (laranja), focando na interação com o filtro de seletividade da proteína MCU.



Com exceção de ciclosporina A, todos os inibidores testados interagiram com o filtro de seletividade, revelando uma base para o planejamento dos peptídeos inibidores de MCU.

Considerando ainda a interação do inibidor mitoxantrone com o MCU, temos que esta proteína apresenta resíduos ácidos presentes no filtro de seletividade, duas hélices transmembranares, com porções amino terminal e carboxílica voltados para a matriz mitocondrial contendo um pequeno trecho hidrofílico de aminoácidos (YSWDI) ligando-os na região do poro do canal frente ao espaço intermembranar mitocondrial.

Pelo docking rígido da mitoxantrona com a MCU foi possível visualizar a interação de amina secundárias deste inibidor com cadeias laterais de três dos cinco aspartatos presentes no filtro de seletividade, destacando como as principais interações químicas as eletrostáticas e ligações de hidrogênio, além disso a hidroxila do resíduo de serina é importante para a interação com outros inibidores como o Ru360 e RUR.

Esta análise permitiu o planejamento inicial de peptídeos inéditos potencialmente inibidores do fluxo de Ca^{2+} de MCU, levando em consideração algumas características importantes: os novos peptídeos (1) não devem possuir volume estrutural grande, considerando o pequeno tamanho do poro; (2) possuir carga parcial positiva para permitir interação com os resíduos acídicos e de carga negativa do filtro de seletividade; (3) presença de resíduos aromático para permitir que possuam um torção interessante a fim de realizar interações iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas.

Desta forma, foram planejados 17 peptídeos lineares e 16 peptídeos cíclicos, os quais foram energeticamente minimizados, seguido de determinação de parâmetros como pKA e estado de protonação, seguido de ancoragem com as estruturas de MCU de *L. mexicana* e template 5ID3.

Dos peptídeos inicialmente planejados, todos mostraram-se alojados na região do sítio de ligação do Ca^{2+} e interagindo com os resíduos de carga negativa do filtro de seletividade tanto no modelo por homologia quanto na estrutura molde do 5ID3, dos quais foram selecionados os 10 melhores ranqueados de acordo com a função do docking utilizada (Tabela 4) e (Tabela 5).

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

Peptídeos Lineares	P-score
1ºAla-Trp-Pro-Pro-His	58
2ºAla-Trp-Pro-His-His	58.50
3º Trp-Tyr-His-Prol	57.3818
4º Ala-Trp-Pro-Lys	49
5º Phe-Lys-Ile-Val	47.2341
6ºGly-Ser-Trp-Pro-Lys	48
7º Ala-Ser-Pro-Lys	42.54
8ºAla-Tyr-Pro-Lys-Lys	46.20
9º Gly-His-Tyr-Pro-Lys	36
10º Gly-Ser-His-Pro-Lys	35.08
11º Gly-Tyr-Trp-Prol-Lys	32.20

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

Peptídeos cíclicos	P-score
1ºPhe-Arg-Pro-Val	66.96
2ºTrp-His-Leu-Val	66.66
3º Tyr-Cys-Cys-Leu-Val	65.19
4º Phe-Arg-Pro-Val	53.4342
5º Phe-Tyr-Ala-Val	53.0869
6ºPhe-Ser-Tyr-Leu-Ile	46.2369
7ºTrp-Lys-Ala-Ala	46.4169
8ºTrp-Lys-Tyr-Phe	40.9451
9ºTyr-Lys-Val	38.2901
10º Phe-His-Tyr-Val:	38

Para o planejamento dos peptídeos alguns pontos foram levados em consideração: o sítio de ancoragem do docking, o tamanho dos peptídeos, os resíduos utilizados e também o ponto específico de ancoragem (a caixa de interação).

As principais interações químicas visualizadas entre os inibidores e a mitoxantrona que serviram de base para o planejamento dos peptídeos foram: torção, anéis aromáticos e carga parcial positiva, outro ponto importante é que o resíduo de

lisina, histidina e arginina presente na sequência dos peptídeos lineares e cíclicos são resíduos essenciais na interação com o resíduo glutamato do filtro de seletividade da proteína MCU, dos quais permitem que demais resíduos se ancoram no poro e causem um bloqueio do mesmo.

Os peptídeos cíclicos planejados possuem maior flexibilidade e torção podem se ancorar melhor no poro por isso este possuem uma maior pontuação que os lineares (Figuras 81 e 82- peptídeos lineares) e (Figuras 83 e 84- peptídeos cíclicos).

Figura 81: Peptídeo linear Ala-Trp-Pro-His (1º no ranking) ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de *C.elegans*, no qual é demonstrado a ancoragem do mesmo no interior do poro e também o resíduo de lisina que interage com o Glu é extremamente importante para a interação.

1) Ala-Trp-Pro-Pro-His- pschore:58.50

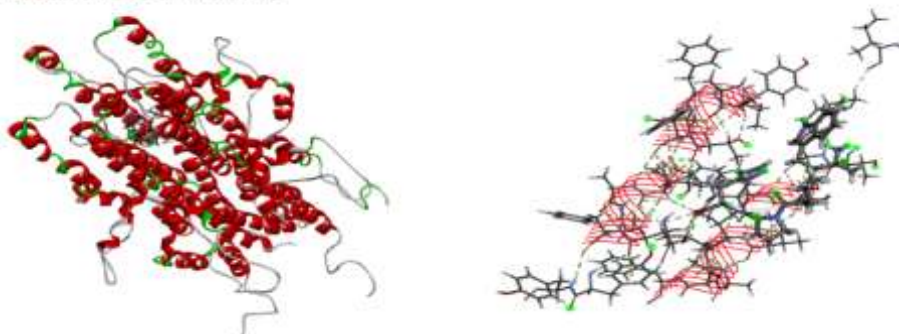


Figura 82: Peptídeo linear Ala-Trp-Pro-His-His (2º no ranking) ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de *C.elegans*, no qual é demonstrado a ancoragem do mesmo no interior do poro e também o resíduo de lisina que interage com o Glu é extremamente importante para a interação.

