

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA**

JULIANE BUZZON MENEGHESSO VERGA

Uso da técnica *phage display* para identificação e avaliação de peptídeos capazes de reduzir a taxa de infecção em macrófagos

Araraquara
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

JULIANE BUZZON MENEGHESSO VERGA

Uso da técnica *phage display* para identificação e avaliação de peptídeos capazes de reduzir a taxa de infecção em macrófagos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, como um dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia A. S. Graminha
Coorientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Araraquara
2023

V493u Verga, Juliane Buzzon Meneghesso.
Uso da técnica *phage display* para identificação e avaliação de peptídeos capazes de reduzir a taxa de infecção em macrófagos / Juliane Buzzon Meneghesso Verga. – Araraquara, 2023.
128 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: Mara Cristina Pinto.

1. *Leishmania*. 2. *Phage display*. 3. Peptídeo. I. Graminha, Márcia Aparecida da Silva, orient. II. Pinto, Mara Cristina, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Uso da técnica *phage display* para identificação e avaliação de peptídeos capazes de reduzir a taxa de infecção em macrófagos

AUTORA: JULIANE BUZZON MENEGHESSO VERGA

ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

COORIENTADORA: MARA CRISTINA PINTO

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

Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP-
Araraquara

Prof. Dr. Marcelo Santos da Silva (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica/ Instituto de Química, USP - São Paulo

Profa. Dra. Manuela da Silva Solcà (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, UFBA - Bahia

Dra. Aline Rimoldi Ribeiro (Participação Virtual)
Institut Européen de Chimie et Biologie/ Université de Bordeaux, Bordeaux - França

Araraquara, 17 de novembro de 2023

Dedico essa Tese ao meu marido, por sempre me apoiar e ser meu companheiro de vida.

AGRADECIMENTO

Agradeço profundamente a Deus por guiar meus passos e por abençoar minha jornada.

Ao meu amado marido, cujo apoio incondicional e incentivo constante durante esses 16 anos de convivência foram a luz que guiou meu caminho. Sou muito grata por compartilhar cada passo dessa jornada ao seu lado. Agradeço também ao meu querido cachorrinho Frodo, por sua constante alegria e apoio, por trazer leveza à nossas vidas, mesmo em momentos desafiadores.

Aos meus pais, Flor e Val, expresso meu profundo agradecimento. Vocês foram meu refúgio seguro durante toda essa trajetória desafiadora. A cada obstáculo, vocês me incentivaram a seguir em frente e acreditaram no meu potencial. À minha irmã, obrigada por ser minha amiga e por apoiar minhas escolhas e por estar sempre presente em momentos de dificuldade. Agradeço muito também à minha amada avó, Dona Joana (*in memoriam*), cuja origem humilde e a ausência de educação formal nunca a impediram de nos inspirar com sua incrível determinação. Sua partida foi um lembrete poderoso da brevidade da vida e da importância de valorizarmos nossa família.

Sou imensamente grata à minha orientadora Profa. Márcia Graminha, por todo o apoio, orientação e estímulo que me proporcionou ao longo desta jornada acadêmica. Seu comprometimento em me auxiliar a alcançar o melhor de mim mesma foi verdadeiramente inspirador. Que nossa conexão e amizade perdurem além desta jornada acadêmica, e que possamos compartilhar muitos outros momentos de sucesso e realizações.

Sou muito grata ao professor Marcelo Jacobs Lorena e ao Sung-Jae Cha pela dedicação em fazer com que minha pesquisa fosse bem-sucedida, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, pois sei que sem vocês, muitos obstáculos seriam mais difíceis de transpor.

Aos colegas e amigos do laboratório pelo apoio e amizade. Vocês tornaram meus dias mais fáceis e agradáveis. Aos queridos companheiros: Leandro, Angela, Wilquer, Natália, Eduarda, Michele, Gabriel, Maysa, Ana Clara, Helena, Jhonatan, Túlio, Ana Laura.

Aos professores membros da banca examinadora da defesa do doutorado, Dr. Marcelo Santos da Silva, Dra. Manuela da Silva Solcà, e Dra. Aline Rimoldi Ribeiro, por terem contribuído para o aprimoramento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro concedidos para realização do projeto no país (processo nº 20/04415-4, Auxílio à Pesquisa - Regular).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo nº 88887.501342/2020-00.

Agradeço à Fulbright pelo apoio financeiro concedido para realização do projeto no exterior, permitindo a realização do intercâmbio de doutorado na *Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health*.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP em Araraquara, pelo apoio institucional de infraestrutura.

Muito obrigada!

**“A persistência é o caminho do
êxito” Charles Chaplin.**

Resumo

Diante da alta incidência e gravidade das leishmanioses, especialmente a leishmaniose visceral (LV), e reconhecendo as limitações dos métodos convencionais de controle e tratamento, nosso projeto de pesquisa buscou contribuir para o combate e prevenção dessas doenças. Tivemos como principal objetivo deste projeto a identificação de peptídeos capazes de reduzir a taxa de infecção de células THP-1 diferenciadas a macrófagos pelas espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania infantum*. A identificação de tais peptídeos se deu via aplicação da técnica de *phage display* como um meio para selecionar fagos recombinantes que expressassem peptídeos com alta afinidade à superfície das diferentes espécies de *Leishmania*. O processo de seleção de sequências peptídicas de interesse se deu com base em três critérios i) análise da frequência de sequências identificadas por meio de sequenciamento, ii) análise qualitativa da interação fago-*Leishmania* via ensaios de fluorescência, e iii) ensaios de inibição da taxa de infecção em macrófagos utilizando fagos recombinantes. O fago selecionado a partir de ensaios de *phage display* frente à *L. infantum*, A9, reduziu a taxa de infecção de macrófagos em 51.5% e 53.6% para *L. infantum* e *L. amazonensis*, respectivamente. Já o fago, H1, selecionado via interação com *L. amazonensis*, apresentou reduções significativas da taxa de infecção, 47%, apenas da própria espécie. Partindo da sequência peptídica expressa por tais fagos, foram sintetizados os peptídeos La1 e Li1, derivados dos fagos H1 e A9, respectivamente. Análises dos ensaios de inibição de infecção com peptídeos sintéticos mostraram que o peptídeo La1 inibe em 45% a taxa de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, enquanto o peptídeo, Li1, reduziu a taxa de infecção de macrófagos tanto para *L. infantum* (42%) quanto para *L. mexicana* (39%). Estudos *in vivo*, utilizando o modelo murino BALB/c infectado com *L. infantum*, mostraram uma redução da carga parasitária em 84%, demonstrando o potencial terapêutico do peptídeo Li1. A descoberta de dois peptídeos, um capaz de inibir a infecção por duas espécies e um espécie-específico, abre a possibilidade de uma continuidade deste trabalho com capacidade de impacto em ciência básica. Futuros trabalhos, podem utilizar das sequências peptídicas e resultados apresentados nessa tese para identificar proteínas de superfície responsáveis pela interação parasita-hospedeiro das diferentes espécies. Além disso, a significativa redução da infecção *in vivo* também mostra a capacidade deste trabalho em contribuir com futuras estratégias de combate às leishmanioses.

Palavras-Chave: Inibição de infecção, *Phage Display*, Leishmanioses.

Abstract

Given the high incidence and severity of leishmaniasis, especially visceral leishmaniasis (VL), and recognizing the limitations of conventional methods for control and treatment, our research aimed to contribute to the fighting and prevention of these diseases. The main objective of this project was to identify peptides capable of reducing the infection rate of *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana*, and *Leishmania infantum* species into THP-1 cells differentiated into macrophages. The identification of such peptides was achieved by applying the phage display technique to select recombinant phages expressing peptides with high affinity for the surface of the different *Leishmania* species. The selection process of peptide sequences of interest was based on three criteria: i) analysis of the frequency of predicted peptide sequence through sequencing, ii) qualitative analysis of the phage-*Leishmania* interaction via fluorescence assays, and iii) inhibition assays to evaluate the infection rate in macrophages using recombinant phages. The phage selected from phage display assays against *L. infantum*, A9, reduced the infection rate of macrophages by 51.5% and 53.6% for *L. infantum* and *L. amazonensis*, respectively. On the other hand, the phage H1, selected through interaction with *L. amazonensis*, showed significant reductions in the infection rate, 47%, only for *L. amazonensis*. We also assessed the synthetic peptides La1 and Li1 that were synthesized based on the peptide sequence expressed by H1 and A9 phages, respectively. Analyses of the synthetic peptides showed that peptide La1 inhibited the infection rate of macrophages by *L. amazonensis* by 45%, while peptide Li1 reduced the infection rate of macrophages for both *L. infantum* (42%) and *L. mexicana* (39%). *In vivo* studies using the BALB/c murine model infected with *L. infantum* showed an 84% reduction in parasite load, demonstrating the therapeutic potential of peptide Li1. The discovery of two peptides, one capable of inhibiting infection by two species and one specific to a species, opens the possibility of continuing this work with an impact on basic science. Future studies can use the peptide sequences and results presented in this thesis to identify surface proteins responsible for the parasite-host interaction among distinct species. Moreover, the significant reduction for the *in vivo* infection also demonstrates the ability of this work to contribute to future strategies for combating leishmaniasis.

Keywords: Infection Inhibition, Phage Display, Leishmaniasis.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Leishmania* no inseto vetor. Cada painel mostra o desenvolvimento do parasita por 6 dias. (A) Ilustra o primeiro repasto sanguíneo *BMI- blood meal 1*, amastigotas são confinados pela matriz peritrófica (MP), os amastigotas se diferenciam em promastigota procíclica, forma com divisão lenta e que dá origem à promastigota nectomonas. As nectomonas saem da MP e se aderem ao epitélio intestinal e dão origem às leptomonas, essas se dividem eficientemente e estabelecem a infecção no intestino médio. (B) O segundo repasto sanguíneo promove a multiplicação de leptomonas, que se diferenciam em metacíclicas não divisíveis e que se acumulam na região torácica. (C) No terceiro repasto sanguíneo, ocorre a inoculação dos parasitas no hospedeiro e o sangue fresco induz a diferenciação de metacíclicas em retroleptomona que são células de rápida multiplicação e se tornam a maioria no intestino médio. (D) Caso ocorra o quarto repasto sanguíneo, o sangue fresco reinicia-se à amplificação de metacíclicas por meio de retroleptomona, que, por sua vez, bloqueia ainda mais a válvula estomodeal. Fonte (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021).

Figura 2: Interação da *Leishmania* spp. com as principais células do sistema imune. Fonte: (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022).

Figura 3: Formas de *Leishmania* obtidas por meio de seleção por Ficoll, que foram posteriormente analisadas utilizando imagens de microscopia óptica e contadas utilizando o programa *Image J*.

Figura 4: Curva de crescimento ao longo de um período de 8 dias. O ensaio foi conduzido para as espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, utilizando a câmara de Neubauer e uma número inicial de 1×10^5 parasitas/mL.

Figura 5: Enriquecimento de fagos recombinantes com afinidade para promastigotas metacíclicas após quatro (I a IV) ou cinco (I a V) *rounds* de seleção frente às espécies *L. amazonensis* (azul), *L. infantum* (vermelho) e *L. mexicana* (verde). Calculamos a razão *output/input*, onde “*output*” corresponde ao número de fagos recombinantes recuperados após *biopanning* e “*Input*”, concentração inicial de fagos utilizados 10^{11} .

Figura 6: Matriz de similaridade representada em termos percentuais do enriquecimento de sequências de peptídeos preditas via sequenciamento. A matriz compara a composição e a posição dos aminoácidos entre todos os fagos recombinantes sequenciados do terceiro *round* de seleção. Os quadrados indicam uma similaridade de 100% entre duas sequências, enquanto o azul intenso representa 0% de similaridade, sendo que a cor branca indica casos em que 50%

dos aminoácidos são similares. As figuras a), b) e c) apresentam a matriz de similaridade após a terceira rodada de seleção para *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente.

Figura 7: Matriz de similaridade representada em termos percentuais do enriquecimento de sequências de peptídeos preditas via sequenciamento. A matriz de similaridade baseada na análise de posição e composição de aminoácidos entre todos os fagos recombinantes sequenciados do quarto *round* de seleção. Os quadrados indicam uma similaridade de 100% entre duas sequências, enquanto o azul intenso representa 0% de similaridade, sendo que a cor branca indica casos em que 50% dos aminoácidos são similares. As figuras a), b) e c) apresentam a matriz de similaridade após a quarta rodada de seleção para *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente.

Figura 8: Matriz de similaridade representada em termos percentuais do enriquecimento de sequências de peptídeos preditas via sequenciamento. A matriz compara a composição e a posição dos aminoácidos entre todos os fagos recombinantes sequenciados do quinto *round* de seleção. Os quadrados indicam uma similaridade de 100% entre duas sequências, enquanto o azul intenso representa 0% de similaridade, sendo que a cor branca indica casos em que 50% dos aminoácidos são similares. As figuras a) e b) apresentam a matriz de similaridade após a quinta rodada de seleção para *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente.

Figura 9: Principais sequências peptídicas preditas e obtidas após 4^o ou 5^o *round* em promastigota metacíclicas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*. A biblioteca de fagos utilizada possui resíduos de cisteína fixos na posição 2 e 11, o que facilita a predição de sua sequência. Todos os clones listados (A) foram obtidos por sequenciamento e analisados utilizando o programa *Chromas Lite*. Os fagos recombinantes selecionadas, H1, E1 e A9, estão indicados em vermelho, foram escolhidos por serem os mais frequentes entre os clones sequenciados. Também realizamos estudos adicionais com o fago A12, específico de *L. mexicana*. O fago recombinante C3 é o controle negativo, em função da presença de um códon de parada. A análise da frequência e similaridade das sequências foi realizada através do programa *Clustal Omega multi Sequence alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), e a comparação da composição e posição dos aminoácidos dos peptídeos para *L. amazonensis* indicada em B) e C) e foi analisado com a ferramenta MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), indicando o enriquecimento de aminoácidos como uma arginina e dois triptofanos nas posições 3, 5 e 6 respectivamente. Essa composição representa 75% (24) entre os candidatos obtidos para *L. amazonensis* (31).

Figura 10: Teste de IFA (Ensaio de Ligação) dos fagos recombinantes H1, A12 e A9, identificados durante o processo de *biopanning* realizados frente as espécies *L. amazonensis* (La), *L. mexicana* (Lm) e *L. infantum* (Li). As amostras foram incubadas *overnight* à 4°C na presença de 2x10⁶ PFU/μl de fagos recombinantes diluídos em PBS juntamente com os

parasitas (1×10^9). Como controles negativos, foram utilizados PBS, os fagos C3 e WT. Após as lavagens, as formas metacíclicas foram incubadas com anticorpo anti-M13 (5 $\mu\text{g/ml}$, diluído 1/1000) e em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado Alexa 488[®] e finalmente coradas com DAPI. Na figura destaca-se em vermelho a interação parasita:fago espécies específicos, i.e *L. amazonensis*: H1, *L. mexicana*: A12 e *L. infantum*: A9.

Figura 11: Ensaio de tempo de infecção (*Time course assay*): teste de infectividade dos parasitas incubados a 37°C e 5% CO₂. A infecção foi interrompida em 0 h (2 min após o contato com os macrófagos), 2, 4 e 8 h. Os parasitas foram corados com CFSE antes do ensaio de infecção, posteriormente fixados com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, de acordo com especificações do fabricante e contadas em um microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Dados obtidos em dois experimentos independentes.

