

RESSALVA

**Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo deste
documento será
disponibilizado somente a
partir de 04/09/2027.**

SARAH TOLENTINO ROCHA BRANDÃO

**Estudo e identificação de compostos ativos contra as
leishmanioses cutânea e visceral: da descoberta ao estudo pré-
clínico**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química - Araraquara.

Supervisor: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) - 3348/2022

Araraquara

2025

Resumo

Leishmanioses correspondem a um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), nos últimos 20 anos, foram notificados 1.067.759 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM). As doenças parasitárias representam grande problema de saúde pública, principalmente considerando o número crescente de pacientes imunocomprometidos e aqueles vivendo em situação de pobreza. No entanto, há poucas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento destas doenças, sendo as existentes pouco eficazes e com efeitos colaterais. Desta forma, a busca por novas alternativas terapêuticas é muito importante. O objetivo deste trabalho é a síntese de bioconjugados peptídicos contendo moléculas PEP01-NH₂ e compostos guanidínicos (GVL4 e GVL25) visando o aumento da atividade antiparasitária destas moléculas. O peptídeo HIV-TAT, descrito na literatura como bom carreador em membranas celulares foi utilizado visando aumentar a concentração intracelular desses compostos e sua atividade anti-*leishmania*. Neste relatório será apresentada a síntese, caracterização e purificação dos bioconjugados GVL25 (Boc)-TAT e GVL4-TAT, e purificação do composto PEP01-NH₂. Também foram avaliadas as atividades anti-*leishmania* dos bioconjugados sendo que o GVL4-TAT apresentou melhores índices de IC₅₀ tanto para a *L. infantum* quanto para *L. amazonensis*. Os ensaios de índice de infecção e de inibição de CPB indicaram que a bioconjugação foi essencial na atividade contra leishmanicida, sugerindo que o alvo dessas moléculas é intracelular.

Palavras-chave: Leishmaniose; Peptídeos; Peptídeos Síntese; Bioconjugados

1. Introdução

As leishmanioses representam um problema global, concentrando-se em 98 países, principalmente aqueles do Sudeste Asiático, África Oriental, América Latina e Mediterrâneo (Mann; Frasca; Scherrer; Henao-Martínez *et al.*, 2021). Elas afetam de 12 a 15 milhões de pessoas e colocam sob risco mais de 350 milhões (Torres-Guerrero; Quintanilla-Cedillo; Ruiz-Esmenjaud; Arenas, 2017). Na sua forma visceral da doença, é responsável por mortes de cerca de 70.000 pessoas/ano. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2022 mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que ocorram anualmente 90.000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea (LC), dos quais apenas 20.000 são registrados pela OMS. A terceira forma da doença a leishmaniose mucocutânea (LM) tem maior incidência e cerca de 90% dos casos ocorrem na região da América do Sul.

Os agentes etiológicos dessas doenças correspondem aos tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada do inseto flebotomíneo, incluindo o gênero *Lutzomyia* (no continente americano) e *Phlebotomus* (na Europa, África e Ásia). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea transmite as formas promastigotas ao hospedeiro mamífero, as quais são fagocitadas pelos macrófagos, seguido por posterior desenvolvimento a amastigotas, que se multiplicam por divisão binária até o rompimento das células infectadas e nova infecção de macrófagos (Dawit; Girma; Simenew, 2013).

O tratamento atual para as leishmanioses requer a administração parenteral de fármacos pouco eficazes e que causam efeitos colaterais (Freitas-Junior; Chatelain; Kim; Siqueira-Neto, 2012; Brindha; Balamuri, Chanda, 2021). Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, o antimoniato de metilglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), porém apresentam baixa eficácia em algumas regiões endêmicas devido ao desenvolvimento de cepas de *Leishmania* resistentes (Chakravarty; Sundar, 2019; Dawit; Girma; Simenew, 2013; Leprohon; Fernandez-Prada; Gazanion; Monte-Neto *et al.*, 2015; Torres-Guerrero; Quintanilla-Cedillo; Ruizesmenjaud; Arenas, 2017). Além disso, essas moléculas apresentam baixa absorção pelo trato digestivo, o que causa efeitos colaterais.