2) Ala-Trp-Pro-His-His- pschore:58.50

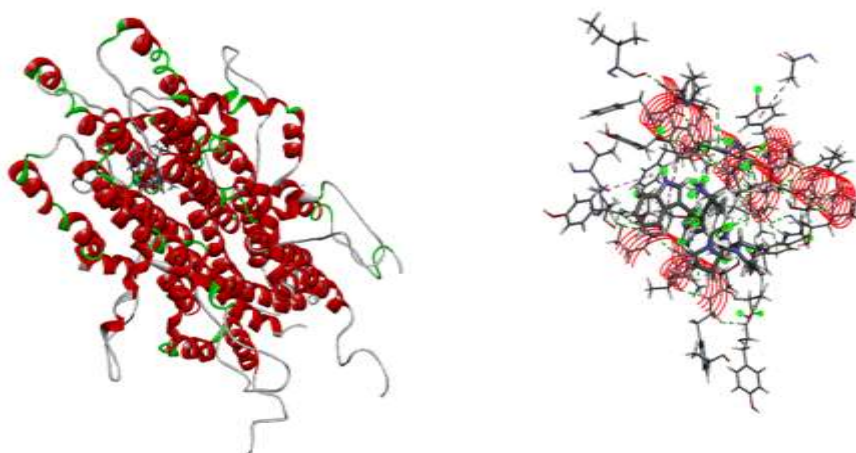


Figura 83: Peptídeo cíclico Phe-Arg-Pro-Val (1º no ranking) ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de *C.elegans*, no qual é demonstrado a ancoragem do mesmo no interior do poro e também o resíduo de lisina que interage com o Glu é extremamente importante para a interação.

1-) Phe-Arg-Pro-Val- pschore:66.96

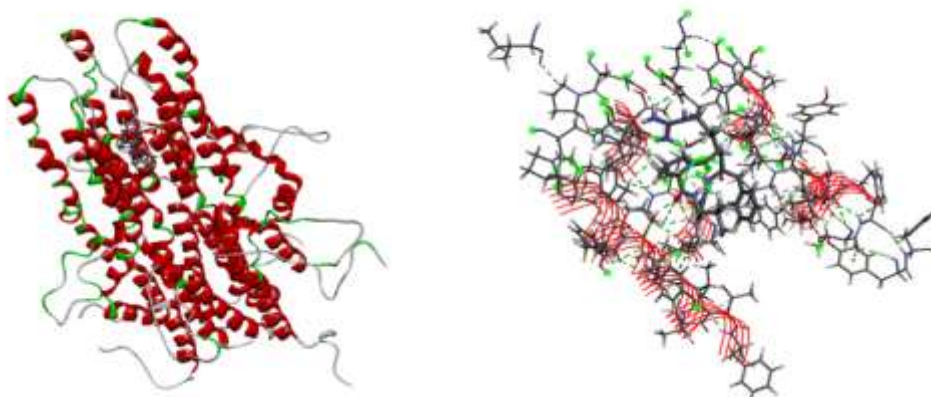
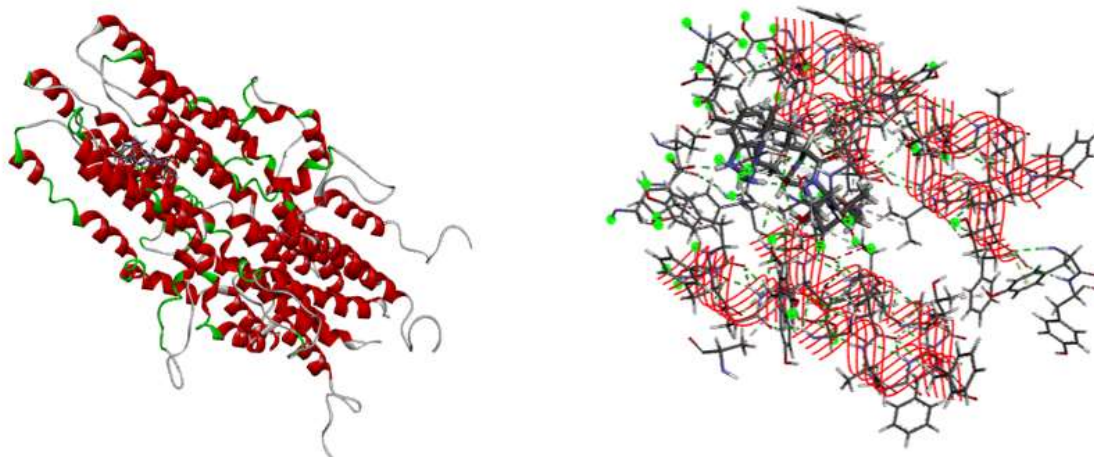


Figura 84: Peptídeo cíclico Tyr-Cys-Leu-Val (2º no ranking) ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU de *C.elegans*, no qual é demonstrado a ancoragem do mesmo no interior do poro e também o resíduo de lisina que interage com o Glu é extremamente importante para a interação.

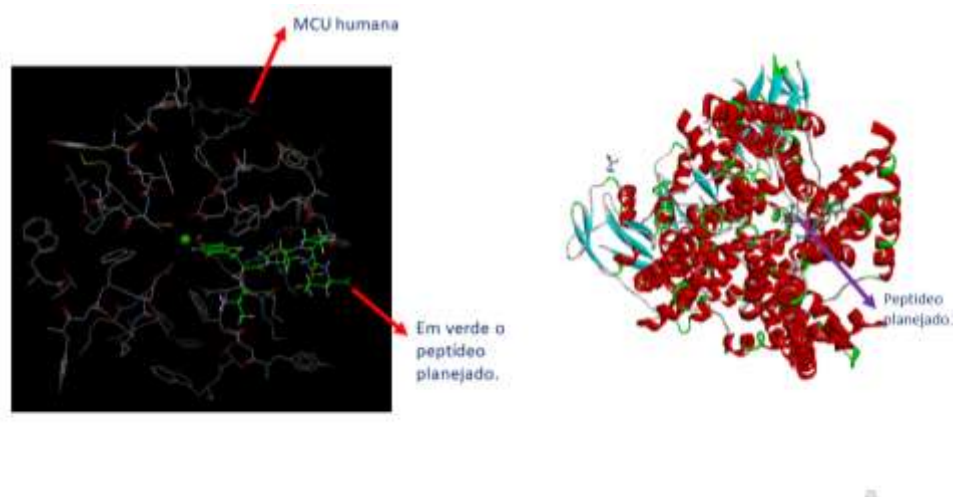
2-) Tyr-Cys-Cys-Leu-Val-p-schore:65.19



Todo o bloqueio do poro deve permitir que o cálcio não atravesse o poro podendo acarretar uma desestabilização na concentração de cálcio mitocondrial, podendo ocasionar um desequilíbrio energético, aumento na produção de EROS e despolarização da membrana mitocondrial do parasita, o que pode ocasionar a sua morte celular.