Figura 12: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania* homogeneizadas com $2 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes H1 (específico de *L. amazonensis*), A12 (específico de *L. mexicana*), A9 (específico de *L. infantum*) e controle negativo C3 com macrófagos. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, e a infecção foi interrompida após 4 h, posteriormente fixados com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Figura 13: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania* homogeneizadas com $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes H1 (específico de *L. amazonensis*), A12 (específico de *L. mexicana*), A9 (específico de *L. infantum*) e controle negativo C3 em macrófagos. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, e a infecção foi interrompida após 8 h, posteriormente fixados com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Figura 14: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* homogeneizadas com $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes por 2 h. Os seguintes fagos recombinantes foram: C3 – controle negativo, H1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), A9 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), H8 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção), E1 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção), A12 (específico de *L. mexicana* obtido no 4º round de seleção), C5 e F6 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção). Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção seguindo as instruções do fabricante. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, incubação foi realizada a 37°C e 5% CO₂, a infecção foi interrompida após 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figura 15: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania infantum* homogeneizadas com $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes por 2 h em macrófagos. Os seguintes fagos recombinantes foram: C3 – controle negativo, H1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), A9 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), H8 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção), E1 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção), A12 (específico de *L. mexicana* obtido no 4º round de seleção), C5 e F6 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção). Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, incubação foi realizada a 37°C e 5% CO₂, a infecção foi interrompida após 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figura 16: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania mexicana* homogeneizadas com $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes por 2 h em macrófagos. Os seguintes fagos recombinantes foram: C3 – controle negativo, H1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), A9 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), H8 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção), E1 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção), A12 (específico de *L. mexicana* obtido no 4º round de seleção), C5 e F6 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção). Os parasitas foram marcados

com CFSE antes da infecção, incubação foi realizada a 37°C e 5% CO₂, a infecção foi interrompida após 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figura 17: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* homogeneizadas com peptídeos sintéticos em concentração de 0.5 mg/mL por 2 h em macrófagos. Os peptídeos testados foram: HP1 – controle negativo, La1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), Li1 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), Li2 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção) e por fim o Li1_{SCR} controle negativo. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, a incubação foi realizada à 37°C e 5% CO₂, o processo de infecção ocorreu por 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figura 18: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania infantum* homogeneizadas com peptídeos sintéticos em concentração de 0.5 mg/mL por 2 h em macrófagos. Os peptídeos testados foram: HP1 – controle negativo, La1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), Li1 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), Li2 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção) e por fim o Li1_{SCR} controle negativo. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção a incubação foi realizada à 37°C e 5% CO₂, o processo de infecção ocorreu por 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figura 19: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* homogeneizadas com peptídeos sintéticos em concentração de 0.5 mg/mL por 2 h em macrófagos. Os peptídeos testados foram: HP1 – controle negativo, La1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), Li1 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), Li2 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção) e por fim o Li1_{SCR} controle negativo. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, a incubação foi realizada à 37°C e 5% CO₂, o processo de infecção ocorreu por 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figura 20: Teste de IFA realizado com peptídeos sintéticos na concentração de 0.2 mg/mL diluídos em PBS e homogeneizados com os parasitas. Após as lavagens as formas metacíclica foram incubadas com estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor 594* (absorção 590 nm e emissão 617 nm) por 1 h. O núcleo dos parasitas foi corado utilizando DAPI. A marcação na lateral é correspondente às espécies. *La*, *L. amazonensis*; *Lm*, *L. mexicana*; *Li*, *L. infantum*.

Figura 21: Peptídeos selecionados se ligam à superfície da *Leishmania*. Imagens de microscopia confocal demonstram a especificidade de ligação dos peptídeos selecionados a promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os parasitas foram fixados e tratados com peptídeos sintéticos biotinilados após o bloqueio com 4% de BSA. A especificidade dos peptídeos foi visualizada usando estreptavidina *Alexa Fluor 594*.

Figura 22: Ensaio de inibição de infecção *in vivo* utilizando peptídeos sintéticos biotinilados. Camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, pré-tratados com peptídeos selecionados (La1, Li1 e Li1_{SCR}). Os camundongos foram sacrificados após 30 dias para análise da carga parasitária no fígado e baço. Dados combinados de quatro experimentos independentes (total de 12 camundongos por grupo). Valores de p (*, <0,05; **, <0,01) calculados utilizando o teste de *Mann-Whitney U*.

Lista de tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reações de PCR e RT-qPCR.....	43
Tabela 2: Componentes da síntese de cDNA.....	50
Tabela 3: Condições de Ciclagem da Síntese de cDNA.....	51

Anexos

Anexo I. Síntese Química do peptídeo La1.....	104
Anexo II: Síntese Química do peptídeo Li1.....	108
Anexo III: Síntese Química do peptídeo Li1 _{SCR}	112
Anexo IV: Síntese Química do peptídeo Li2.....	116
Anexo V: Controles RT-qPCR.....	120

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
CD68	<i>Cluster of Differentiation 68</i>
CP	Cisteíno proteinases (CPA, CPB e CPC)
CR1	<i>Complement receptor 1</i>
CR3	<i>Complement receptor 3</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fcγ	Receptor Fc
GIPLs	Glicoinositolfosfolípidos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GP63	Glicoproteína 63
IFA	<i>Immunofluorescence Assay</i>
IFN-γ	Interferon-Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LC	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ME	Matriz extracelular
MIP-1β	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MP	Matriz peritrófica
MR	<i>Mannose-fucose receptor</i>
NETs	Rede extracelular de neutrófilos
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PG	Fosfoglicana
PKC	Proteína Quinase C
PS	Fosfatidilserina
pH	Potencial Hidrogeniônico
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TU	<i>Transducing Unit</i>

Sumário

1 Introdução: Leishmanioses	20
1.1 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	21
1.2 Receptores de macrófagos implicados na fagocitose de <i>Leishmania</i>	25
1.3 Superfície da <i>Leishmania</i> e sua Interação com o Hospedeiro.....	26
1.4 Fatores de Virulência.....	28
1.5 Estratégias de Sobrevivência e Interferência na Resposta Imunológica.....	30
1.6 Manifestações clínicas e resposta imunológica.....	31
1.7 Controle das leishmanioses: Tratamentos e vacinas.....	35
2 Introdução: Phage display	38
3 Objetivos	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 Material e Métodos	42
5 Resultados	54
5.1 Identificação de fagos recombinantes com afinidade por <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> e <i>L. infantum</i>	54
5.2 <i>Biopanning</i> ou seleção por afinidade permitiu a seleção de três peptídeos capazes de interferir na internalização de <i>Leishmania</i> em macrófagos.....	55
5.3 Fagos recombinantes: Inibição da infecção por <i>Leishmania</i> em macrófagos e interação com a superfície das <i>Leishmania</i>	64
5.4 Avaliação da taxa de infecção de macrófagos frente às espécies <i>L. amazonensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. mexicana</i> após pré-incubação com os fagos recombinantes.....	66
6 Avaliação da taxa de infecção de macrófagos frente às espécies <i>L. amazonensis</i>, <i>L. infantum</i> e <i>L. mexicana</i> após pré-incubação com os peptídeos sintéticos baseados nos fagos recombinantes	74
6.1 Avaliação do potencial de ligação dos peptídeos à superfície do parasita <i>Leishmania</i>	79
6.2 Avaliação <i>in vivo</i> da taxa de infecção de <i>L. infantum</i> em BALB/c.....	82
7 Discussões e perspectivas	86
8 Conclusões	93
9 Referências Bibliográficas	94

1. Introdução: Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (ORGANIZATION, 2023; PAHO/WHO, 2017; WHO, 2023). Essas parasitoses são transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectados (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) (AKHOUNDI; KUHLS; CANNET; VOTÝPKA *et al.*, 2016; LUTZ; NEIVA, 1912). As leishmanioses são consideradas doenças endêmicas e negligenciadas em pelo menos 102 países e territórios (PAHO, 2019). Elas afetam anualmente cerca de 1,3 milhões de pessoas e são consideradas a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias, chegando a 30 mil óbitos por ano (PAHO, 2019).

Dentre as diferentes manifestações da doença, destaca-se a leishmaniose visceral (LV), cuja incidência anual é de 0.1 milhão de casos, podendo ser fatal se não tratada (ALVAR; VÉLEZ; BERN; HERRERO *et al.*, 2012). Dentre as espécies causadoras de LV, a *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) (NICOLLE, 1908) é o agente causador da LV nas Américas, tendo como principal vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (LEMOS-SILVA; TELLERIA; TRAUB-CSEKÖ, 2021; LUTZ; NEIVA, 1912). No Brasil, a LV se faz presente desde 1980 (HARHAY; OLLIARO; COSTA; COSTA, 2011), sendo caracterizada como uma doença rural e que se espalhou para centros urbanos, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Norte, Sul e Sudeste do Brasil (YADAV; AZAM; RAMESH; SINGH, 2023; ÁVILA; DE ARAÚJO; BARBOSA; BEZERRA, 2023). Os surtos da doença têm sido relacionados a regiões que sofrem com falta de planejamento urbano, saneamento básico, desmatamento, aumento de temperatura, entre outras razões (FALCÃO DE OLIVEIRA; OLIVEIRA; ARRUDA; FERNANDES *et al.*, 2020; MACHADO; ALVAREZ; BAKKA; PEREZ *et al.*, 2019; VALERO; PRIST; URIARTE, 2021). O controle da doença é realizado principalmente pela associação de diagnóstico, tratamento precoce de indivíduos doentes e tratamento de cães infectados (TESH, 1995; WILSON; COURTENAY; KELLY-HOPE; SCOTT *et al.*, 2020). Além disso, são adotadas outras medidas preventivas, tais como evitar contato com o inseto vetor durante os horários de maior atividade, a utilização de telas mosquiteiros e uso de

repelentes (MOAFI; REZVAN; SHERKAT; TALEBAN, 2019; RATNAPRIYA; KEERTI; SAHASRABUDDHE; DUBE, 2019; TESH, 1995).

A forma tegumentar da leishmaniose pode apresentar diferentes manifestações, abrangendo um amplo espectro de sintomas, incluindo a forma cutânea localizada (LC), cutânea disseminada (LD) e cutânea difusa (LCD) (FERREIRA; COSER; SABORITO; YAMASHIRO-KANASHIRO *et al.*, 2023; MIRANDA; PACHECO; PIMENTEL; SALGUEIRO *et al.*, 2019; VALE; FURTADO, 2005). Essa forma da doença pode afetar até 1.2 milhões de pessoas por ano, com prevalência nas Américas. A leishmaniose tegumentar no Brasil é causada por algumas espécies: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* (FERREIRA; COSER; SABORITO; YAMASHIRO-KANASHIRO *et al.*, 2023; MIRANDA; PACHECO; PIMENTEL; SALGUEIRO *et al.*, 2019; VALE; FURTADO, 2005).

1.1 Ciclo biológico da *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo biológico do tipo digenético, envolvendo flebotomíneos e hospedeiros vertebrados, como os mamíferos (HALL; BLAKEMAN; EISSA; CHAPMAN *et al.*, 2020; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011). O ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas com o protozoário (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SUNTER; GULL, 2017). Após a inoculação de formas promastigotas na derme do hospedeiro, estas são fagocitadas por células mononucleares fagocíticas, como macrófagos, células dendríticas ou mesmo neutrófilos, e a infecção pode ou não se estabelecer dependendo da interação hospedeiro-parasita (RIBEIRO-GOMES; OTERO; GOMES; MONIZ-DE-SOUZA *et al.*, 2004; SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021). Caso se estabeleça, os parasitas que foram fagocitados pelos macrófagos se diferenciam à amastigotas e se multiplicam por divisão binária, rompendo a célula hospedeira e disseminando a infecção (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021).

Como ilustrado na Figura 1, o ciclo biológico da *Leishmania* no inseto inicia-se após a chegada da forma amastigota a seu intestino médio (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021). Durante o repasto sanguíneo, o sangue ingerido é envolvido pela

matriz peritrófica, que atua isolando o sangue e possibilita sua digestão (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021). As formas amastigotas diferenciam-se a promastigotas e, mudanças no microambiente do parasita, como alterações de temperatura e pH ativam o processo de metaciclo-gênese, o qual resulta em mudanças estruturais, funcionais e também em níveis de expressão de proteínas nestas formas promastigotas (BATES; ROGERS, 2004; SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021; SERAFIM; FIGUEIREDO; COSTA; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2012).

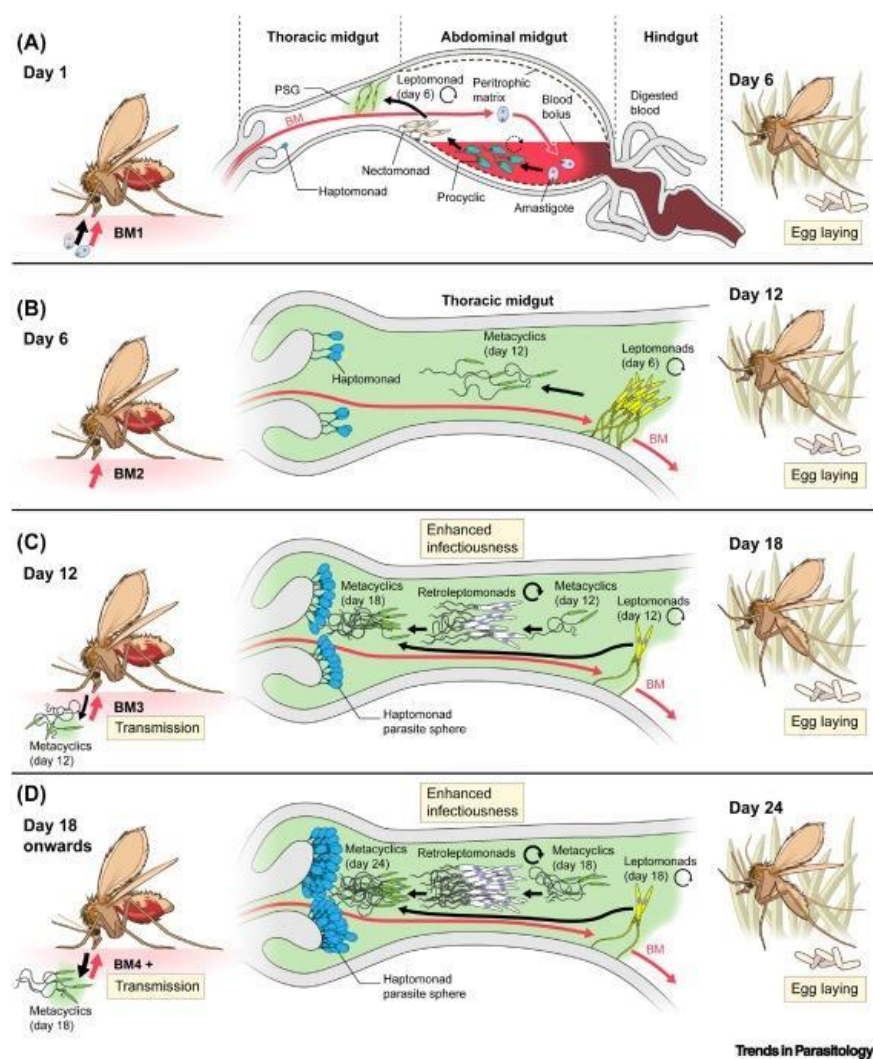


Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Leishmania* no inseto vetor. Cada painel mostra o desenvolvimento do parasita por 6 dias. (A) Ilustra o primeiro repasto sanguíneo *BM1- blood meal 1*, amastigotas são confinados pela matriz peritrófica (MP), os amastigotas se diferenciam em promastigota procíclica, forma com divisão lenta e que dá origem à promastigota

nectomonas. As nectomonas saem da MP e se aderem ao epitélio intestinal e dão origem às leptomonas, essas se dividem eficientemente e estabelecem a infecção no intestino médio. (B) O segundo repasto sanguíneo promove a multiplicação de leptomonas, que se diferenciam em metacíclicas não divisíveis e que se acumulam na região torácica. (C) No terceiro repasto sanguíneo, ocorre a inoculação dos parasitas no hospedeiro e o sangue fresco induz a diferenciação de metacíclicas em retroleptomona que são células de rápida multiplicação e se tornam a maioria no intestino médio. (D) Caso ocorra o quarto repasto sanguíneo, o sangue fresco reinicia-se à amplificação de metacíclicas por meio de retroleptomona, que, por sua vez, bloqueia ainda mais a válvula estomodeal. Fonte (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021).

Inicialmente, a forma amastigota se transforma em promastigota procíclica e após alguns dias, os parasitas reduzem a replicação e se diferenciam para uma forma mais alongada, capaz de mover-se mais rapidamente, conhecida como nectomona (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021). A forma nectomona se acumula na porção anterior da matriz peritrófica. A rápida movimentação e secreção de quitinases pelo parasita resultam na criação de poros na matriz peritrófica (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021). Esses poros permitem que a forma nectomona escape e se anexe às microvilosidades do epitélio, evitando a expulsão dos parasitas durante a defecação do inseto (BATES; ROGERS, 2004). A aderência dos parasitas ocorre por meio da interação entre glicoconjugados presente na superfície do parasita e o epitélio intestinal do inseto (HALL; BLAKEMAN; EISSA; CHAPMAN *et al.*, 2020). Assim, a forma nectomona desempenha um papel de importância no estabelecimento da infecção no inseto vetor (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021).