A anfotericina B é utilizada como fármaco de segunda escolha, mas também apresenta toxicidade. Alternativamente, formulações lipídicas contendo a anfotericina B, como o Ambisome®, Amphocil™ e Abelcit® são mais eficazes e menos tóxicas (Brindha; Balamuri, Chanda, 2021). No entanto, apresentam alto custo e necessidade de armazenamento especial, o que dificulta sua utilização em localidades distantes e de clima quente.

Os peptídeos vêm se tornando nas últimas décadas candidatos para aplicações na área médica (Greco *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022), na aquicultura, na agricultura e na indústria alimentícia, entre outras (Seyfi *et al.*, 2020). O uso de peptídeos pode ajudar a contornar problemas como a lipofilicidade da biomembrana celular que dificulta o processo de penetração de fármacos que agem no interior da célula, assim muitas drogas não conseguem atingir o seu alvo. O uso de peptídeos de penetração celular (PPCs) mostra potencial para contornar esse problema, pois agem como a utilização de nanocarreadores (Gui *et al.*, 2020).

Os PPCs são uma família de peptídeos capazes de atravessar a membrana biológica (Neundorf, 2019). Comparados com outras técnicas, os PPCs adentram as células de forma não invasiva e sem destruir a integridade das membranas, sendo considerados seguros e eficientes (Ruseska; Zimmer, 2020). A eficiência dos PPCs varia de acordo com sua estrutura, do tipo da célula alvo, da temperatura, da concentração e do tempo de exposição (Böhmová *et al.*, 2020). Os PPCs possuem uma sequência relativamente pequena, de 5 a 30 resíduos de aminoácidos, e sua conformação e estrutura química são altamente variáveis (Neundorf, 2019; Watkins *et al.*, 2019). A aplicação desses peptídeos envolve o carregamento para o interior da célula de diversos tipos de moléculas, como outros peptídeos, proteínas, DNA, RNA, lipossomas, nanopartículas ou pequenas drogas orgânicas (Neundorf, 2019).

O peptídeo catiônico HIV-TAT (47 a 57) de sequência YGRKKRRQRR é um peptídeo derivado da proteína de ligação e transativação do RNA (TAT) do vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV-1). Ele é capaz de mediar a entrada de muitas macromoléculas biológicas exógenas nas células através de sua membrana (Gui *et al.*, 2020).

A conjugação de peptídeos a outros compostos químicos é uma estratégia vantajosa tanto para superar limitações atribuídas a esses peptídeos como baixa solubilidade, quanto para aumentar a taxa de permeabilidade celular e melhorar a

seletividade e ação desses peptídeos, potencializando a ação farmacológica dessas moléculas. Além disso, esse tipo de estratégia tem sido utilizada para desenvolver moléculas que possam atuar como *drug delivery*, direcionando a entrega para o tecido doente e aumento a concentração do fármaco neste. (Dean, T., Jélu-Reyes, J., Allen, A'Lester C., Moore, T. W., 2024, He, R., Finan, B., Mayer, J., DiMarchi, R. D., 2019).

Essa estratégia pode ser aplicada no desenvolvimento de tratamento contra vírus, como inibidores do vírus da imunodeficiência humana, no tratamento de câncer, no tratamento de doenças neurodegenerativas, anti-inflamatórios. Como anti-bacterianos, tanto contra bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Ferroceno, polietilenoglicol (PEG), lipídeos, ácidos graxos, açúcares e proteínas (Costa *et al.*, 2023, He, R., Finan, B., Mayer, J., DiMarchi, R. D., 2019).