A fim de selecionar se os peptídeos são específicos para o alvo, ou seja, só interagiriam com a proteína MCU de *L. mexicana* foi realizado o docking dos peptídeos cíclicos e lineares planejados com proteína humana MCU (PDB:6058). Foi utilizado como sítio de interação para o docking a coordenada do um dos íons do filtro de seletividade desta proteína, a fim de identificar os peptídeos que não interagiam com o poro da proteína humana, sendo que a base para o planejamento dos peptídeos foi o bloqueio físico do poro da proteína MCU de *L. mexicana* (Figura 86).

Figura 85: Peptídeo linear Trp-Tyr-His-Pro ancorado na estrutura tridimensional da proteína MCU humana (pdb:6O58), no qual é demonstrado a não interação do mesmo com interior do poro e também a estrutura monomérica da proteína MCU humana.



Após o docking foram selecionados 12 peptídeos (cíclicos e lineares) (Tabelas 6 e 7) que não interagem com a região de poro da proteína MCU humana, sendo um indício importante da especificidade desses peptídeos em *In-silico*, contribuindo assim para que o planejamento experimental de comprove em *in-vitro*.

Tabela 6: Peptídeos lineares planejados para inibição do MCU selecionados a partir do docking molecular com a proteína MCU humana, dos quais foram selecionados os que não interagiram com a mesma.

Peptídeos Lineares que não interagem com MCU humana
Trp-Tyr-His-Pro
Phe-Lys-Ile-Val
Gly-Ser-Trp-Pro-Lys
Ala-Ser-Pro-Lys
Ala-Tyr-Pro-Lys-Lys
Gly-Ser-His-Pro-Lys

Tabela 7: Peptídeos cíclicos planejados para inibição do MCU selecionados a partir do docking molecular com a proteína MCU humana, dos quais foram selecionados os que não interagiram com a mesma.

Peptídeos Cíclicos que não interagem com MCU humana
Phe-Arg-Pro-Val
Trp-His-Leu-Val
Tyr-Cys-Cys-Leu-Val*

Phe-Ser-Tyr-Leu-Ile

Trp-Lys-Tyr-Phe

Phe-His-Tyr-Val

Posteriormente, para avaliar se os peptídeos planejados estão cumprindo este papel de bloqueio e interrupção do fluxo de Ca^{2+} , está em fase de desenvolvimento a construção de uma linhagem de *L. mexicana* geneticamente modificada e que alberga o indicador de Ca^{2+} GCaMP6 (DING; LUO; HU; WANG et al., 2014; SIDIK; HORTUA TRIANA; PAUL; EL BAKKOURI et al., 2016) fusionado a uma etiqueta de direcionamento mitocondrial. Para isso, a partir do plasmídeo recombinante pX63NEO-GCaMP 6, recentemente construído pela estudante de Iniciação Científica Eduarda de Carvalho Le Senechal Horta (18/26416-2.), o qual nos permite superexpressar o marcador genético de Ca^{2+} na *Leishmania* quando na presença de G418 (geneticina), foi fusionado à extremidade N-terminal do GCaMP6 uma sequência que codifica para a etiqueta de direcionamento mitocondrial MLRRLSTSCFLKRAQFRGFAATSPLL. Esta sequência foi obtida a partir da análise da proteína mitocondrial peroxiredoxina (JANG; LIM, 2018; TEIXEIRA; CASTRO; CRUZ; TSE et al., 2015) de *L. mexicana*, com auxílio do programa TP pred 2.0 (SAVOJARDO; MARTELLI; FARISELLI; CASADIO, 2014) (Dados não apresentados).

5. Conclusões

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

Os compostos bioconjugados com Anf B obtidos apresentaram atividade leishmanicida com baixa citotoxicidade, do qual destacamos o alto índice de seletividade desses compostos, mostrando que a estratégia da bioconjugação foi

eficaz em combater um dos grandes problemas do tratamento leishmaniose com AnfB que é a falta de seletividade.

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

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

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

6. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol Today**, v. 15, n. 11, p. 443-448, Nov 1999.

DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E.; MORENO, S. N. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 310, Pt 3, p. 1005-1012, Sep 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KELLICI, T. F.; CHATZIATHANASIADOU, M. V.; LEE, M. S.; SAYYAD, N. et al. Rational design and structure-activity relationship studies of quercetin-amino acid

hybrids targeting the anti-apoptotic protein Bcl-xL. **Org Biomol Chem**, v. 15, n. 37, p. 7956-7976, Sep 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LU, H.; ZHONG, L.; CHANG, K.; DOCAMPO, R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in Leishmania mexicana amazonensis amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9464-9473, Apr 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VICENTE, E. F.; NOBRE-PAVINATTO, T. M.; PAVINATTO, F. J.; DE OLIVEIRA JUNIOR, O. N. et al. N-terminal microdomain peptide from human dihydroorotate

dehydrogenase: structure and model membrane interactions. **Protein Pept Lett**, v. 22, n. 2, p. 119-129, 2015.

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

VELÁSQUEZ, A. M. A.; RIBEIRO, W. C.; VENN, V.; CASTELLI, S. et al. Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with *Leishmania amazonensis* and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 8, Aug. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

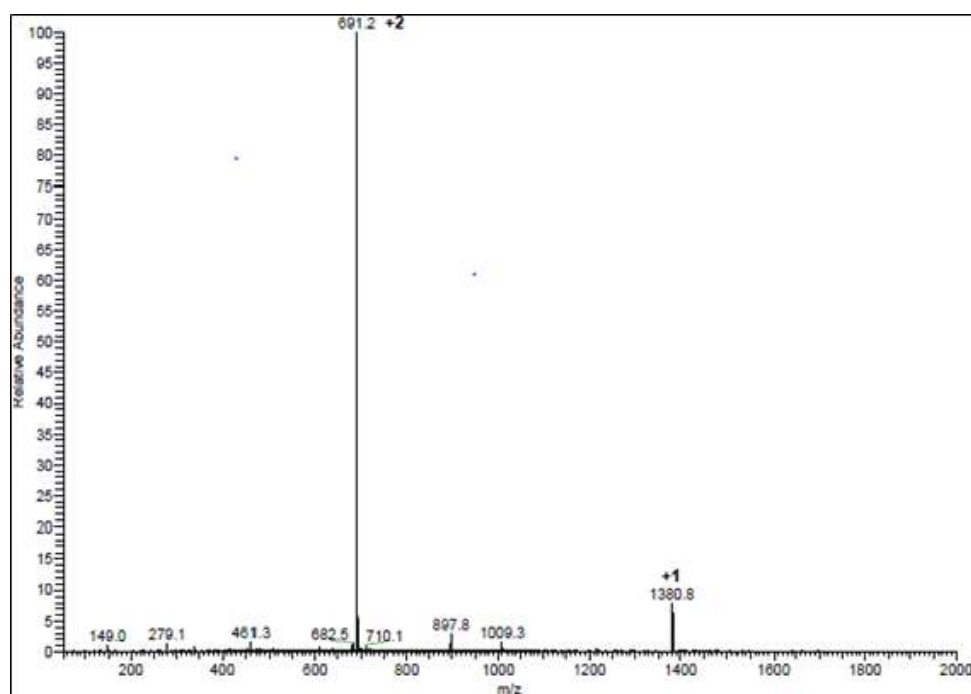
ZHANG, Q. Y.; YAN, Z. B.; MENG, Y. M.; HONG, X. Y. et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Mil Med Res**, v. 8, n. 1, p. 48, Sep. 2021.