As formas nectomonas migram para a válvula estomodeal e se transformam em leptomonas, que são formas curtas capazes de se multiplicar e colonizar eficientemente o epitélio (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021). Além disso, a forma leptomona é capaz de secretar o *promastigote secretory gel*, e diferenciar-se para promastigotas metacíclicas (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; STIERHOF; BATES; JACOBSON; ROGERS *et al.*, 1999).

O estabelecimento das leishmanioses está intimamente ligado à complexa relação parasita-inseto vetor-hospedeiro (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021; ZABALA-PEÑAFIEL; TODD; DANESHVAR; BURCHMORE, 2020). A transmissão

bem-sucedida e consequente desenvolvimento da doença ocorrem por meio de uma interação dinâmica, facilitada por fatores como a saliva do inseto e o *promastigote secretory gel* (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002). Esses fatores promovem a sobrevivência do parasita e o estabelecimento da doença no hospedeiro vertebrado (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021).

A infecção do hospedeiro mamífero acontece quando a forma promastigota metacíclica é inoculada pelo inseto vetor através do repasto sanguíneo (TESH, 1995). No momento da picada, a lesão tecidual causada pela probóscide do inseto induz a ativação do processo de reparação do tecido, o que atrai células do sistema imunológico, como neutrófilos, macrófagos e citocinas e fibroblastos (DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016; RIBEIRO-GOMES; OTERO; GOMES; MONIZ-DE-SOUZA *et al.*, 2004).

O parasita, entra em contato com a matriz extracelular (ME) da derme, composta por proteínas fibrosas como colágeno e a elastina, além de proteoglicano entre outras biomoléculas (ABREU-SILVA; CALABRESE; MORTARA; TEDESCO *et al.*, 2004; PETROPOLIS; RODRIGUES; VIANA; PONTES *et al.*, 2014; WELLS; NUSCHKE; YATES, 2016). Essa matriz atua como uma barreira física que dificulta a entrada do parasita na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos, principalmente por meio da ativação de células do sistema imune (ABREU-SILVA; CALABRESE; MORTARA; TEDESCO *et al.*, 2004). No entanto, a forma promastigota metacíclica é capaz de se ligar a receptores das estruturas de colágenos, como também é capaz de atravessá-los, via ação de proteinases pertencentes a pelo menos duas classes: a cisteína e metalocisteína (BATES; ROBERTSON; COOMBS, 1994; PETROPOLIS; RODRIGUES; VIANA; PONTES *et al.*, 2014). Essas estruturas de colágeno sofrem uma degradação da sua estrutura conformacional, onde há uma ruptura de estruturas rígidas que facilitam o espalhamento da infecção (ABREU-SILVA; CALABRESE; MORTARA; TEDESCO *et al.*, 2004; PETROPOLIS; RODRIGUES; VIANA; PONTES *et al.*, 2014; WELLS; NUSCHKE; YATES, 2016).

O estabelecimento inicial do parasita no hospedeiro é um tópico ainda em discussão. A resposta imune do hospedeiro é um fator que pode beneficiar o estabelecimento da doença através de neutrófilos. Os neutrófilos fagocitam de 80 a 90% dos parasitas e são considerados "Cavalos de Tróia", uma vez que, ao não conseguirem eliminar os protozoários internalizados, sinalizam quimicamente e recrutam macrófagos para o local da infecção (PETERS; SACKS,

2006; PETERS; EGEN; SECUNDINO; DEBRABANT *et al.*, 2008). Essa estratégia silenciosa permite que os parasitas sejam fagocitados pelos macrófagos sem serem percebidos (PETERS; EGEN; SECUNDINO; DEBRABANT *et al.*, 2008). Tal entendimento se opõe à hipótese de infecção direta em macrófagos (PETERS; SACKS, 2006).

Conforme discutido nas seções anteriores, o ciclo biológico da *Leishmania* depende de interações essenciais com hospedeiros. Para uma maior compreensão dessas interações, é fundamental aprofundar nosso conhecimento sobre as características e receptores presentes nos macrófagos que facilitam a internalização do parasita nos hospedeiros vertebrados, bem como as características da superfície de *Leishmania* spp.

1.2 Receptores de macrófagos implicados na fagocitose de *Leishmania*

Os macrófagos, células do sistema imune inato, desempenham um papel fundamental na internalização de *Leishmania*, um processo desencadeado pela ativação de seus receptores de superfície que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (MERIDA-DE-BARROS; CHAVES; BELMIRO; WANDERLEY, 2018). Tanto as formas promastigotas metacíclicas quanto as amastigotas apresentam moléculas em suas superfícies que interagem com receptores nos macrófagos, desencadeando respostas imunes (ADEREM; UNDERHILL, 1999; LIU; UZONNA, 2012).

Os parasitas quando internalizados passam a localizar dentro de vacúolos parasitóforos (BATISTA; NÁJERA; MENEGHELLI; BAHIA, 2020). Esses vacúolos parasitóforos podem apresentar diferenças significativas de uma espécie para outra, com variações em tamanho, quantidade de amastigotas e até adquirir proteínas associada à membrana do retículo endoplasmático através de vesículas do retículo (ANTOINE; PRINA; JOUANNE; BONGRAND, 1990; ANTOINE; PRINA; LANG; COURRET, 1998; NDJAMEN; KANG; HATSUZAWA; KIMA, 2010).

Os receptores de complemento CR1, CR3, receptor de fibronectina e receptor de manose-fucose (MR) nos macrófagos possuem um papel importante na ligação e aderência das promastigotas (KANE; MOSSER, 2000). Embora estudos sugiram que *Leishmania* de diferentes espécies possam usar diferentes vias de entrada mediada por receptores (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; GUY; BELOSEVIC, 1993; UENO; WILSON, 2012;

WILSON; PEARSON, 1988), a ativação de determinados receptores específicos pode desencadear efeitos diferentes nos macrófagos (UENO; BRATT; RODRIGUEZ; WILSON, 2009; UENO; WILSON, 2012).

Por exemplo, promastigotas avirulentos em fase logarítmica de crescimento são internalizados tanto através de CR3 quanto MR, no entanto, não conseguem se estabelecer, enquanto as formas metacíclicas, purificados por densidade, são internalizados apenas por CR3. (DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016; UENO; BRATT; RODRIGUEZ; WILSON, 2009; UENO; WILSON, 2012). Uma possível explicação para isso, seria que o receptor CR3 se concentra em microdomínios contendo colesterol e caveolina, que resulta em um atraso na fusão lisossomal e favorece a replicação do parasita. Isso evidencia que a ligação a receptores específicos pode influenciar o destino e a sobrevivência do parasita no interior do macrófago (ADEREM; UNDERHILL, 1999; UENO; WILSON, 2012). É importante destacar que as formas metacíclicas que interagiram majoritariamente com o CR3 do macrófago não induziram o *burst* oxidativo (UENO; BRATT; RODRIGUEZ; WILSON, 2009). Essas descobertas sugerem que as formas metacíclicas de *Leishmania* que evitaram a interação com o receptor MR, conseguiram aumentar sua sobrevivência dentro dos macrófagos (UENO; BRATT; RODRIGUEZ; WILSON, 2009).

Quanto aos amastigotas, sua internalização pelos macrófagos ocorre por opsonização de IgG via receptores FC γ , devido à presença de fosfatidilserina (PS) na superfície do parasita, que imita corpos apoptóticos e induz a liberação de TGF- β pelos macrófagos, reduzindo a produção de óxido nítrico. O reconhecimento da PS pelos macrófagos também leva à captação de partículas por macropinocitose, resultando na internalização dos amastigotas e no estabelecimento da infecção (MERIDA-DE-BARROS; CHAVES; BELMIRO; WANDERLEY, 2018).

1.3 A Superfície da *Leishmania* e sua Interação com o Hospedeiro

A superfície celular da *Leishmania*, desempenha um papel multifacetário e crítico na interação com o hospedeiro, não apenas mantendo a integridade do ambiente intracelular da *Leishmania*, separando-o do ambiente externo, mas também desempenhando um papel fundamental na regulação das interações entre o protozoário e o ambiente externo. Isso facilita

a absorção de nutrientes e a transmissão de sinais que orientam os mecanismos de adaptação (BRAS-GONÇALVES; PETITDIDIER; PAGNIEZ; VEYRIER *et al.*, 2014; OLIVEIRA; FIGUEIREDO; REZENDE; VERANO-BRAGA *et al.*, 2020).

Neste contexto, exploraremos a composição da superfície celular das *Leishmania* e seu papel crucial na interação parasita-hospedeiro. Essa interação é mediada por diversos componentes, cada um desempenhando funções específicas na sobrevivência e adaptação da *Leishmania* no interior das células hospedeiras.

A composição da superfície celular da *Leishmania* spp. é complexa, envolvendo carboidratos, lipídios e proteínas covalentemente ligados, formando uma estrutura chamada glicocálice. Embora essa composição possa variar entre diferentes espécies de *Leishmania*, em geral, inclui componentes como lipofosfoglicano (LPG), proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), Glicoinositolfosfolipídios (GIPLs), bem como lipídios e proteínas (AL-KHALAIFAH, 2022; OLIVEIRA; FIGUEIREDO; REZENDE; VERANO-BRAGA *et al.*, 2020; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

1.3.1 Lipofosfoglicano (LPG)

O LPG (lipofosfoglicano) é uma molécula glicoconjugada altamente complexa, composta por quatro domínios: um GPI (glicosilfosfatidilinositol), um núcleo glicano, uma cadeia linear de fosfoglicana (PG) e uma terminação de oligossacarídeo (KAUSHAL; NAIK; PRAJAPATI; RANE *et al.*, 2023). A estrutura do LPG varia entre as espécies de *Leishmania* devido a modificações nos domínios PG e nos locais de substituição das cadeias laterais. Essas variações estruturais são fatores significativos que contribuem para a virulência do parasita (ELMAHALLAWY; ALKHALDI, 2021).

1.3.2 Glicoinositolfosfolipídios (GIPLs)

Os Glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) são glicolipídios de baixo peso molecular abundantemente presentes na superfície de parasitas, tanto na forma promastigota quanto na amastigota. Todos os estágios de desenvolvimento desses parasitas sintetizam GIPLs como a principal classe de glicolipídios (ELMAHALLAWY; ALKHALDI, 2021). Esses lipídios

desempenham um papel fundamental na sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos, além de terem um impacto na modulação da resposta imunológica (ELMAHALLAWY; ALKHALDI, 2021; PARANAÍBA; DE ASSIS; NOGUEIRA; TORRECILHAS *et al.*, 2015).

Além disso, os GIPLs, assim como o LPG, possivelmente devido à porção GPI compartilhada entre eles, desempenham um papel na supressão da atividade da PKC, um componente importante na sinalização celular e ativação de macrófagos (KOLÁŘOVÁ; VALIGUROVÁ, 2021; MCCONVILLE; BLACKWELL, 1991; ZUFFEREY; ALLEN; BARRON; SULLIVAN *et al.*, 2003).

1.4 Fatores de Virulência

1.4.1 Proteinases

As proteinases estão entre os fatores de virulência mais importantes, representam outra categoria de proteínas presentes na membrana celular das *Leishmania* spp. Essas proteinases participam de regulação de metabolismo auxiliando na quebra de ligações peptídicas, como também e na degradação de proteínas e peptídeos para a aquisição de aminoácidos para nutrição (MCKERROW; CAFFREY; KELLY; LOKE *et al.*, 2006). Além disso, desempenham papéis fundamentais nas etapas de invasão e movimentação do parasita no interior do hospedeiro, evasão do sistema imunológico, desenvolvimento da patologia e desfecho da doença (MCKERROW; CAFFREY; KELLY; LOKE *et al.*, 2006). Até o momento, dentre as quatro classes de proteinases descritas, as metaloproteinases e as cisteína proteinases foram as principais encontradas na membrana plasmática de diversas espécies de *Leishmania* (MCKERROW; CAFFREY; KELLY; LOKE *et al.*, 2006; SILVA-ALMEIDA; PEREIRA; RIBEIRO-GUIMARÃES; ALVES, 2012).

1.4.2 Glicoproteína 63 (GP63)

A GP63, também conhecido como leishmanolisina, é uma metaloproteinase essencial nas *Leishmania* spp., e desempenha um papel importante quando o parasita é internalizado por células fagocíticas e encapsulado em um fagossomo (Isnard, Shio *et al.* 2012). Para garantir sua

sobrevivência dentro desse fagossomo, a *Leishmania* utiliza glicoconjugados de superfície, como a GP63, para subverter o potencial microbicida (Arango Duque, Jardim et al. 2019).

A GP63 é expressa na superfície do parasita por meio de uma âncora de GPI, uma parte se desliga da superfície do parasita e se dissemina pelo citosol das células infectadas, como também é secretado para o meio extracelular. Isso faz dele uma das proteínas de superfície mais abundantes em promastigotas e representa cerca de 1% do proteoma total do parasita (Brittingham, Morrison et al. 1995, Isnard, Shio et al. 2012, Walker, Oghumu et al. 2013(MERCADO-CAMARGO; CERVANTES-CEBALLOS; VIVAS-REYES; PEDRETTI et al., 2020).

Estudos demonstraram que a GP63 pode degradar componentes extracelulares, facilitando a migração do parasita (Arango Duque, Jardim et al. 2019). Além disso, a GP63 possui a capacidade de interagir com diversas proteínas da célula hospedeira, utilizando mecanismos distintos para alcançar seus alvos. Essas interações são fundamentais para a sobrevivência do parasita e influenciam a resposta imune do hospedeiro (McGwire, Chang et al. 2003, Isnard, Shio et al. 2012, Arango Duque, Jardim et al. 2019).

O estudo das interações entre esses componentes da superfície da *Leishmania* e o hospedeiro revela uma rede complexa de estratégias que o parasita utiliza para persistir no interior das células hospedeiras e evitar a resposta imune. Compreender esses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes no combate às leishmanioses.

1.4.3 Cisteíno proteinases (CP)

As Cisteíno proteinases (CPs) desempenham um papel na patogênese da *Leishmania*, e sua presença pode variar dependendo do estágio de vida do parasita. Essas enzimas estão potencialmente relacionadas a características clínicas específicas, como a tendência a causar lesões cutâneas em vez de afetar órgãos viscerais. Suas funções cruciais incluem a capacidade de penetrar nas células e tecidos do hospedeiro, degradar proteínas e modular a resposta imunológica. Devido à importância dessas funções, as CPs estão sendo consideradas como alvos terapêuticos promissores (SIQUEIRA-NETO; DEBNATH; MCCALL; BERNATCHEZ et al., 2018). O parasita expressa várias CPs, sendo as mais bem caracterizadas a CPA, CPB e

CPC, todas pertencentes à família C1 do clã CA (SILVA-ALMEIDA; PEREIRA; RIBEIRO-GUIMARÃES; ALVES, 2012).

Interessantemente, em espécies como *L. donovani* e *L. major*, foi identificado um polimorfismo nos genes que regulam a expressão das CPs, o qual determina se o parasita se tornará dermatrópico ou viscerotrópico (HIDE; BAÑULS, 2008; SAKANARI; NADLER; CHAN; ENGEL *et al.*, 1997).

Além disso, acredita-se que as CPs desempenhem um papel na sobrevivência das amastigotas dentro do hospedeiro, uma vez que a expressão dessas enzimas é significativamente maior no extrato de amastigotas de *L. amazonensis* em comparação com promastigotas (MUNDODI; KUCKNOOR; GEDAMU, 2005).

Outra observação importante é que, quando parasitas *L. tropica* foram tratados com um inibidor de CP, houve uma notável diminuição na taxa de crescimento e na sobrevivência desses parasitas (MAHMOUDZADEH-NIKNAM; MCKERROW, 2004). Além disso, em camundongos BALB/c infectados com uma cepa apresentando deficiência na CPB, notou-se a ausência de produção de IL-4 por parte dos animais. Em vez disso, uma resposta do tipo Th1 foi desencadeada, resultando no controle eficaz da disseminação da infecção. Neste trabalho, os autores observaram que a infectividade da cepa foi restabelecida quando em contato com cosmídeos que expressavam múltiplas cópias de CPB (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998).