Compostos guanidínicos são compostos orgânicos ricos em nitrogênio e solúveis em solventes polares encontrados na natureza em plantas e animais. Atualmente, os derivados de guanidina vêm sendo associados a diversas aplicabilidades na área farmacêutica com potencial por apresentarem atividades antimicrobianas, antifúngicas, anticâncer e antiparasitárias (antimalária e anti-*Leishmania*). Por isso a bioconjugação com peptídeos tem sido estudada para diversos tipos de aplicações (Costa *et al.*, 2023).

O potencial de peptídeos PPC conjugados com derivados da guanidina com atividade anti-*Leishmania* já foi verificado pelo grupo de pesquisa LASEBio (Laboratório de Síntese de Biomoléculas) comandado pelo professor Dr. Eduardo Maffud em conjunto com laboratório da professora Dra. Marcia Graminha. O estudo verificou o potencial de três bioconjugados (GVL1-TSHa, GVL1-p-Bt, (GVL1)₂-p-Bt), todos os conjugados testados obtidos demonstraram atividade leishmanicida maior que em comparação com os peptídeos ou guanidinas isoladamente.

Dentro dessa perspectiva e visando encontrar e desenvolver novas moléculas que possuam potencial anti-leishmanicida o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (LAPDESF) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Unesp Campus Araraquara - SP sob o comando do professor Dr. Jean Leandro dos Santos tem desenhado, sintetizado e caracterizado moléculas promissoras no tratamento de leishmanioses. A molécula PEP01-NH₂ foi recentemente desenvolvida e resultados preliminares (dados não publicados) mostram potencial anti- *Leishmania*. Dessa maneira, essa molécula será ligada a

Referências

BÖHMOVÁ, E., MACHOVÁ, D., PECHAR, M., POLA, R., VENCLÍKOVÁ, K., JANOUŠKOVÁ, O., ETRYCH, T. Cell-Penetrating Peptides: a Useful Tool for the Delivery of Various Cargoes Into Cells. **Physiological research**, v. 67, p. S267-S279, 2018.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA K. Na Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases – Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Front. Chem.**, n 9:622286, 2021.

CASTRO, V.; RODRÍGUEZ, H.; ALBERICIO, F. CuAAC: An efficient click chemistry reaction on solid phase. **ACS combinatorial science**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2016.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, 20, n. 10, p. 1251-1265, 07 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.

COSTA, N., ANJOS, L. R., SOUZA, J. V. M., BRASIL, M. C. O. A., MOREIRA, V. P., GRAMINHA, M. A. S., LUBEC, G., GONZALEZ, E. R. P., CILLI, E. M. Development of New Leishmanicidal Compounds via Bioconjugation of Antimicrobial Peptides and Antileishmanial Guanidines. **ACS omega**, v. 8, n. 37, p. 34008-34016, 2023.

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

DEAN, T., JÉLU-REYES, J., ALLEN, A'LESTER C., MOORE, T. W., Peptide–Drug Conjugates: An Emerging Direction for the Next Generation of Peptide Therapeutics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 1641-1661, 2024.

DESALE, K.; KUCHE, K.; JAIN, S. Cell-penetrating peptides (CPPs): an overview of applications for improving the potential of nanotherapeutics. **Biomaterials Science**, 2021.

DE SOUZA, JOAO VICTOR MARCELINO; COSTA, NATALIA C. S.; BRASIL, MARIA C. O. ARRUDA; DOS ANJOS, LUANA RIBEIRO; DE MENEZES, RENATA PRISCILA BARROS; ZAMPIERI, EDUARDO HENRIQUE; DE LIMA, JHONATAN SANTOS; VELASQUEZ, ANGELA MARIA ARENAS; SCOTTI, LUCIANA; SCOTTI, MARCUS TULLIUS; *et al.* Guanidines Conjugated with Cell-Penetrating Peptides: A New Approach for the Development of Antileishmanial Molecules. **Molecules**, v. 30, n. 2, p. 17, 2025

DIRO E.; RITMEIJER K.; BOELAERT M.; *et al.* Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients: the