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

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

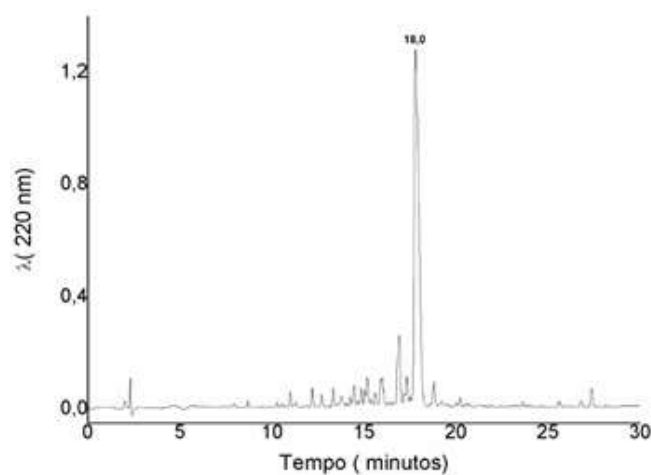
7. Anexos

Anexo 1- Espectro de massas referente ao peptídeo TSHa com massa molar de $1380,8 \text{ g mol}^{-1}$.

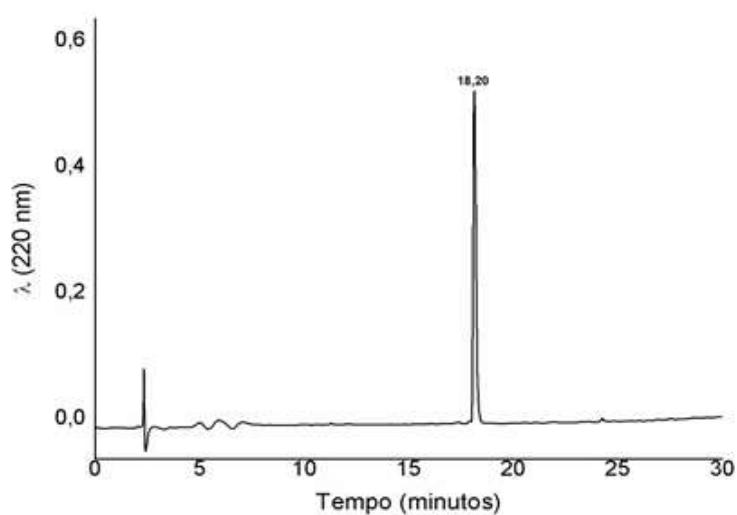


Anexo 2: Perfil cromatográfico do peptídeo TSHa. Em (a) perfil bruto do peptídeo com tempo de retenção de 18 minutos, (b) perfil cromatográfico do peptídeo TSHa puro, com pureza de 99%.

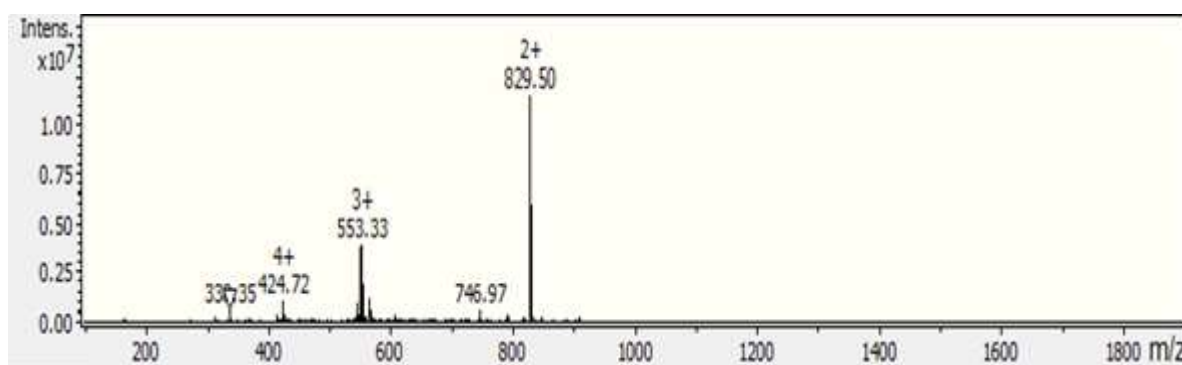
a)



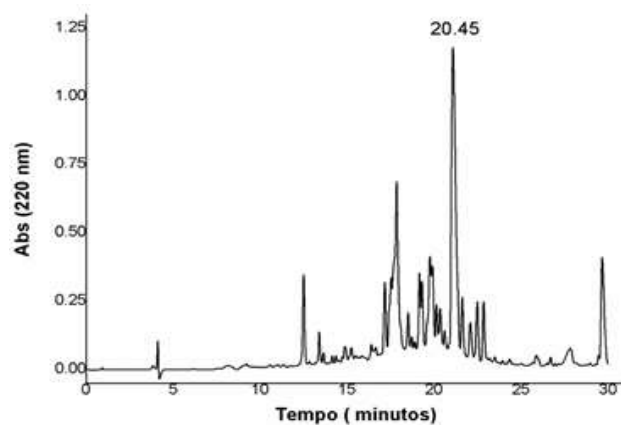
b)



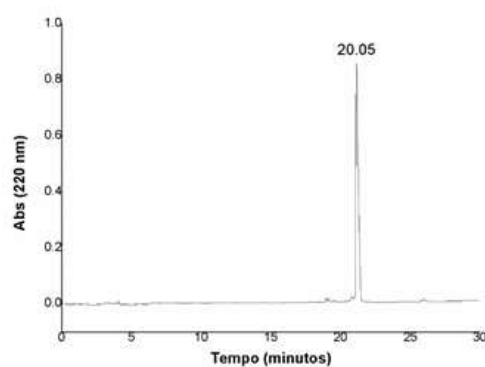
Anexo 3: Espectro de massas do peptídeo TSHd, de massa molar 1657 g mol^{-1} com os íons $+2$ -829.50 e o íon $+3$ -553.33 representados.