1.5 Estratégias de Sobrevivência e Interferência na Resposta Imunológica

A complexidade da interação entre a superfície da *Leishmania* e o hospedeiro revela uma série de estratégias de sobrevivência empregadas pelo parasita, incluindo:

1.5.1 Modulação da Resposta Imunológica

A *Leishmania* é capaz de modular a resposta imunológica do hospedeiro de várias maneiras. Os GIPLs, por exemplo, desempenham um papel na supressão da atividade da proteína quinase C (PKC), um componente crucial na sinalização celular e ativação de macrófagos. Isso resulta na diminuição da resposta imunológica eficaz contra o parasita

(McConville and Blackwell 1991, Zufferey, Allen et al. 2003, Kolářová and Valigurová 2021). Além disso, a GP63 interage com proteínas do hospedeiro, afetando a expressão de genes pró-inflamatórios nos macrófagos. Isso contribui para a capacidade da *Leishmania* de evitar uma resposta imunológica hostil (da Silva Lira Filho, Fajardo et al. 2021).

1.5.2 Subversão da Resposta Microbicida

Os promastigotas da *Leishmania* têm a habilidade de escapar das respostas microbicidas das células fagocíticas. Um dos principais mecanismos envolvidos nessa subversão é a atuação da GP63 e do lipofosfoglicano (LPG) (Arango Duque, Jardim et al. 2019). A GP63 desempenha um papel central nesse processo, evitando a degradação dos promastigotas no interior dos fagossomos das células fagocíticas (Chaudhuri, Chaudhuri et al. 1989). Além disso, o LPG, ancorado à superfície dos promastigotas por meio de uma ligação glicosilfosfatidilinositol, também contribui significativamente para essa subversão. Esses mecanismos são essenciais para a *Leishmania* sobreviver no ambiente intracelular do hospedeiro (Arango Duque, Jardim et al. 2019).

1.5.3 Migração e Disseminação

A capacidade da GP63 de degradar componentes extracelulares facilita a migração do parasita no ambiente do hospedeiro. Isso é evidenciado por estudos que demonstraram sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, permitindo que o parasita se mova de maneira mais eficaz no tecido (McGwire, Chang et al. 2003, Isnard, Shio et al. 2012).

1.6 Manifestações clínicas e resposta imunológica

As manifestações clínicas nas leishmanioses estão relacionadas à ampla diversidade de espécies do parasita do gênero *Leishmania* (KAYE; CRUZ; PICADO; VAN BOCXLAER *et al.*, 2020) e à resposta imunológica de cada indivíduo infectado, podendo resultar em um amplo espectro de manifestações como apresentação de lesões cutâneas até a visceralização da doença com o comprometimento dos fígado e baço (IKEOGU; AKALUKA; EDECHI; SALAKO *et*

al., 2020; PETERS; SACKS, 2006; RATNAPRIYA; KEERTI; SAHASRABUDDHE; DUBE, 2019; SCOTT; NOVAIS, 2016; SERAFIM; COUTINHO-ABREU; DEY; KISSINGER *et al.*, 2021).

A LC é a forma mais comum da doença, caracterizada por pápulas avermelhadas de 3 a 5 mm de diâmetro, que podem progredir para nódulos e, eventualmente, formar úlceras (LOMBARDO; PENNISI; LUPO; CHICHARRO *et al.*, 2014; SANDOVAL PACHECO; ARAUJO FLORES; FAVERO FERREIRA; SOSA OCHOA *et al.*, 2018). As lesões ulcerosas inflamadas geralmente aparecem aproximadamente de quatro a doze semanas após a infecção. Essas lesões podem cicatrizar, resultando em um aspecto fibroso, embora isso também dependa da espécie do parasita infectante (BILGIC-TEMEL; MURRELL; UZUN, 2019).

As manifestações agudas da LC são definidas como aquelas que duram menos de 12 meses, enquanto as crônicas são caracterizadas por duração superior a 12 meses e ausência de cicatrização espontânea (AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007; MANN; FRASCA; SCHERRER; HENAO-MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

A LMC é caracterizada pela destruição da mucosa nasal, oral ou mesmo da garganta, podendo ser tanto parcial quanto total (REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007; SANDOVAL PACHECO; ARAUJO FLORES; FAVERO FERREIRA; SOSA OCHOA *et al.*, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016). Já a LV, também conhecida como kala-azar, é a manifestação clínica que mais gera preocupações devido à letalidade em casos de não tratamento (TORRES-GUERRERO; QUINTANILLA-CEDILLO; RUIZ-ESMENJAUD; ARENAS, 2017). Esta forma clínica da doença caracteriza-se pela apresentação de um quadro de hepatoesplenomegalia, febre, perda de peso, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Em alguns casos, a infecção pode não apresentar sintomas (KAYE; CRUZ; PICADO; VAN BOCXLAER *et al.*, 2020). Essas informações fornecem uma visão sobre as diferentes formas clínicas das leishmanioses e destacam a importância da identificação correta e tratamento (YADAV; AZAM; RAMESH; SINGH, 2023).

Na literatura, existem dados relacionados à quantidade necessária de parasitas que precisam ser inoculados pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo para que a LC se estabeleça (AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007; ZABALA-PEÑAFIEL; TODD; DANESHVAR; BURCHMORE, 2020). Sugere-se que pelo menos 100 parasitas são necessários para o desenvolvimento da doença, e quando quantidades inferiores são inoculadas,

pode ocorrer um quadro silencioso de manifestações que pode estar relacionado ao desenvolvimento de imunidade, funcionando assim como uma vacina natural (AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007). Dados como esses estimulam novas pesquisas que ajudem elucidar a interação entre parasita e o hospedeiro mamífero, por meio de estudos focados nas respostas celulares e nos mecanismos de ação do protozoário, contribuindo também para questões em aberto sobre a resistência e suscetibilidade à infecção (AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007; KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006).

Os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas podem tanto ajudar na eliminação do parasita quanto facilitar a sua sobrevivência. Os neutrófilos são considerados as primeiras células presentes no local da infecção e utilizam mecanismos como fagocitose (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022). Além disso, podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e liberar uma estrutura proteica chamada de rede extracelular de neutrófilos (*Nets*), que captura e neutraliza o agente agressor (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022). A *Leishmania* consegue sobreviver dentro de neutrófilos através de inibição de fatores como estresse oxidativo e inibição do processo tipo apoptótico (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022). Os neutrófilos infectados liberam sinais, como o MIP1 β e IL-8, que são quimioatrativos e recrutam outras células, como outros neutrófilos, macrófagos, que auxiliam na progressão da doença (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022). Os macrófagos podem ser ativados por diversos sinais, e sua ativação apropriada é determinante para a eliminação de um patógeno em potencial (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022).

A fagocitose pode ocorrer tanto por macrófagos quanto por células dendríticas, resultando em diferentes desfechos. Células dendríticas infectadas produzem IL-12, importante para o desenvolvimento de células CD4⁺ Th1 produtoras de IFN- γ (LIU; UZONNA, 2012). Nas respostas do tipo Th1, os macrófagos são ativados pela via clássica, onde o IFN- γ auxilia na indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) nos macrófagos infectados. Essa enzima lisossomal utiliza a L-arginina como substrato, resultando na produção de óxido nítrico e outros radicais livres, que são importantes para eliminação do parasita intracelular (LIU; UZONNA, 2012).

Por outro lado, a produção de IL-4 por outros tipos de células, como queratinócitos, eosinófilos, favorece o desenvolvimento de células CD4⁺ Th2. As células Th2 produzem IL-4 e IL-13 entre outras citocinas, mas estas, aumentam a atividade da arginase. Essa enzima também utiliza L-arginina para a produção de poliaminas, que favorecem a proliferação intracelular do parasita, importantes para a produção de tripanotiona (BADIRZADEH; TAHERI; TASLIMI; ABDOSSAMADI *et al.*, 2017; LIU; UZONNA, 2012; UENO; WILSON, 2012).

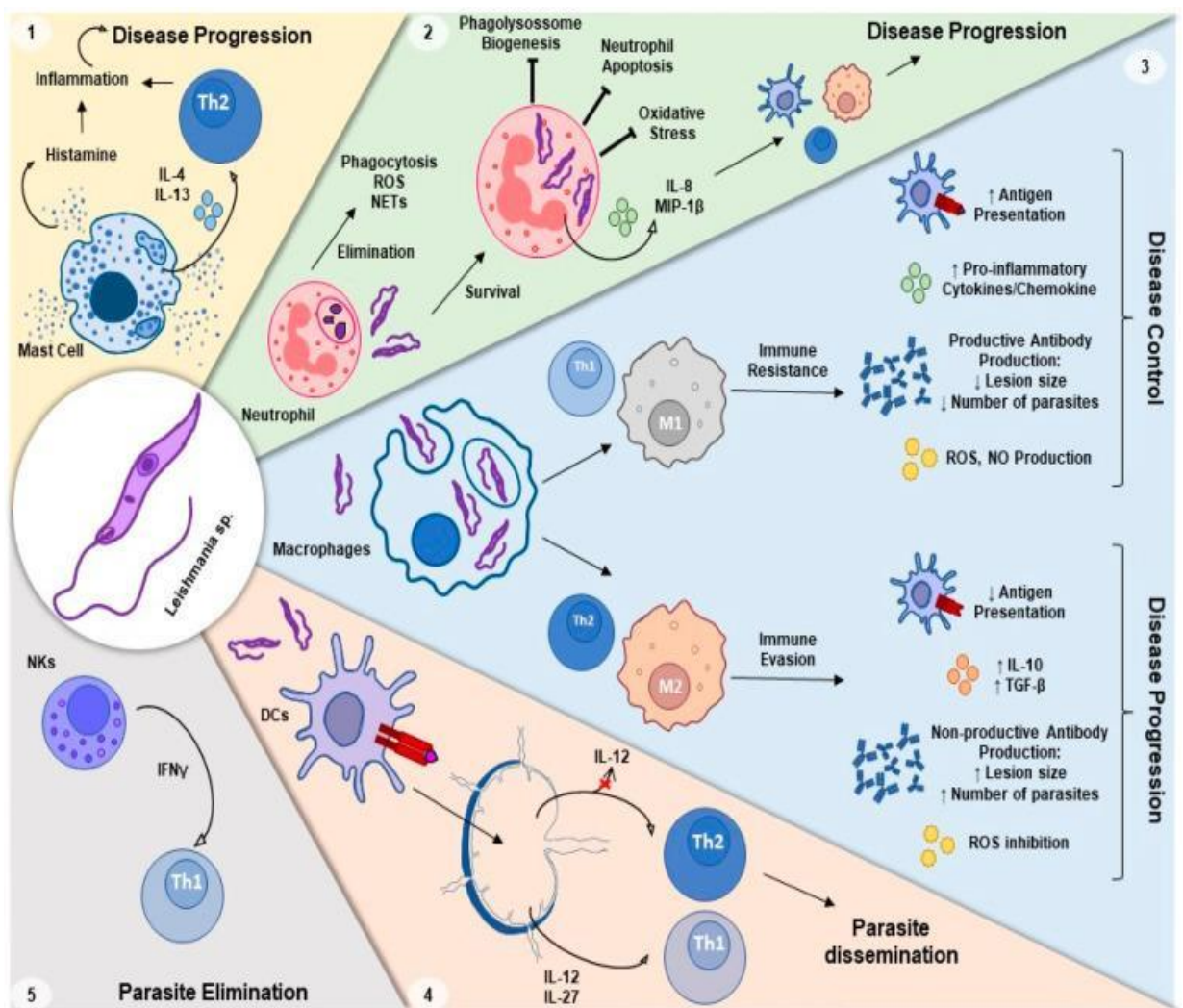


Figura 2: Interação da *Leishmania* spp. com as principais células do sistema imune. Fonte: (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022).

1.7 Controle das leishmanioses: Tratamento e vacinas

O tratamento das leishmanioses é uma questão complexa devido à diversidade de espécies de *Leishmania* envolvidas e às diferentes formas clínicas da doença. Em geral, os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B são os tratamentos de primeira linha no Brasil (RABELLO; GERMANO; MIRANDA, 2011). Uma alternativa terapêutica é a miltefosina, originalmente desenvolvida para combater tumores e posteriormente reposicionada para tratamento das leishmanioses (COPELAND; ARONSON, 2015; MACHADO; AMPUERO; GUIMARÃES; VILLASBOAS *et al.*, 2010). No entanto, é importante salientar que esses medicamentos podem causar efeitos colaterais, sendo necessário levar em consideração a faixa etária e a presença de comorbidades ou gravidez. Para pacientes com comorbidades, como por exemplo insuficiência renal, é recomendada a utilização da anfotericina B lipossomal, uma forma mais segura e eficaz desse medicamento (RABELLO; GERMANO; MIRANDA, 2011).

Adicionalmente, o uso inadequado desses medicamentos pode induzir o desenvolvimento de resistência parasitária, bem como acarretar preocupações relacionadas à toxicidade (RABELLO; GERMANO; MIRANDA, 2011). Por essa razão, pesquisadores têm se dedicado a explorar alternativas terapêuticas com um perfil de toxicidade reduzido, como demonstrado no estudo conduzido por Clementino *et al.* (CLEMENTINO; ODA; TEIXEIRA; TAVARES *et al.*, 2021), que investigou a eficácia do extrato da alga *Ascoseira mirabilis* como uma possível solução para a leishmaniose.

Atualmente, não existem vacinas disponíveis para uso humano contra as leishmanioses (MOAFI; REZVAN; SHERKAT; TALEBAN, 2019; RATNAPRIYA; KEERTI; SAHASRABUDDHE; DUBE, 2019). No entanto, estudos em modelos animais tem mostrado proteção contra a doença por meio da imunização com vacinas de DNA, e de proteína (ALEXANDRE; SADLOVA; LESTINOVA; VOJTKOVA *et al.*, 2020; KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006). Até o momento, apesar da grande necessidade de um programa vacinal eficaz tanto para a leishmaniose visceral quanto a cutânea, apenas alguns candidatos conseguiram chegar até testes clínicos como Leishvaccine, ALM, Leishmune, Canileish, LEISH-F3 entre outras (MOAFI; REZVAN; SHERKAT; TALEBAN, 2019).

Atualmente, há três vacinas disponíveis no mercado para a leishmaniose canina: Leish-Tec1, CaniLeish1 e Letifend. A Leish-Tec1 é composta pela proteína A2 recombinante do

amastigota e demonstrou ser eficaz em torno de 71% em áreas com pouca infecção e 35,7% em áreas com alta transmissão da doença. Contudo, seu uso apresenta desafios, já que utiliza o mesmo antígeno que alguns testes de sorologia, dificultando a diferenciação entre animais infectados e aqueles que foram vacinados (IBORRA; SOLANA; REQUENA; SOTO, 2018; LUDOLF; RAMOS; COELHO, 2023).

A vacina CaniLeish1, é composta por antígenos secretados de promastigotas de *L. infantum*, no entanto apresenta resultados variáveis de proteção (MORENO; VOULDOUKIS; MARTIN; MCGAHIE *et al.*, 2012). Por outro lado, a vacina Letifend, é feita de uma proteína quimérica recombinante conhecida como Proteína Q, que exibiu uma eficácia de 72% na prevenção da doença (FERNÁNDEZ COTRINA; INIESTA; MONROY; BAZ *et al.*, 2018). Dada a variabilidade na eficácia dessas vacinas atualmente disponíveis para leishmaniose canina, se faz necessário a identificação de novos antígenos em modelos experimentais (IBORRA; SOLANA; REQUENA; SOTO, 2018).

Uma técnica que tem sido de grande auxílio no desenvolvimento de vacinas é conhecida como *phage display* (ABEDON; DANIS-WLODARCZYK; WOZNIAK; SULLIVAN, 2021; HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012; LØSET; ROOS; BOGEN; SANDLIE, 2011; NIXON; SEXTON; LADNER, 2014; PETRENKO, 2008; WU; LIU; LU; WU, 2016). Essa abordagem envolve a produção de fagos recombinantes que expressam antígenos em seus capsídeos virais. Essa técnica oferece diversas vantagens, como alta estabilidade e baixo custo para produção em larga escala, demonstrando um potencial imunogênico (STAQUICINI; TANG; MARKOSIAN; YAO *et al.*, 2021). Além disso, devido às propriedades adjuvantes dos fagos e a sua segurança a humanos e animais, uma vez que são incapazes de causar infecções, ela se apresenta como uma ferramenta eficaz para vacinação de proteínas e epítomos (PALMA, 2023; STAQUICINI; TANG; MARKOSIAN; YAO *et al.*, 2021).