- first twelve months of a prospective cohort study. **PLoS Negl Trop Dis**, 9:e0004087, 2015. Espírito Santo,
- FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, 2, p. 11-19, 2012.
- GRECO, I.; MALCHANOVA, N.; HOLMEDAL, E.; JENSSEN, H.; HUMMEL, B. D.; WATTS, J. L.; HÅKANSSON, J.; HANSEN, P. R.; SVENSON, J. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- GUI, L.; ZHANG, X. H.; QIAO, Z. Y.; WANG, H. Cell-Penetrating Peptides and Polymers for Improved Drug Delivery. **ChemNanoMat**, v. 6, n. 8, p. 1138-1148, 2020.
- GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 4, p. 406-424, 2017.
- HE, R., FINAN, B., MAYER, J., DIMARCHI, R. D. Peptide conjugates with small molecules designed to enhance efficacy and safety. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1855, 2019.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry**, 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- 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- 10, 2012.
- 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, 2014.
- 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**, 26, n. 2, p. 98-107, 2019.
- MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Curr Trop Med Rep**, 17, 1-12, 2021.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963/07/01 1963.
- MISHRA, A. K.; CHOI, J.; MOON, E.; BAEK, K. H. Tryptophan-rich and proline-Rich antimicrobial peptides. **Molecules**, 2018, 23.4: 815

NEUNDORF, I. Antimicrobial and Cell-Penetrating Peptides: How to Understand Two Distinct Functions Despite Similar Physicochemical Properties. In: **Antimicrobial Peptides**. Springer, Singapore, 2019. p. 93-109.

RUSESKA, I.; ZIMMER, A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 11, n. 1, p. 101-123, 2020.

SANTOS-FILHO, N. A.; FERNANDES, R. S.; SGARDIOLI, B. F.; RAMOS, M. A. S.; PICCOLI, J. P.; CAMARGO, I. L. B. C.; BAUAB, T. M.; CILLI, E. M. Antibacterial Activity of the Non-Cytotoxic Peptide (p-BthTX-I) 2 and Its Serum Degradation Product against Multidrug-Resistant Bacteria. **Molecules**, 22.11: 1898, 2017.

SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; RAMOS, M. A. S.; DOS SANTOS, C. T.; PICCOLI, J. P.; BAUAB, T. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the Cterminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon (Oxford)**, p.160 - 168, 2015.

SANTOS-FILHO, N. A.; MARISE DE FREITAS, L.; DOS SANTOS, C. T.; PICCOLI, J. P.; FONTANA, C. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I) derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Toxicon**, v.196, p.44 - 55, 2021.

SANTOS-FILHO, N. A.; RIGHETTO, G. M.; PEREIRA, M. R.; PICCOLI, J. P.; ALMEIDA, L. M. T.; LEAL, T. C.; CAMARGO, I. L. B. C.; CILLI, E. M. Effect of C-terminal and N-terminal dimerization and alanine scanning on antibacterial activity of the analogs of the peptide p-BthTX. **Peptide Science**, v.2021, p.1 - , 2021.

SEYFI, R.; KAHAKI, F. A.; EBRAHIMI, T.; MONTAZERHEB, S.; EYVAZI, S.; BABAEIPOUR, V.; TARHRIZ, V. Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451-1463, 2020.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, 6, p. 750, 2017.

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**, 61, n. 8, 2017

VERWILST, P., ELISEEVA, S. V., CARRON, S., ELST, L., BURTEA, C., DEHAEN, G., LAURENT, S., BINNEMANS, K., MULLER, R. N., PARAC-VOGT, T. N., De BORGGRAEVE, W. M. A Modular Approach towards the Synthesis of Target-Specific MRI Contrast Agents. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2011, n. 24, p. 3577-3585, 2011

WANG, L.; WANG, N.; ZHANG, W.; ET AL. Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Sig Transduct Target Ther.**, 7, 48, 2022.