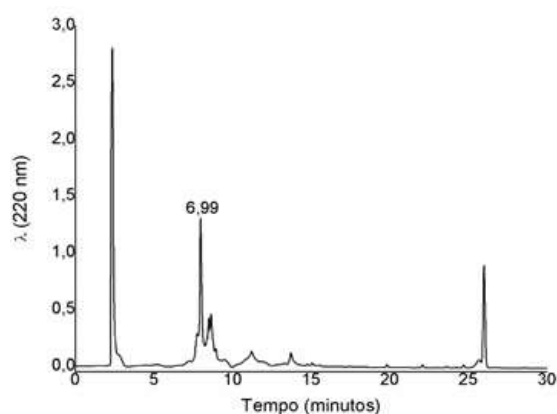
Anexo 4: Perfil do peptídeo bruto TSHd com tempo de retenção de 20,45 minutos.



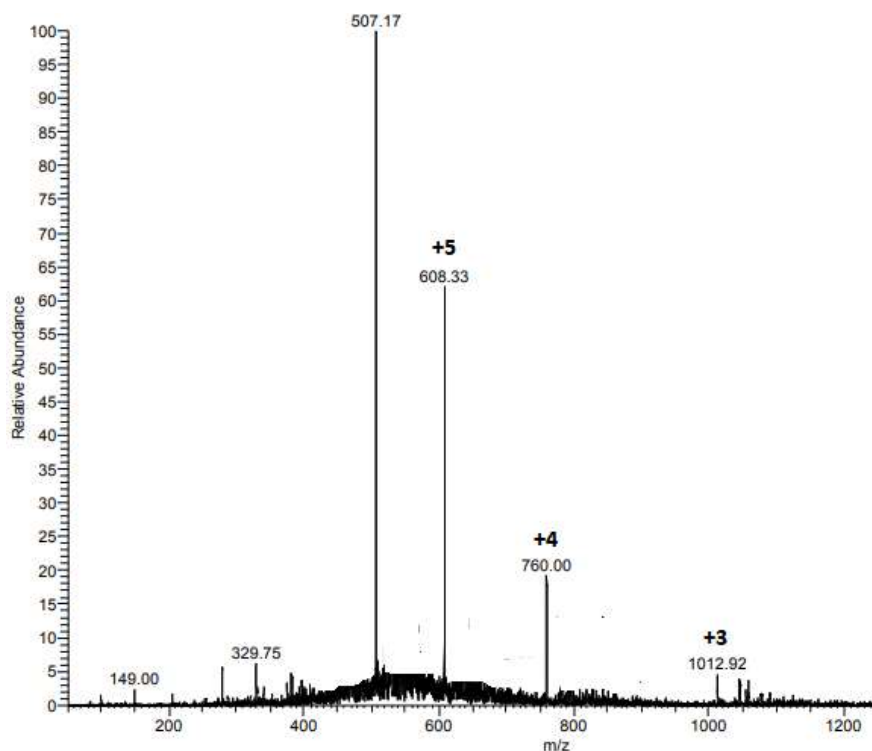
Anexo 5: Perfil do peptídeo puro TSHd com tempo de retenção de 20,05 minutos.



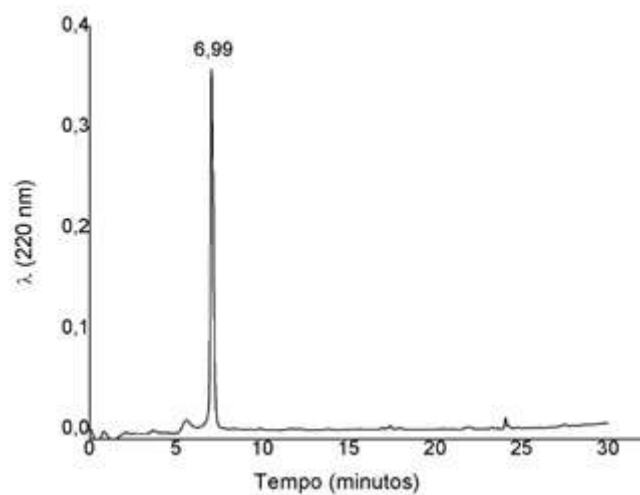
Anexo 6: Perfil cromatográfico em HPLC modo analítico do peptídeo bruto Hist 5 com método de detecção em 220 nm e método de corrida 5-95% solvente B em 30 minutos. O peptídeo apresenta um tempo de retenção de 6,99 minutos.



Anexo 7: Espectro de massas referente ao peptídeo Hist 5, com massa molar de 3036,29 g mol⁻¹, com ionização positiva dos quais estão representados os picos +3-1012,92, +4-760, +5-608,33.

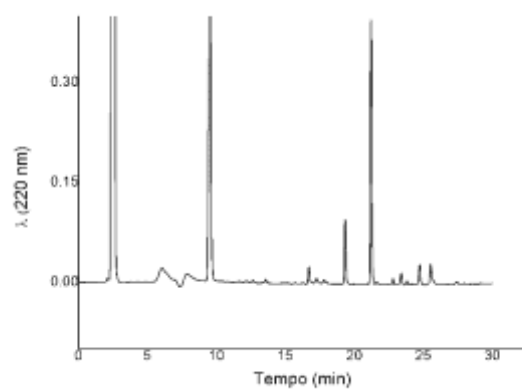


Anexo 8: Perfil do peptídeo puro Hist 5 com tempo de retenção de 6,99 minutos.

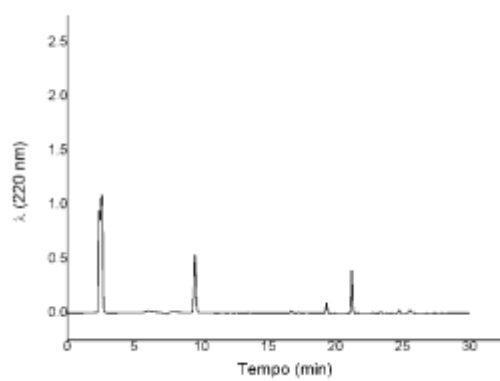


Anexo 9: Perfil cromatográfico da Anf B após ensaio de estabilidade com solução de Ácido Trifluoacético, TIS, Água ultrapura (solução I) em a 0 horas e 2 horas de incubação (a) e ODT e a segunda solução com TFA, TIS, Água ultrapura (solução II) e em c e d 0 e 2 horas de incubação.