Uma vacina experimental contra a malária, desenvolvida usando a tecnologia de *phage display*, está atualmente em fase de testes. Camundongos BALB/c que receberam a vacina VLP-P47 produziram níveis de anticorpos significativamente mais altos do que aqueles que receberam a proteína Pfs47 natural ou P47 não conjugada. Esta vacina demonstrou uma redução notável no número de oocistos em comparação com os grupos de controle. Apesar de serem consideradas seguras e promissoras, vacinas baseadas em fagos ainda aguardam aprovação pelo

FDA (*Food and Drug Administration*) (PALMA, 2023; YENKOIDIOK-DOUTI; WILLIAMS; CANEPA; MOLINA-CRUZ *et al.*, 2019).

Considerando o estágio atual de desenvolvimento de vacinas e tratamentos disponíveis é essencial realizar pesquisas em busca de novas alternativas para o controle e combate das leishmanioses (PETRENKO, 2008; PETRENKO, 2018; SALLES; COSTA; ALVES; DIAS *et al.*, 2017; WU; LIU; LU; WU, 2016). Nesse contexto, o nosso projeto de pesquisa teve por objetivo identificar, via *phage display*, peptídeos específicos capazes de intervir no processo de infecção de macrófagos, utilizando as células THP-1 como modelo. Nós realizamos a técnica de *biopanning* utilizando três espécies, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. O intuito desse trabalho é a redução na taxa de infecção, o que nos auxiliaria aprofundar o entendimento da interação parasita- hospedeiro responsáveis pelo estabelecimento da infecção, bem como o entendimento de diferenças moleculares na superfície das diferentes espécies, que contribuiriam para o desenvolvimento de vacinas.

2 Introdução: *Phage display*

O *Phage display* é uma técnica amplamente utilizada na identificação e seleção de moléculas com afinidade específica para alvos de interesse, como proteínas de superfície celular (ALFALEH; ALSAAB; MAHMOUD; ALKAYYAL *et al.*, 2020; FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016; NIXON; SEXTON; LADNER, 2014).

Essa abordagem utiliza bacteriófagos filamentosos, como M13 e fd, geneticamente modificados para expressarem sequências fusionadas de peptídeos ou proteínas heterólogas. Esses bacteriófagos não causam lise bacteriana (ABEDON; DANIS-WLODARCZYK; WOZNIAK; SULLIVAN, 2021). Os bacteriófagos filamentosos possuem proteínas estruturais, como pVIII e pIII, que são usadas para expressar moléculas de interesse, com pVIII sendo adequada para peptídeos curtos. O *biopanning* é um processo de seleção no *Phage Display*, onde fagos expressando moléculas de interesse são incubados com o alvo desejado, permitindo a recuperação dos fagos que demonstrem afinidade (HAY; LITHGOW, 2019; SATTAR; BENNETT; WEN; GUTHRIE *et al.*, 2015; SMEAL; SCHMITT; PEREIRA; PRASAD *et al.*, 2017; STENT, 1963; VAN WEZENBEEK; HULSEBOS; SCHOENMAKERS, 1980).

Em constante expansão, essa técnica, desempenha um papel importante na descoberta de anticorpos terapêuticos, que são altamente eficazes na neutralização de patógenos interrupção de sua interação com células hospedeiras e desencadeamento de respostas imunológicas específicas (ALFALEH; ALSAAB; MAHMOUD; ALKAYYAL *et al.*, 2020; CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015; DE PAULA; LOPES-TORRES; JACOBS-LORENA; PAES *et al.*, 2022; PALMA, 2023; RHAJEM; HOUIMEL, 2016). Até julho de 2022, foram aprovados um total de 123 desses anticorpos para comercialização (Alfaleh, Alsaab et al. 2020). Esses anticorpos aprovados desempenham funções cruciais no tratamento de diversos tipos de câncer, bem como no combate a doenças inflamatórias como a doença de Crohn e esclerose múltipla (WANG; WANG; LU; LI *et al.*, 2022). Vale destacar que entre os novos anticorpos aprovados está o pioneiro tratamento para linfoma (WANG; WANG; LU; LI *et al.*, 2022). O *Phage display*, é uma técnica amplamente empregada em diversas áreas da pesquisa científica e desempenha um papel significativo na identificação de alvos terapêuticos, bem como na identificação de receptores de superfície. Essa abordagem

favorece a geração de potenciais métodos diagnósticos e amplia as aplicações vacinais (ALFALEH; ALSAAB; MAHMOUD; ALKAYYAL *et al.*, 2020; HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012). Na pesquisa básica, essa técnica permite a seleção de peptídeos que têm afinidade por receptores ou proteínas de superfície envolvidos nas complexas interações entre parasitas e hospedeiros. Essa abordagem não apenas aprofunda nossa compreensão dos mecanismos das doenças parasitárias, mas também abre novas perspectivas para o estudo dessas interações e a identificação de alvos potenciais (LUDOLF; RAMOS; COELHO, 2023; WU; LIU; LU; WU, 2016).

A técnica de *Phage display* foi bem-sucedida na identificação de peptídeos capazes de interromper o processo de invasão celular por *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária (CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015). O trabalho desenvolvido por Cha *et al.* (CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015) identificou um peptídeo chamado P39, que apresentou uma notável afinidade pela superfície das células de Kupffer. Mais importante ainda, observou-se que o P39 desempenha um papel inibitório na entrada dos esporozoítos nas células de Kupffer. Além disso, foi estabelecido que o P39 se liga ao CD68, um receptor hipotético que desempenha um papel na invasão dos esporozoítos nas células de Kupffer, atuando como um ponto de entrada essencial para a infecção do fígado pela malária. O P39 é considerado um mimotopo, pois se assemelha a alguma molécula ou estrutura na superfície das células de Kupffer, permitindo que ele se ligue a essas células e iniba a entrada dos esporozoítos (CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015).

No contexto da leishmaniose, o uso do *Phage display* tem sido empregado na identificação de biomarcadores de *Leishmania* (LUDOLF; RAMOS; COELHO, 2023). Essa abordagem envolve a avaliação de diversos extratos antigênicos solúveis, brutos ou totais com o objetivo de aprimorar a especificidade e sensibilidade de testes diagnósticos, como também ser possíveis candidatos vacinais (LUDOLF; RAMOS; COELHO, 2023).

Além disso, alguns trabalhos vêm associando a técnica de *phage display* com imunoproteômica, analisando soro de pacientes humanos e caninos infectados com o parasita com objetivo de responder perguntas relacionadas à complexidade da doença (MACHADO; COSTA; DIAS; RIBEIRO *et al.*, 2019). Nesse contexto, um estudo de imunoproteômica foi conduzido com o objetivo de avaliar os epítomos do parasita que poderiam ser reconhecidos pelas células B e T, visando a identificação de candidatos vacinais promissores. O estudo

envolveu a análise do perfil proteico de extratos de promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Além disso, utilizando soros de cães tanto assintomáticos quanto sintomáticos, a pesquisa buscou identificar proteínas reconhecidas por anticorpos em cães infectados com leishmaniose visceral, sem levar em consideração seu estado clínico. As proteínas antigênicas identificadas revelaram-se importantes para a resposta imunológica dos infectados (COELHO; OLIVEIRA; VALADARES; CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2012).

Embora o *phage display* já tenha mostrado ser uma ferramenta valiosa na descoberta de anticorpos monoclonais, o campo está em constante evolução e apresenta várias oportunidades para pesquisas futuras. Portanto, este projeto de pesquisa visou identificar peptídeos que interagissem com a superfície de diferentes espécies de *Leishmania* via *Phage display* e analisar a capacidade de tais peptídeos de reduzir a taxa de infecção de macrófagos do tipo THP-1 pelas espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. infantum*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo a identificação de peptídeos com afinidade às superfícies de diferentes espécies de *Leishmania* por meio da técnica de *phage display*. Nosso propósito era selecionar peptídeos que, além da afinidade pela superfície do parasita, também fossem capazes de reduzir a taxa de infecção de macrófagos do tipo THP-1 por *Leishmania* spp., contribuindo assim para o combate às leishmanioses.

3.2 Objetivos específicos

1. Utilizar a técnica de *biopanning* para selecionar fagos recombinantes com afinidade à superfície das seguintes espécies: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania mexicana*.
2. Realizar estudos de fluorescência para confirmar qualitativamente a interação dos fagos recombinantes e superfície dos parasitas.
3. Realizar testes de inibição da taxa de infecção em macrófagos com os fagos selecionados a fim de eleger fagos recombinantes que também apresentem capacidade de influenciar no mecanismo de internalização de tais espécies.
4. Avaliar *in vitro* o potencial de peptídeos sintéticos, análogos às sequências peptídicas expressas pelos fagos de maior interesse, em inibir a infecção de macrófagos por diferentes espécies de *Leishmania*. Este processo permite avaliar se a capacidade inibitória observada com fagos recombinantes é consequência de impedimento estérico ou da interação entre os peptídeos e moléculas de superfície das espécies de *Leishmania*.
5. Avaliar a capacidade dos melhores peptídeos sintéticos, previamente selecionados, em diminuir a carga parasitária de camundongos infectados com *L. infantum* em testes *in vivo*.

4. Material e Métodos

4.1 Cultura de *Leishmania*

Leishmania amazonensis (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79), *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) e *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) foram cultivadas utilizando o meio de cultura Schneider (Sigma- Aldrich, S0146) com glutamina, suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) e 5% penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL) a 27 °C de sete a oito dias. Para *L. infantum*, utilizou-se hemina como suplementação adicional (5 mg/mL) (FERREIRA; RODRIGUES; CASSIANO; TAVELLA *et al.*, 2020; FERREIRA-PAES; CHARRET; RIBEIRO; RODRIGUES *et al.*, 2020).

4.2 Cultura de macrófagos THP-1

As células THP-1 derivadas de monócitos humanos imortalizados (*MDMH*) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, acrescidos de 2-mercaptoetanol em concentração final de 0,05 mM e mantidas a 37 °C em 5% CO₂, de acordo com as instruções da ATCC. A diferenciação das células THP-1 foi realizada adicionando-se 0,1 mM de PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), seguido de incubação por 4 dias a 37 °C em 5% CO₂ (TEDESCO; DE MAJO; KIM; TRENTI *et al.*, 2018). A partir desse momento, nos referiremos as células THP-1 somente como macrófagos.

4.3 Cultura de bactérias

O cultivo da bactéria K91 foi realizado em placas contendo meio mínimo M9 (1X), suplementado com tiamina (1%) e ágar (2x) e incubada a 37 °C por um período de 2 a 4 dias para induzir estresse a produção de pilus sexuais. A partir de uma colônia da bactéria K91 cultivada nas placas de meio mínimo M9, foi realizado um pré-inóculo 5 mL de meio LB, seguido por incubação *overnight* à 37 °C sob constante agitação. Posteriormente, 100 µL do pré-inóculo foram transferidos para 10 mL de meio LB (triptona (1%), NaCl (0,5%), extrato de

leveduras (0,5%), pH 7,5). Essa cultura foi incubada à 37 °C, sob agitação constante a 125 rpm por 2,5 h ($\sim DO_{600} = 1$).

4.4 Biblioteca de fagos recombinantes LX-8

A biblioteca utilizada neste estudo, foi gentilmente cedida pelo professor Marcelo Jacobs Lorena, da *Johns Hopkins University*, Baltimore, EUA. A biblioteca consiste em bacteriófagos filamentosos do tipo M13, geneticamente modificados para expressar aleatoriamente $1,5 \times 10^9$ sequências de peptídeos com 12 aminoácidos. Esses peptídeos são fusionados à região N-terminal da proteína de superfície pVIII, formando a biblioteca LX-8, onde o “X” representa os aminoácidos randômicos incorporados. É importante ressaltar que, nas posições 2 e 11 dos peptídeos, estão inseridas cisteínas fixas para permitir a formação de um *loop* pelas pontes de dissulfeto contendo oito aminoácidos (BONNYCASTLE; MEHROKE; RASHED; GONG *et al.*, 1996).

4.5 Oligonucleotídeos utilizados

A Tabela 1 apresenta os Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e RT-qPCR durante os experimentos realizados nessa tese.

Gene	Sequência 5' - 3'	Referência
Fagos LX-8	F:CTTGTTCCCTATGCTATCGTTT	(BONNYCASTLE; MEHROKE; RASHED; GONG <i>et al.</i> , 1996)
	R:CTGAAGAGAGTCAAAAG	
	F:GCTGAACCCGTCCGAGT	

L-asparaginase	R: TGAGCCCTTTGCCGAACA	(SINGH; KHAN; SINGH YADAV; SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2017)
GAPDH	F: TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	NCBI Reference Sequence: NM_001289726.2
	R: GTTCACACCCATCACAAACA	

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reações de PCR e RT-qPCR.

4.6 Seleção de fagos recombinantes por *biopanning*

Promastigotas metacíclicas foram selecionadas por meio de gradiente de densidade de Ficoll, com algumas adaptações no protocolo descritos por Spath and Beverley (2001). Essa técnica foi utilizada para separar diferentes formas de *Leishmania* com base em suas densidades celulares específicas (SPÄTH; BEVERLEY, 2001). A partir de uma cultura com 7 a 8 dias de crescimento, realizamos a seleção das formas metacíclicas. Em um tubo Falcon de 15 mL, adicionamos cuidadosamente 4 mL de Ficoll a 10%. Em seguida, depositamos a suspensão de *Leishmania* sobre essa camada de Ficoll, obedecendo às orientações de densidade celular.

Procedemos à centrifugação diferencial a 1300g por 10 min (SPÄTH; BEVERLEY, 2001). Após essa etapa, realizamos a análise das fases obtidas. Fixamos as formas promastigotas em lâminas e as coramos com *Giemsa*, examinando as diferentes formas celulares por microscópio óptico. Confirmamos a predominância das formas metacíclicas por meio da contagem de pelo menos 300 parasitas (SERAFIM; FIGUEIREDO; COSTA; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2012). A Figura 3, exemplifica o processo de contagem e análise das formas de *Leishmania* obtidas pela seleção via Ficoll. Para tal processo, avaliamos as imagens de microscopia óptica e comparamos o tamanho do corpo e flagelo dos parasitas, medidos via o programa *ImageJ*, para determinar qual forma estava sendo observada.

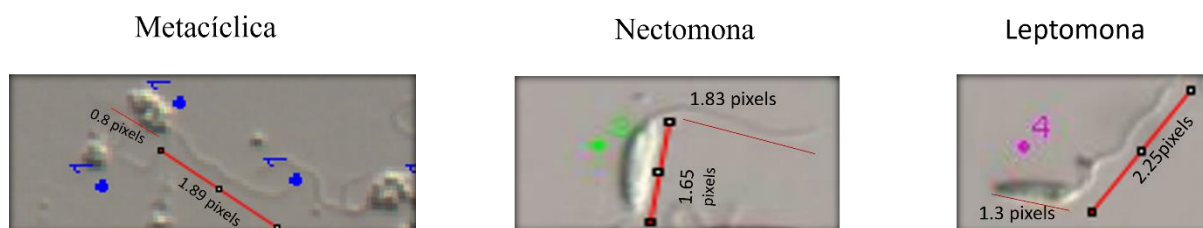


Figura 3: Formas de *Leishmania* obtidas por meio de seleção por Ficoll, que foram posteriormente analisadas utilizando imagens de microscopia óptica e contadas utilizando o programa *Image J*.

Para a seleção de fagos recombinantes por *biopanning*, 1×10^9 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*, *L. mexicana* ou *L. infantum* foram lavadas duas vezes por centrifugação a 5000 xg por 5 min, descartamos o sobrenadante e o *pellet* ressuspendido em 100 μ L de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , CaCl_2 , HEPES, pH 7,4). Em seguida, foi adicionado à suspensão de parasitas 1×10^{11} fagos em 100 μ L de PBS, seguido de incubação por 30 min à temperatura ambiente, com homogeneização gentil a cada 5 min. Para remoção dos fagos livres ou aqueles fracamente ligados aos parasitas, procedeu-se 5 etapas de lavagem pela centrifugação da suspensão fagos:parasitas a 8000 x g por 3 min, remoção do sobrenadante, seguida de adição de PBS 1X.

Após esta etapa, foi adicionado ao *pellet* contendo fagos:parasitas uma suspensão de bactéria K91 ($\text{DO}_{600}=1$) para volume final de 300 μ L. Essa suspensão foi incubada por 15 min a 37°C em banho-maria. Após isso, realizou-se diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ...) da mistura parasitas:fagos:bactérias. Para determinar a concentração determinou-se a unidade formadoras de placas (PFU). Para isso, 1 μ L de cada diluição foi transferida para 200 μ L de bactérias K91 ($\text{DO}_{600}=1$), seguido por incubação em banho-maria a 37 °C por 15 min. Posteriormente, foram adicionados a essa mistura 4 mL de Bacto agar 0,3% (DIFCO) pré-aquecido a 37°C. Tal mistura foi plaqueada em meio LB com 10 mg/mL de tetraciclina. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C e posteriormente analisadas quanto ao número de colônias obtidas (PFU/mL).

4.7 Titulação dos fagos recombinantes selecionados

Após a contagem das colônias resistentes à tetraciclina (PFU/ μ L) para cada diluição, foi possível quantificar o número total de fagos recombinantes (PFU em 300 μ L) recuperados, determinando-se a proporção entre o número de fagos recombinantes recuperados (e que se ligaram à superfície do parasita) e o número de fagos recombinantes iniciais (1×10^{11}).

4.8 Amplificação dos fagos recombinantes

A amplificação dos fagos recombinantes se deu em sete etapas:

Etapa 1: Ressuspensão das Colônias. Após o *biopanning*, cada colônia bacteriana resistente à tetraciclina isolada foi ressuspendida em 40 μ L de PBS.

Etapa 2: Confirmação da Infecção por PCR. A confirmação da infecção foi realizada por PCR utilizando o master mix *Platinum Green (Invitrogen)* e os *primers Forward* 5'CTTGTTTCCTATGCTATCGTTT e *Reverse* 5'CTGAAGAGAGTCAAAAG (Tabela 1).

- **Desnaturação Inicial:** 95 °C por 4 min.
- **Ciclo de Amplificação:** 95 °C por 45 segundos para desnaturação, seguido por 55 °C por 45 segundos para anelamento, e 72 °C por um min para extensão. Este ciclo foi repetido 35 vezes.

Etapa 3: Inoculação e Recultivo. Após a confirmação da infecção, 1 μ L da suspensão foi inoculado em 5 mL de LB com tetraciclina (10 mg/mL). Essa mistura foi incubada *overnight* 37°C sob agitação constante de 140 rpm e recultivada.

Etapa 4: Obtenção do DNA Plasmidial. Para a obtenção do DNA plasmidial, foi realizada uma miniprep com o kit *GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific)*, seguindo as especificações do fabricante.

Etapa 5: Sequenciamento do DNA Plasmidial. O DNA plasmidial obtido foi sequenciado com o *primer reverse* pela empresa GRCF – Genetic Resources Core Facility.

Etapa 6: Análise das Sequências e Frequência. As sequências foram analisadas utilizando o programa Chromas Lite (Technelysium, Queensland, Austrália), BLAST (ALTSCHUL; GISH; MILLER; MYERS *et al.*, 1990) e CLUSTAL OMEGA (MCWILLIAM; LI; ULUDAG; SQUIZZATO *et al.*, 2013)

Etapa 7: Estoque e Conservação. Para estoque e conservação das colônias recombinantes, as bactérias de interesse são mantidas em meio LB com 15% de glicerol (v/v) e armazenadas a -80 °C.

4.9 Purificação de bacteriófagos

Para purificação de fagos recombinantes, realizou-se centrifugação inicial a 10 000 xg por 30 min à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e combinado em igual proporção com uma solução de polietileno glicol (PEG) 8000 a 16% (p/v) em 0,5N de NaCl, mantido em temperatura de 4 °C por 24 h. Após a precipitação, os fagos foram coletados por centrifugação a 13500 xg por 30 min à 4 °C. O *pellet* foi ressuspendidos em PBS e acrescido de 8% de DMSO. Finalmente, foi realizada titulação para determinar a concentração do número de partículas de fagos recombinantes funcionais capazes de transdução (TU- *transducing unit*).

4.10 Teste de imunofluorescência IFA ou “*Binding Assay*”

Os parasitas foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS por 24 h e, em seguida, bloqueados com 4% BSA (albumina sérica bovina) por 1 h. Então, estes foram incubados com os fagos recombinantes previamente selecionados pelo método de *biopanning*. Utilizamos uma concentração de 2×10^6 PFU/ μ L fagos recombinantes ou peptídeos sintéticos biotinizados na concentração de 0.2 mg/mL. Após tripla lavagem com PBS, os parasitas foram incubados com o anticorpo anti-M13 5 μ g/ml (gentilmente cedido pelo grupo do Dr. Marcelo Jacobs-Lorena), diluído a 1/1000 e incubado por 2 h a temperatura ambiente. Após nova lavagem tripla com

PBS, os parasitas foram incubados com anti- IgG *Alexa Fluor 488* (absorção 496 nm e emissão 519 nm) ou quando peptídeo, estreptavidina *Alexa Fluor 594* (absorção 590 nm e emissão 617 nm) por 1 h. A utilização dos fluoróforos (*Alexa Fluor 488* e *Alexa Fluor 594*) permitiu a localização de fluorescência nas regiões de interação entre a superfície da *Leishmania* com fagos recombinantes (*Alexa Fluor 488*) ou peptídeos sintéticos (*Alexa Fluor 594*). Para análise em microscopia de fluorescência ou confocal, utilizou-se o reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, de acordo com especificações do fabricante.

4.11 Determinação da taxa de infecção em macrófagos diferenciados

Antes de realizar os experimentos de infecção, os parasitas *L. amazonensis*, *L. infantum* ou *L. mexicana* foram previamente incubados com 5 mM do CFSE - éster succinimidílico da carboxifluoresceína- Thermo Fisher Scientific; C34554) por 20 min e depois lavados com PBS 1% FBS. Em seguida, os parasitas foram ressuspensos em meio RPMI 1640 (Sigma) e 1×10^5 parasitas totais foram incubados com fagos recombinantes (testados nas concentrações de $2 \times 10^8/\mu\text{L}$ ou $5 \times 10^8/\mu\text{L}$). Para os testes com peptídeos sintéticos, o mesmo procedimento foi realizado e 0.5 mg/mL do peptídeo sintético foi adicionado a um *monolayer* de células de macrófagos.

Para a infecção, escolhemos a proporção de 5 parasitas para 1 macrófago como condição de infecção. Realizamos testes de infecção em diferentes intervalos de tempo e, após análise, padronizamos o período de infecção em 2 h. Todas as infecções foram conduzidas a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as lâminas foram cuidadosamente lavadas com PBS para remover os parasitas livres, seguido da fixação com paraformaldeído 4%. Para determinar o tempo de infecção mais apropriado, realizamos uma análise cinética, na qual observamos a quantidade de parasitas internalizados ao longo de intervalos de tempo de 2, 4 e 8 h após a infecção em teste de tempo de curso (*Time Course Assay*). Com base nessa análise, concluímos que o período de 2 h era ideal para avaliar o impacto dos fagos recombinantes e dos peptídeos nas diferentes espécies de *Leishmania*, uma vez que não observamos uma diferença significativa na taxa de infecção entre as diferentes espécies nesse período.

Para determinar a taxa de infecção, efetuamos a contagem de parasitas que aderiram às células e aqueles que foram internalizados como definido abaixo:

$$\text{Taxa de Infecção} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de parasitas nos 100 campos} - \text{N}^\circ \text{ total de parasitas do controle}}{\text{N}^\circ \text{ total de parasitas do controle} \times 100}$$

Essa avaliação foi realizada utilizando microscopia de fluorescência, na qual contabilizamos o número de parasitas corados com CFSE que estivessem internalizados e aderidos em macrófagos presentes em 100 campos de visão, com um aumento de 600 vezes. Essa abordagem nos permitiu quantificar a infecção em diferentes intervalos de tempo e entender como o processo se desenvolve nas fases iniciais da infecção.

4.12 Avaliação da interação de peptídeos aos parasitas por microscopia confocal

Para avaliar a especificidade dos peptídeos sintéticos, formas selecionadas de promastigotas metacíclicas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min e incubadas com 2% BSA por 30 min. Posteriormente, as células foram incubadas com 0,20 mg/mL de peptídeo *overnight*. Após lavagens, os peptídeos foram detectados pela incubação com estreptavidina *Alexa Fluor 488* (Thermo Fisher Scientific). Em paralelo, a fluorescência do peptídeo ligado foi observada por microscopia confocal. Para isso, utilizamos o reagente *ProLong Gold antifade (Invitrogen)*.

4.13 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* após tratamento com peptídeos sintéticos

Fêmeas BALB/c (entre 5 e 7 semanas de idade) foram infectadas intraperitonealmente com 1×10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* previamente incubados com 0.2 mg/mL dos peptídeos La1, Li1, e Li1_{SCR} por 10 min em temperatura ambiente. Os grupos experimentais contendo 3 camundongos foram G1, G2, e G3 infectados com os peptídeos La1, Li1, e controle negativo Li1_{SCR}, respectivamente. Ao final de 30 dias pós-infecção, os animais foram sacrificados seguindo as normas do comitê de ética da *Johns Hopkins University*, aprovado no Protocolo MO21H18, e do Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). O fígado e baço foram removidos para a quantificação da carga

parasitária por PCR em tempo real. Este experimento foi realizado quatro vezes de maneira independente, totalizando doze camundongos em cada um dos três grupos analisados.

4.14 Determinação da Carga Parasitária RT-qPCR

Preparação das Amostras e Extração de RNA

Para avaliar a carga parasitária, empregamos o método de RT-qPCR. Inicialmente, extraímos o RNA dos tecidos coletados dos camundongos do teste *in vivo*, como fígado e baço. As amostras foram maceradas e o RNA extraído utilizando o TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. O *pellet* de RNA foi dissolvido em água tratada com DEPC graduado. Avaliamos a qualidade do RNA por eletroforese em gel, e sua quantidade foi mensurada por espectrofotometria *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) e armazenada a -80 °C até o uso.

Síntese de DNA Complementar

Como também descrito na Tabela 2, realizamos a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de 5 µg do RNA total, utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen) com hexâmeros aleatórios (Invitrogen). O cDNA resultante foi tratado com RNase H (New England Biolabs) e, finalmente, quantificado e armazenado a -20 °C para as análises de RT-qPCR. A condição de ciclagem também se encontra resumida na Tabela 3.

Reagentes	Volume and concentração	Função
Total RNA	7 µl (5 µg)	Template de RNA a ser transcrita
dT primer	1 µL (2.5 µm)	Primer para iniciar a síntese de cDNA
Hexâmeros aleatórios (Invitrogen)	2 µL (60 µM)	Primers para iniciar a síntese de cDNA de maneira não específica
cDNA mix		
RNase inhibitor 40 Units/	1 µL (20 U)	Protege o RNA de degradação por RNase

5x RT Buffer (Invitrogen)	4 μ L	Fornecer condições ideais para a atividade da enzima
dNTP (10 mM)	1 μ L (1 mM)	Monômeros de nucleotídeos (A, G, C, T) para a síntese do cDNA
DTT 0,1 mM (Invitrogen)	1 μ L (1 mM)	Agente redutor que ajuda a proteger a enzima reversa transcriptase
Superscript III (Invitrogen) 200 U/ μ L	1 μ L (10 U)	Enzima que realiza a transcrição reversa do RNA em cDNA
DEPC H ₂ O		Água estéril e livre de contaminantes

Tabela 2: Componentes da síntese de cDNA

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Reação
37	30	Anelamento dos primers
65	10	Síntese de cDNA
70	12	Inativação da enzima

Tabela 3: Condições de Ciclagem da Síntese de cDNA.

Quantificação por PCR em Tempo Real e Análise

Cada reação de RT-qPCR consistiu em 10 μ L da mistura de Master SYBR Green 1x, 2 μ L de 100 pmol de cada primer (*forward* e *reverse*) e 1 μ L de uma amostra de cDNA com 5 ng. Controle negativos não receberam cDNA. As amplificações tiveram uma desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos seguido por 56 °C por 30 segundos para anelamento, e 68 °C por 5 min para extensão. As amostras foram realizadas em triplicata. Após a finalização da amplificação, calculamos a carga parasitária por quantificação relativa, comparando a expressão de um gene na amostra em estudo com uma amostra de referência (controle), permitindo comparações entre diferentes condições experimentais. No caso, a amostra controle consistiu em camundongos infectados com parasitas tratados com o peptídeo sintético Li1_{SCR}, que, em testes *in vitro*, não inibiu a internalização dos parasitas. Os dados de C_q (quantificação de ciclo) e temperatura de fusão (T_m) foram expressos como a média \pm desvio padrão com base em três medições, e a quantificação relativa foi realizada pelo método $\Delta\Delta C_{qt}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores de C_q para o gene de referência (GAPDH) foram usados para normalizar os dados.

Após determinar o ΔC_t das amostras, utilizamos valores do cDNA de *L. infantum* tratado com Li1_{SCR} como referência.

Além disso, para garantir a precisão da quantificação, realizamos a construção de uma curva-padrão utilizando diluições seriadas de 10 vezes do cDNA do gene, obtido a partir das amostras de *L. infantum*. Essas diluições abrangeram uma ampla faixa de concentrações.

Amplificação por PCR em Tempo Real

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada usando o termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Utilizamos *SYBR Green* para monitorar a amplificação das amostras. As reações foram preparadas em um volume final de 20 μ L, com os seguintes componentes:

- **SYBR Green PCR Master Mix (2X):** Contendo tampão de reação, dNTPs, MgCl₂ e *Taq DNA Polymerase*.
- **1 μ L de cDNA template:** Obtido após a síntese de DNA complementar.
- **0,5 μ L de cada primer (10 μ M):** Oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene L-asparaginase.
- **Água livre de nuclease (DEPEC) para completar o volume total.**

As reações foram preparadas em triplicata para minimizar a variabilidade técnica. O termociclador foi programado conforme as seguintes condições:

- **Desnaturação Inicial:** 95 °C por 2 min.
- **Ciclo de Amplificação:** 95 °C por 30 segundos para desnaturação, seguido por 56 °C por 30 segundos para anelamento, e 68 °C por 5 min para extensão. Este ciclo foi repetido por 40 ciclos.

A fluorescência foi monitorada durante cada ciclo de amplificação e os valores de Ct foram registrados para posterior análise.

4.15 Análise estatística

Os resultados foram analisados como média \pm desvio padrão utilizando o programa estatístico *Prism 8.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Para as análises estatísticas, empregamos os testes de Mann-Whitney para comparar a taxa de inibição de infecção de cada grupo com o grupo de controle.

5 Resultados e Discussão

5.1 Identificação de fagos recombinantes com afinidade por *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. infantum*

O sucesso do estabelecimento da infecção por *Leishmania*, bem como para outros parasitas intracelulares obrigatórios, como o *Trypanosoma cruzi*, o *Plasmodium* spp. E o *Toxoplasma gondii*, depende fundamentalmente das complexas interações que ocorrem entre o parasita e as células hospedeira (HORTA; ANDRADE; MARTINS-DUARTE É; CASTRO-GOMES, 2020). Uma compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo crítico de adesão e internalização desempenha um papel de destaque, pois nos permite identificar alvos potenciais para terapias, desenvolver marcadores de diagnóstico precisos e criar estratégias eficazes para o desenvolvimento de vacinas.

Atualmente, além de técnicas genéticas avançadas como Crispr-Cas9, RNAi e das abordagens bioquímicas incluindo imunoprecipitação, purificação, UV-crosslinking e fracionamento, a utilização de bibliotecas combinatórias de peptídeos possibilita a seleção e identificação de peptídeos ligantes de receptores ou proteínas de superfície envolvidos no processo de interação parasita-hospedeiro, bem como aqueles reconhecidos por células T e B (PALMA, 2023). Isso, demonstra, um considerável potencial tanto em pesquisas básicas quanto em aplicações práticas (Wu, Liu et al. 2016). Tal potencial se manifesta na identificação de peptídeos capazes de reconhecer epítomos para células B ou interromper o processo de invasão de *Plasmodium* ou *Trypanosoma cruzi* (Cha, Kim et al. 2021, Guo, Liu et al. 2021; de Paula et al 2022).

As bibliotecas de peptídeos consistem em um grande número de peptídeos, cujas sequências foram geradas de forma aleatória variando os resíduos de aminoácidos em cada posição. Nas bibliotecas peptídicas construídas em bacteriófagos (*Phage Display Peptide Library*), os peptídeos gerados também apresentam resíduos fixos para atender a certas condições de restrição e estruturas secundárias, incluindo *loops* formados por pontes dissulfeto (O'Neil. Et al 1992; Felice et al. 1993) ou estrutura em alfa-hélice (Rebar e Pabo, 1994; Wu et al. 1995).