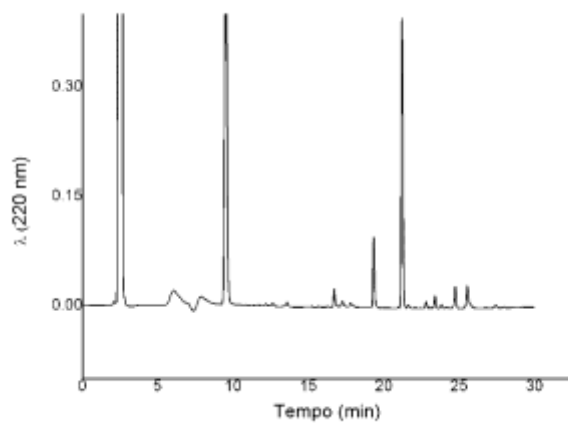
a)



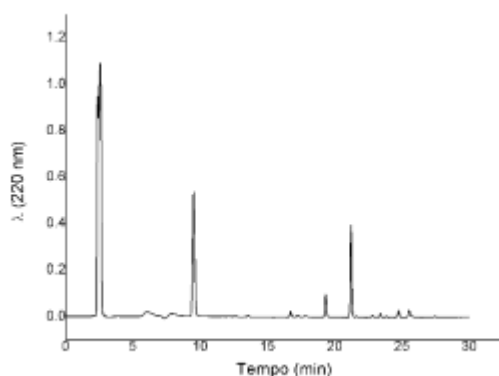
b)



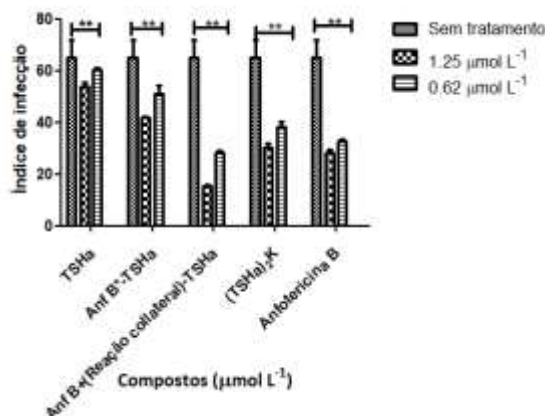
c)



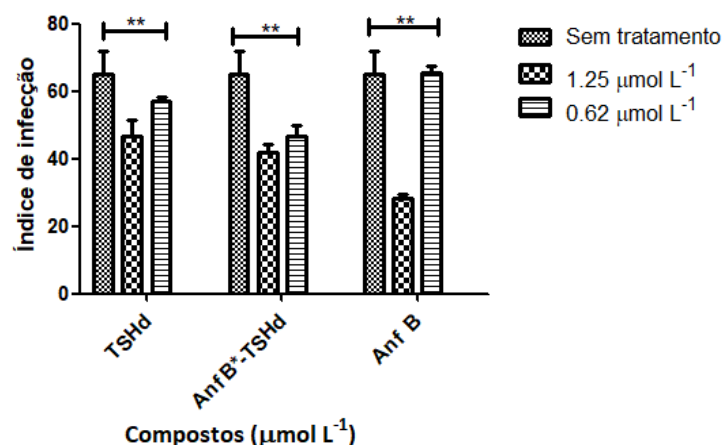
d)



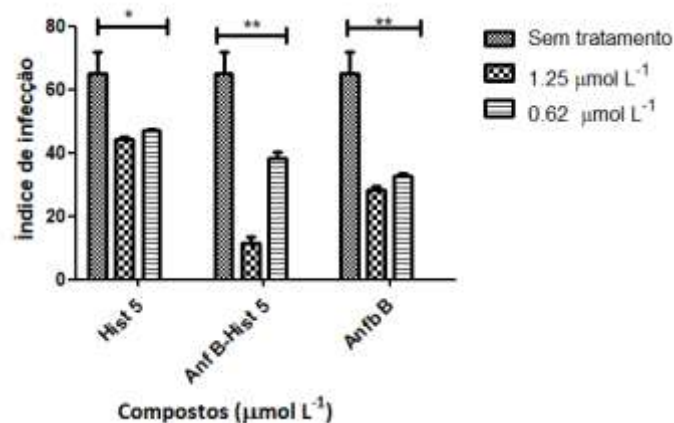
Anexo 9: Efeito *in vitro* Anf B (Reação colateral)-TSHa X Anf B*-TSHa X TSHaX (TSHa)₂K X Anf B amastigotas intracelulares de *L. mexicana*. O índice de infecção foi calculado após 48 h de tratamento com os IC₅₀ de cada composto. O controle negativo são amastigotas intracelulares de *L. mexicana* não tratadas com os peptídeos e Anf B, as concentrações representadas são 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados são expressos como médias mais os desvios padrão (DP) para 3 experimentos independentes ($P < 0,05$). do qual há diferenças estatísticas entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas (**).



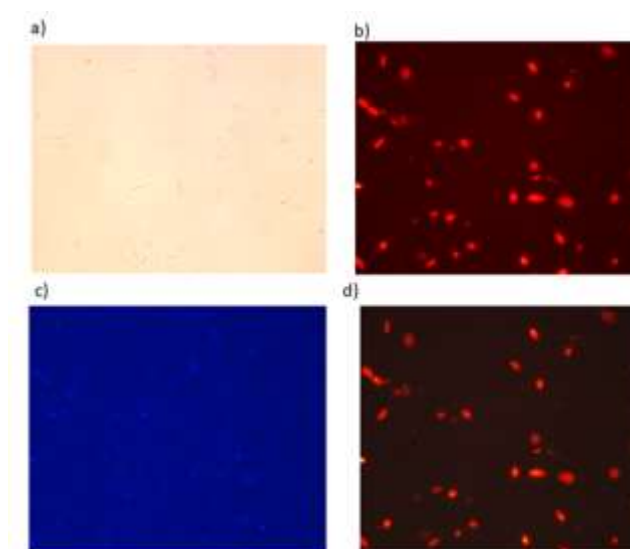
Anexo 10: Efeito *in vitro* Anf B* -TSHd X TSHd X Anf B amastigotas intracelulares de *L. mexicana*. O índice de infecção foi calculado após 48 h de tratamento com os IC₅₀ de cada composto. O controle negativo são amastigotas intracelulares de *L. mexicana* não tratadas com os peptídeos e Anf B, as concentrações representadas são 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados são expressos como médias mais os desvios padrão (DP) para 3 experimentos independentes ($P < 0,05$). do qual há diferenças estatísticas entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas (**).