Nas próximas seções detalharemos o processo de identificação de fagos recombinantes com afinidade às superfícies de três espécies de *Leishmania* pela técnica de *phage display*, bem como os experimentos necessários para confirmar qualitativamente a interação fago-*Leishmania* e confirma a capacidade de tais fagos em reduzir a taxa de infecção da *Leishmania* em macrófagos. Essa abordagem se destaca como altamente promissora para avaliar interações de proteínas, selecionar ligantes, caracterizar receptores em células alvo e desenvolver sistemas de entrega de drogas mediados por peptídeos (WU; LIU; LU; WU, 2016). Em especial, *phage display* tem sido empregada no estudo da biologia dos tripanossomatídeos], mais especificamente na caracterização de ligantes de superfície responsáveis pela interação entre forma infectante e célula hospedeira de mamíferos em espécies como *Trypanosoma cruzi* (DE PAULA; LOPES-TORRES; JACOBS-LORENA; PAES *et al.*, 2022). Além dos tripanossomatídeos, essa abordagem também é frequentemente empregada para investigar como os protozoários do grupo apicomplexa interagem com as células hospedeiras. Um exemplo notável é o estudo da interação entre o ligante GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) encontrado nos esporozoítos desses protozoários e o receptor glicoproteína intracelular de 110 kDa presente nas células de Kupffer do hospedeiro humano (CHA; KIM; PANDEY; JACOBS-LORENA, 2016; CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015).

5.2 Biopanning ou seleção por afinidade permitiu a seleção de três peptídeos capazes de interferir na internalização de *Leishmania* em macrófagos

A metaciclogênese é um processo fundamental na biologia de parasitas como a *Leishmania* e outros tripanossomatídeos. Esse processo engloba a transformação das formas promastigotas (não infecciosas) em formas metacíclicas (infecciosas), que, uma vez internalizadas, podem promover o estabelecimento da infecção (DA SILVA; SACKS, 1987; SUNTER; GULL, 2017). Para compreender as mudanças essenciais que ocorrem na *Leishmania* durante a metaciclogênese, é essencial a utilização de técnicas que nos permitam selecionar as formas metacíclicas (DA SILVA; SACKS, 1987).

Dessa forma, a técnica de separação Ficoll é amplamente utilizada para selecionar as formas metacíclicas infectiva (MOREIRA; SANTARÉM; LOUREIRO; TAVARES *et al.*,

2012; YAO; CHEN; SUDAN; DONELSON *et al.*, 2008). Realizamos a seleção das formas metacíclicas na fase estacionária de crescimento (Figura 9) de acordo com o protocolo desenvolvido por Späth e Beverley (2001).

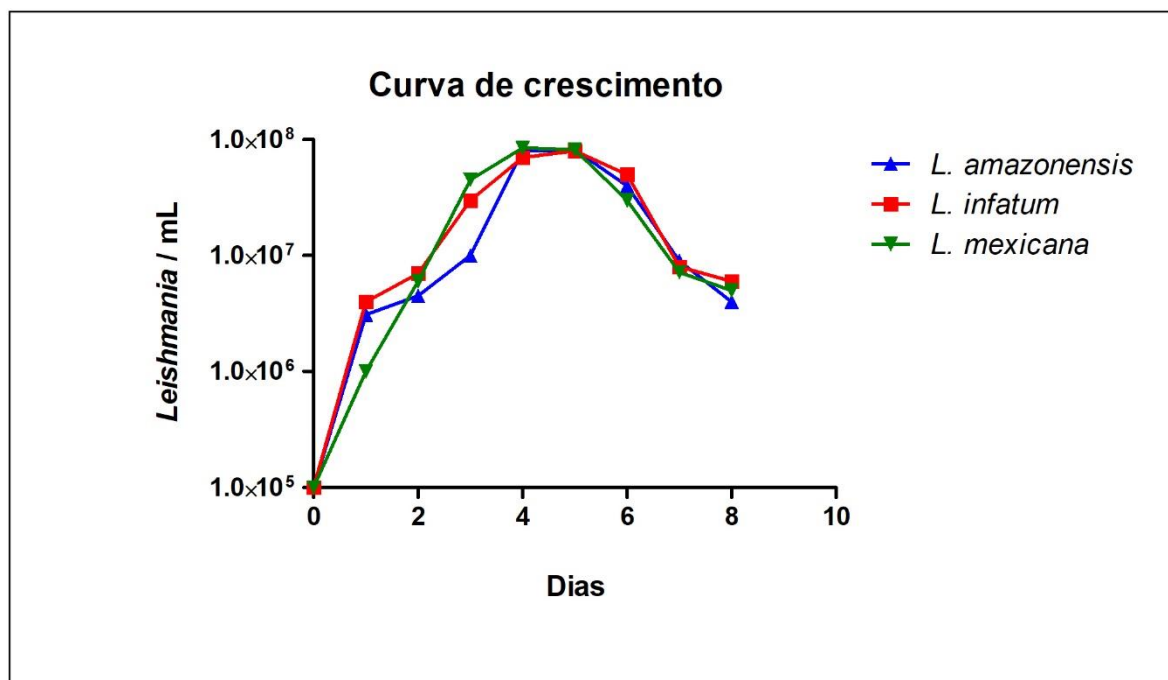


Figura 4: Curva de crescimento ao longo de um período de 8 dias. O ensaio foi conduzido para as espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, utilizando a câmara de Neubauer e uma número inicial de 1×10^5 parasitas/mL.

Após a seleção de uma população selecionada de promastigotas metacíclicas, uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ da fase de 10% Ficoll foi fixada e corada com Giemsa para análise morfológica. Essa análise teve como base a relação entre o tamanho do corpo do parasita e o tamanho do flagelo (SUNTER; GULL, 2017). A contagem foi realizada utilizando o programa *ImageJ*, com pelo menos 300 parasitas de cada espécie analisados. Nas três espécies, a porcentagem de metacíclicas superou 70%. As formas parasitárias que exibiram um flagelo com o dobro do tamanho do corpo foram classificadas como metacíclicas, como ilustrado na Figura 3, na qual o corpo da metacíclica mediu 0,8 pixels e o flagelo 1,89 pixels (SUNTER; GULL, 2017). A centrifugação diferencial foi realizada com o objetivo de aumentar a quantidade de parasitas em sua forma infectiva antes de prosseguirmos com o *biopanning* (DA SILVA; MORATO; QUIXABEIRA; PEREIRA *et al.*, 2015).

Após a obtenção das formas metacíclicas, realizamos quatro *rounds* de *biopanning* para *L. amazonensis* e, cinco *rounds*, para a *L. mexicana* e *L. infantum*, para a selecionar fagos recombinantes enriquecidos, ou seja, com alta afinidade para as formas metacíclicas. Foi necessária a realização de um *round* adicional para *L. infantum* e *L. mexicana*, já que quatro *rounds* não foram suficientes para obtenção de fagos recombinantes de interesse (Figura 5 e discussão de matrizes de similaridade nas Figuras 6 a 8). No primeiro *round*, incubamos fagos recombinantes e parasitas na proporção de 100:1 ou seja ($10^{11}:10^9$), seguido de rigorosas lavagens com PBS para remoção dos fagos não ligados aos parasitas. Para recuperação dos fagos com afinidade para as promastigotas metacíclicas, após cada *round* de seleção, os fagos que permaneceram ligados foram eluídos com bactérias *K91* para amplificação destes (*output*). O número de colônias resistentes (TU) foi determinado, com base na relação entre os fagos recuperados e o número inicial de fagos recombinantes (input), Figura 5.

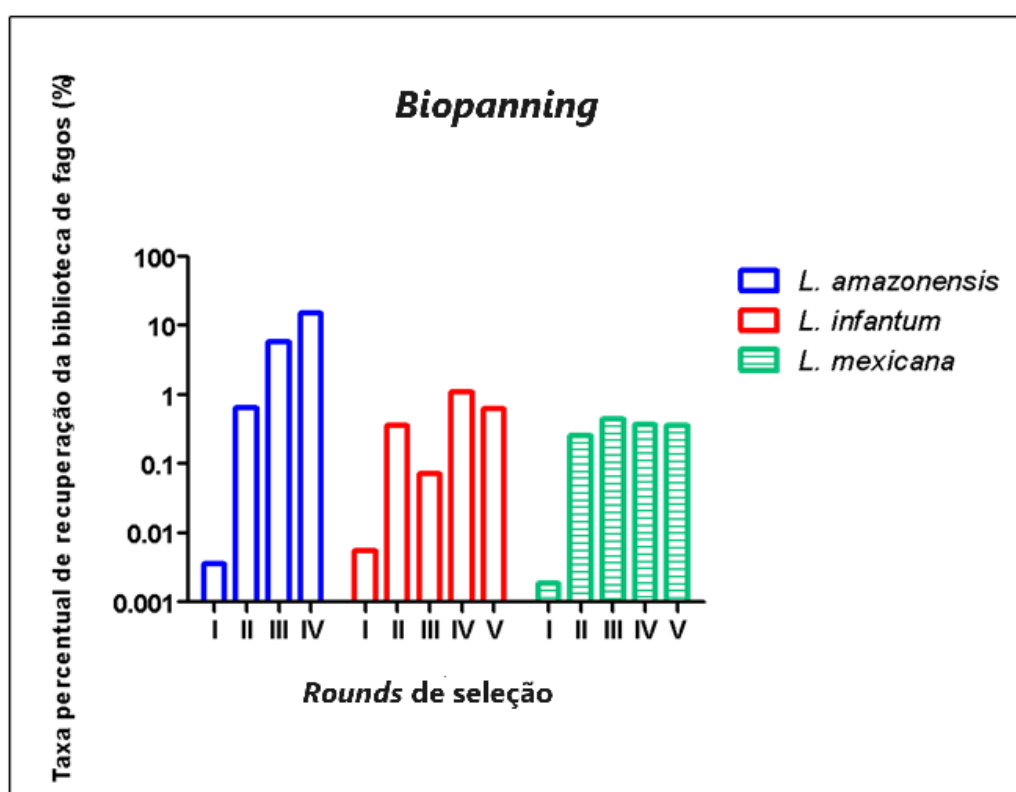


Figura 5: Enriquecimento de fagos recombinantes com afinidade para promastigotas metacíclicas após quatro (I a IV) ou cinco (I a V) *rounds* de seleção frente às espécies *L. amazonensis* (azul), *L. infantum* (vermelho) e *L. mexicana* (verde). Calculamos a razão

output/input, onde “*output*” corresponde ao número de fagos recombinantes recuperados após *biopanning* e “*Input*”, concentração inicial de fagos utilizados 10^{11} .

Como pode ser observado na Figura 5, o número de fagos recuperados frente a *L. amazonensis* aumentou até 10% após o *biopanning* no quarto *round*, enquanto a taxa de recuperação para *L. infantum* e *L. mexicana* ao longo de cinco *rounds* permaneceu próximo de 1% (Figura 5). A inclusão de um *round* extra para *L. mexicana* e *L. infantum* se deu devido à baixa recuperação observada até o quarto *round* e o baixo nível de enriquecimento observado nas matrizes de similaridade para o terceiro e quartos *rounds* com tais espécies (Figuras 6 e 7). A partir do terceiro *round* de *biopanning*, o perfil dos fagos selecionados foi avaliado por sequenciamento (Figura 6-8). Para isso amplificamos os fagos obtidos, selecionando aleatoriamente 32 colônias bacterianas tetraciclina resistente, seguido de amplificação e sequenciamento de um fragmento de DNA de 120 pb. As sequências peptídicas preditas foram posteriormente analisadas utilizando o programa Chroma Lite. Para a análise de frequência utilizamos o programa *Clustal Omega multi Sequence alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) (MCWILLIAM; LI; ULUDAG; SQUIZZATO *et al.*, 2013), esse programa alinha as sequências peptídicas por níveis de similaridade, mostrando a frequência com que sequências idênticas aparecem.

Para a *L. amazonensis*, foram identificados os clones B1 e C1, com frequência de 9,6% e 6,4%, respectivamente Figura 6. No entanto, quando avaliamos as sequências obtidas dos fagos recombinantes a partir de *L. infantum* e *L. mexicana*, observamos uma baixa similaridade (< 40%) e a ausência de um enriquecimento significativo. Realizamos novos *rounds* de seleção, e sequenciamento do DNA de 48 colônias para *L. infantum* e *L. mexicana* demonstrada em uma matriz de similaridade, Figura 8.

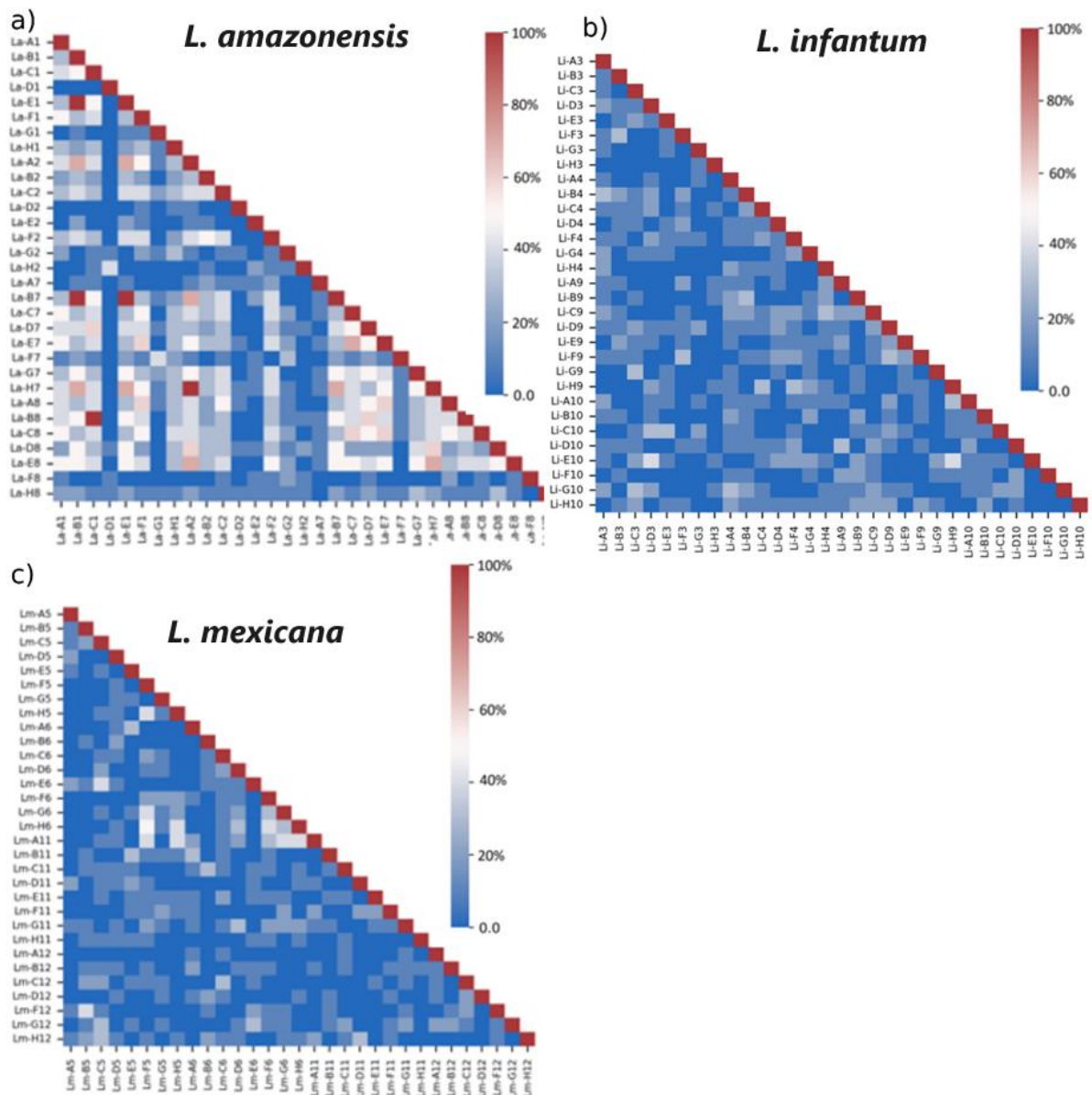


Figura 6: Matriz de similaridade representada em termos percentuais do enriquecimento de seqüências de peptídeos preditas via sequenciamento. A matriz compara a composição e a posição dos aminoácidos entre todos os fagos recombinantes sequenciados do terceiro *round* de seleção. Os quadrados indicam uma similaridade de 100% entre duas seqüências, enquanto o azul intenso representa 0% de similaridade, sendo que a cor branca indica casos em que 50% dos aminoácidos são similares. As figuras a), b) e c) apresentam a matriz de similaridade após a terceira rodada de seleção para *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente.