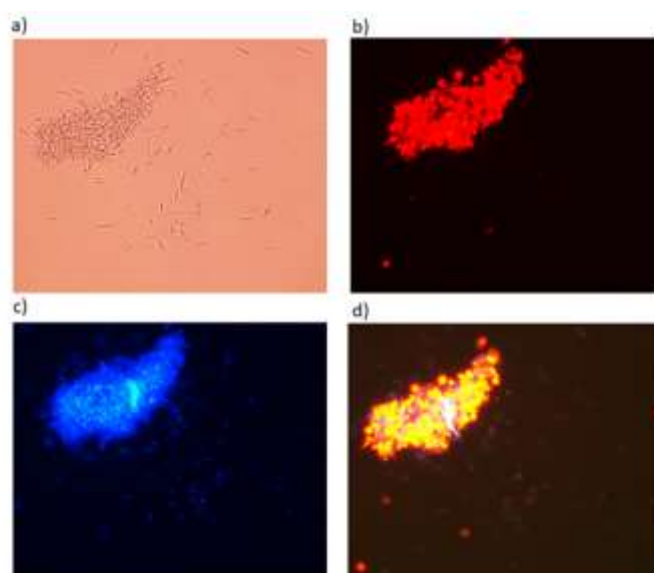
Anexo 11: Efeito *in vitro* Anf B -Hist 5 X Hist 5 X Anf B amastigotas intracelulares de *L. mexicana*. O índice de infecção foi calculado após 48 h de tratamento com os IC₅₀ de cada composto. O controle negativo são amastigotas intracelulares de *L. mexicana* não tratadas com os peptídeos e Anf B, as concentrações representadas são 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os dados são expressos como médias mais os desvios padrão (DP) para 3 experimentos independentes ($P < 0,05$). do qual há diferenças estatísticas entre os compostos testados (*) e também entre as concentrações testadas (**).



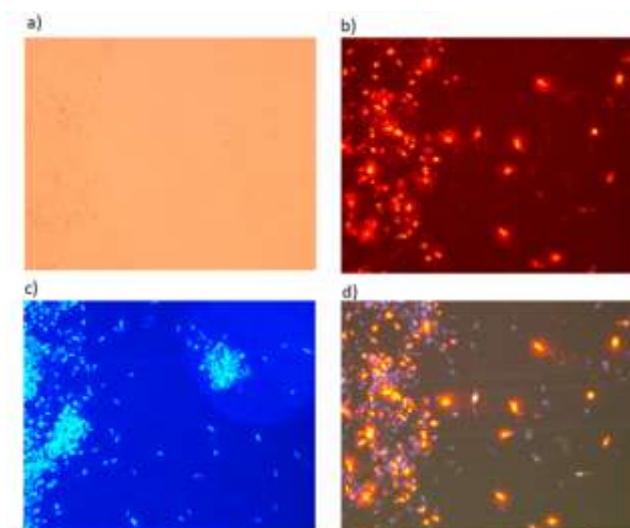
Anexo 12 - Ensaios de microscopia de fluorescência com promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.



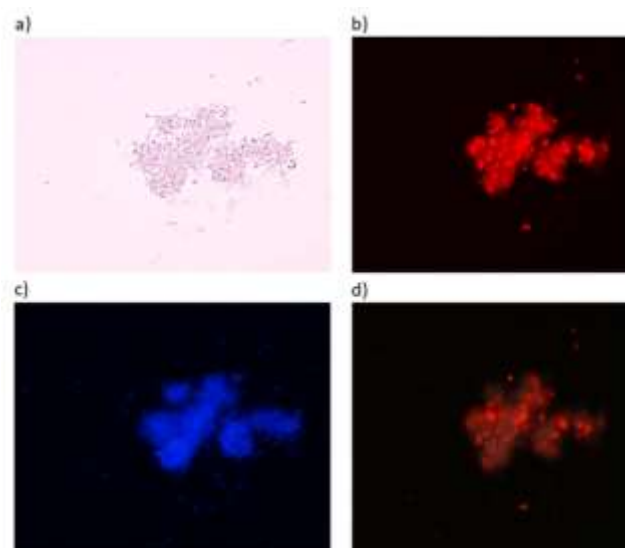
Anexo 13 - Ensaios de microscopia de fluorescência promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B (RC)-TSHa por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.



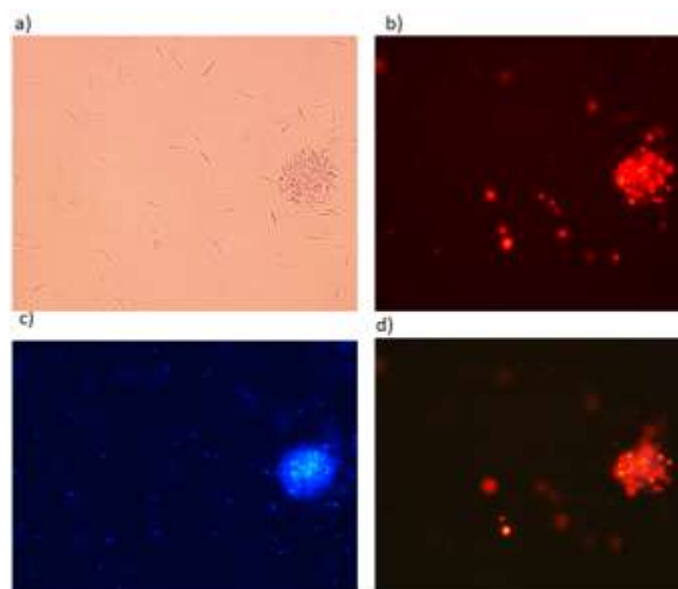
Anexo 14 - Ensaios de microscopia de fluorescência promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo $(\text{TSHa})_2\text{K}$ por 24 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.



Anexo 15 - Ensaios de microscopia de fluorescência promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf b*-TSHd 2 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.

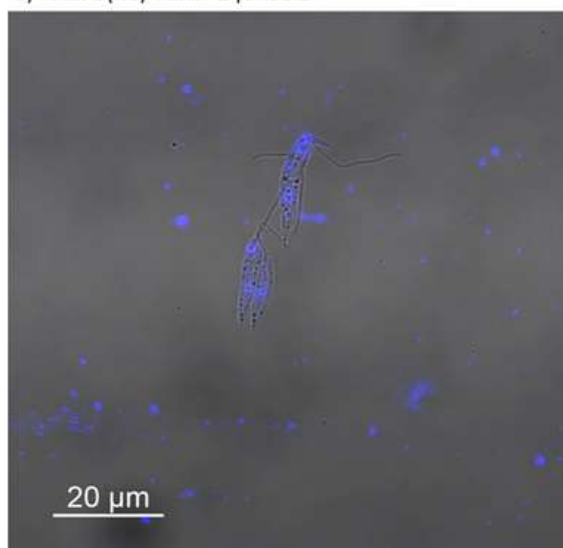


Anexo 16 - Ensaios de microscopia de fluorescência promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo Anf B-Hist 5 2 horas. Em a) Células sem marcação; b) *L. mexicana* marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 5 minutos; c) *L. mexicana* marcado $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst por 5 minutos; d) Merge das duas marcações.

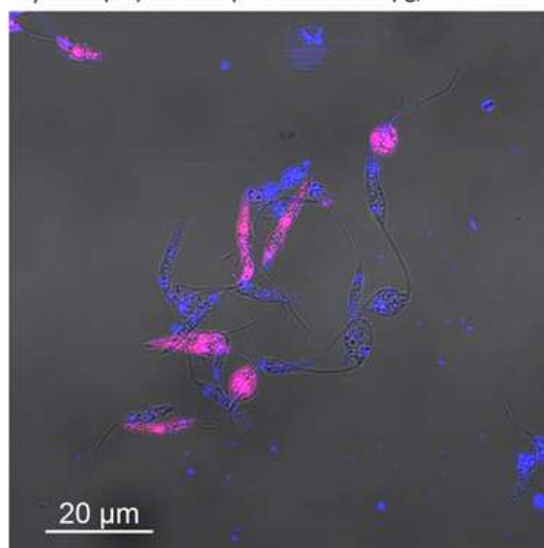


Anexo 17: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com Anf B (RC)-TSHa na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal. Em a) *L. mexicana* tratada com Anf B (RC)-TSHa $1 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) *L. mexicana* tratada Anf B (RC)-TSHa $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 15 minutos; c) *L. mexicana* tratada com Anf B (RC)-TSHa $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado 200 nmol L^{-1} de Mitotracker red por 20 minutos; d) *L. mexicana* tratado com Anf B (RC)-TSHa $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado 50 nmol L^{-1} de Lysotracker red por 20 minutos.

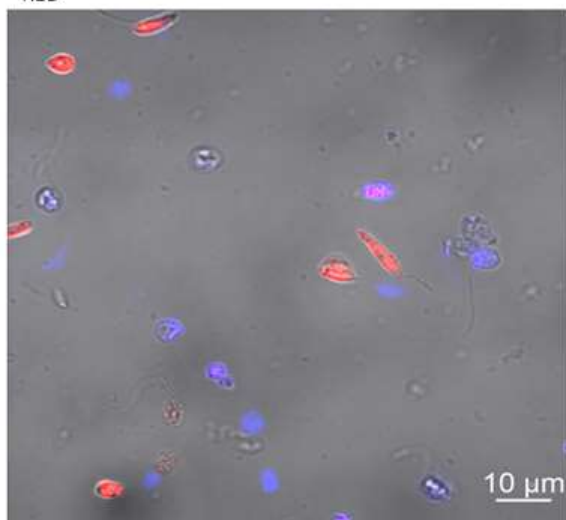
a) Anf B(RC)-TSHa $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$



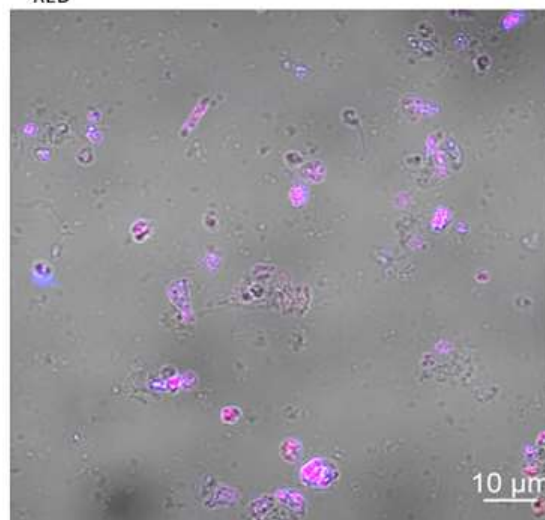
b) Anf B(RC)-TSHa $-1 \mu\text{mol L}^{-1} + 40 \mu\text{g/mL PI}$



c) Anf B(RC)-TSHa $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 200 nmol L^{-1} Mitotracker RED

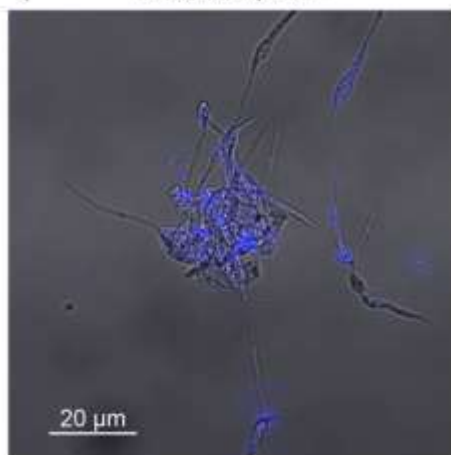


d) Anf B(RC)-TSHa $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 50 nmol L^{-1} LysoTracker RED

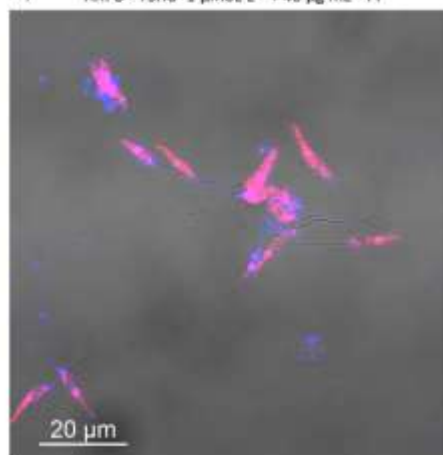


Anexo 18: Promastigotas de *L. mexicana* na concentração 1×10^7 células/mL tratadas com Anf B*-TSHd na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 5 horas de incubação em microscopia confocal. Em a) *L. mexicana* tratada com Anf B*-TSHd $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) *L. mexicana* tratada Anf B*-TSHd $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcada com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iodeto de propídio por 15 minutos; c) *L. mexicana* tratada com Anf B*-TSHd $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado 200 nmol L^{-1} de Mitotracker red por 20 minutos; d) *L. mexicana* tratado com Anf B*-TSHd $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e marcado 50 nmol L^{-1} de LysoTracker red por 20 minutos.

a) Anf B*-TSHd $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$



b) Anf B*-TSHd $-1 \mu\text{mol L}^{-1}$ + $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI



c) Anf B*-TSHd- $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 200 nmol L^{-1} Mitotracker RED d) Anf B*-TSHd- $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ + 50 nmol L^{-1} LysoTracker RED