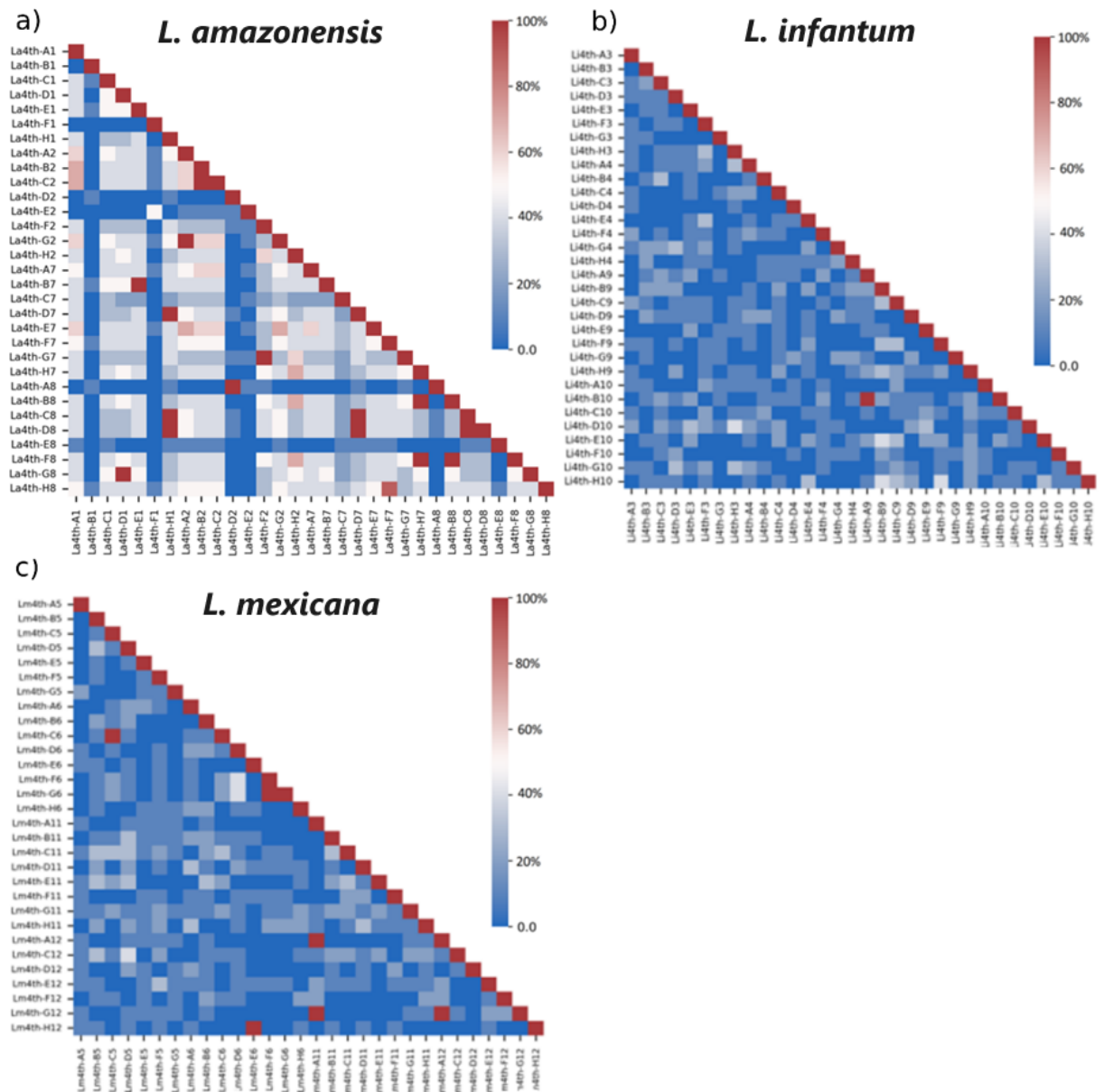


Figura 7: Matriz de similaridade representada em termos percentuais do enriquecimento de seqüências de peptídeos preditas via sequenciamento. A matriz de similaridade baseada na análise de posição e composição de aminoácidos entre todos os fagos recombinantes sequenciados do quarto *round* de seleção. Os quadrados indicam uma similaridade de 100% entre duas seqüências, enquanto o azul intenso representa 0% de similaridade, sendo que a cor branca indica casos em que 50% dos aminoácidos são similares. As figuras a), b) e c) apresentam a matriz de similaridade após a quarta rodada de seleção para *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente.

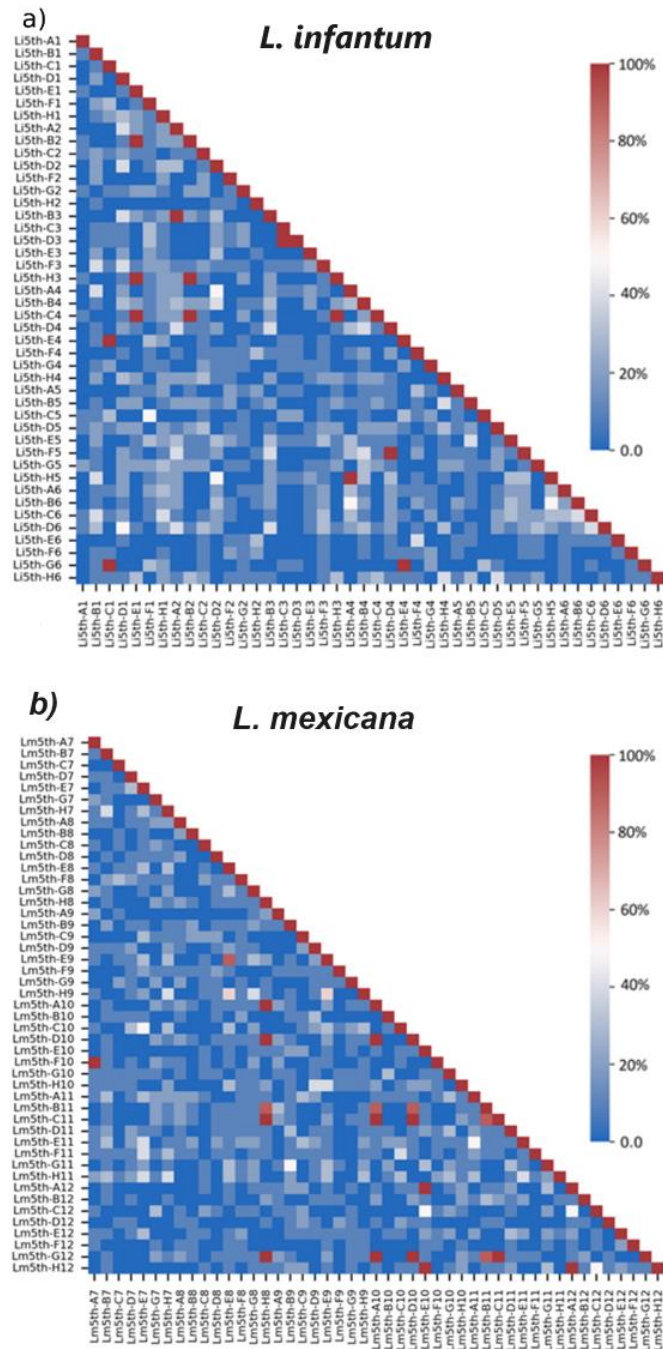


Figura 8: Matriz de similaridade representada em termos percentuais do enriquecimento de seqüências de peptídeos previstas via sequenciamento. A matriz compara a composição e a posição dos aminoácidos entre todos os fagos recombinantes sequenciados do quinto *round* de seleção. Os quadrados indicam uma similaridade de 100% entre duas seqüências, enquanto o azul intenso representa 0% de similaridade, sendo que a cor branca indica casos em que 50% dos aminoácidos são similares. As figuras a) e b) apresentam a matriz de similaridade após a quinta rodada de seleção para *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente.

A análise de todas as sequências peptídicas obtidas após o 4 ou 5 *rounds* para as espécies em estudo culminou na identificação de três fagos recombinantes mais frequentes, nomeados aqui como H1, A9 e E1. As sequências peptídicas e suas respectivas frequências de aparecimento em cada *round* de seleção estão descritas na Figura 9a. Adicionalmente, utilizou-se o programa MEME (<https://memesuite.org/meme/tools/meme>) (BAILEY; BODEN; BUSKE; FRITH *et al.*, 2009), para análise da composição e posição do aminoácidos de cada candidato, para identificação possíveis enriquecimentos, Figura 9b) e c). Tal processo foi realizado para todos os *rounds* de seleção e espécies de *Leishmania*. Na Figura 9b) e c), apresentamos os resultados apenas para o quarto *round* de *L. amazonensis*, que apresentou o maior enriquecimento de aminoácidos na maioria dos fagos recombinantes sequenciados.

Fagos recombinantes cujas sequência peptídicas são idênticas e com alta frequência de aparecimento, podem representar sequências com alta afinidade por um ligante no processo de *biopanning*, sendo os critérios adotado para a seleção dos candidatos. De acordo com as análises realizadas, não foi identificada uma sequência comum as três espécies. Para a *L. amazonensis* verificou-se um enriquecimento desde o terceiro *round* em relação com as outras espécies. Verificamos o perfil de enriquecimento das sequências obtidas e observamos que no quarto *round* para *L. amazonensis* e 75% das sequências apresentam um resíduo de arginina e dois de triptofano nas posições 3, 5 e 6, respectivamente. A maior frequência para os peptídeos selecionados para *L. infantum* e *L. mexicana* foi de 6.9% e 10% respectivamente.

Quando analisamos o perfil de enriquecimento via as matrizes de similaridade do quarto *round* para *L. infantum* e *L. mexicana* em comparação com *L. amazonensis*, percebemos que as duas primeiras espécies não apresentam uma quantidade significativa de sequências peptídicas que se repetem, ou mesmo uma quantidade grande de sequências com pelo menos uma similaridade de mais que 50 %. Sendo assim, realizamos um quinto *round* de seleção para *L. infantum* e *L. mexicana*. No quinto *round*, notamos um aumento significativo no enriquecimento de candidatos para *L. infantum*, representando uma frequência de 8.7%, ou seja, quatro sequências idênticas em 46. No entanto, para *L. mexicana*, não observamos um aumento no enriquecimento, sugerindo a necessidade de realizar outro *round* de seleção ou até mesmo recomeçar o *biopanning*.

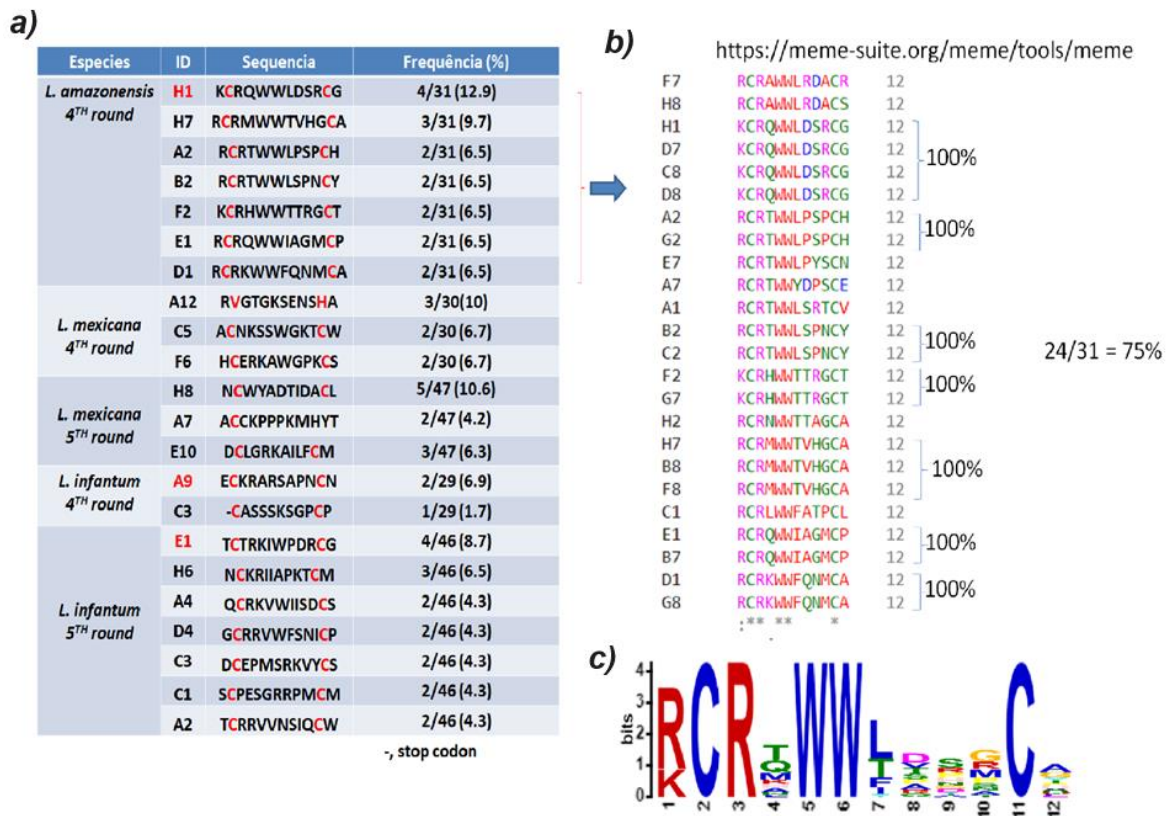


Figura 9: Principais sequências peptídicas previstas e obtidas após 4^o ou 5^o round em promastigota metacíclicas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*. A biblioteca de fagos utilizada possui resíduos de cisteína fixos na posição 2 e 11, o que facilita a predição de sua sequência. Todos os clones listados (A) foram obtidos por sequenciamento e analisados utilizando o programa *Chromas Lite*. Os fagos recombinantes selecionadas, H1, E1 e A9, estão indicados em vermelho, foram escolhidos por serem os mais frequentes entre os clones sequenciados. Também realizamos estudos adicionais com o fago A12, específico de *L. mexicana*. O fago recombinante C3 é o controle negativo, em função da presença de um códon de parada. A análise da frequência e similaridade das sequencias foi realizada através do programa *Clustal Omega multi Sequence alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/clusterw/index.html>), e a comparação da composição e posição dos aminoácidos dos peptídeos para *L. amazonensis* indicada em B) e C) e foi analisado com a ferramenta MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), indicando o enriquecimento de aminoácidos como uma arginina e dois triptofanos nas posições 3, 5 e 6 respectivamente. Essa composição representa 75% (24) entre os candidatos obtidos para *L. amazonensis* (31).

Desta forma, as análises qualitativas realizadas fornecem informações não apenas sobre o enriquecimento de determinadas sequências, mas também sobre a composição e posição dos

12 aminoácidos, bem como a frequência com que ocorrem. Utilizamos essas tendências como indicativo de quais clones seriam interessantes para avaliações adicionais utilizando outras estratégias como por exemplo ensaios de imunofluorescência (IFA, *ImmunoFluorescence Assay*) para avaliar a afinidade das sequências peptídicas dos fagos recombinantes em relação à superfície do parasita (*binding assay*), e ensaios para verificar se os fagos selecionados também são capazes de inibir a internalização de promastigotas metacíclicas em macrófagos (inibição de taxa de infecção).

5.3 Fagos recombinantes: Inibição da infecção por *Leishmania* em macrófagos e interação com a superfície das *Leishmania*

Testes de IFA ou *binding assay* utilizando clones de fagos recombinantes

O teste de IFA é amplamente utilizado para detectar a interação antígeno-anticorpo (CHA; KIM; NA; JACOBS-LORENA, 2021; CHA; KIM; PANDEY; JACOBS-LORENA, 2016; CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015; DE PAULA; LOPES-TORRES; JACOBS-LORENA; PAES *et al.*, 2022). Neste trabalho, utilizamos primeiramente a microscopia de fluorescência para determinar qualitativamente a existência de interação entre os fagos recombinantes selecionados e as superfícies de MPs de diferentes espécies de *Leishmania*, baseado na intensidade e localização da fluorescência. Para esses ensaios, as formas metacíclica das espécies em análise foram fixadas a 4°C em paraformaldeído 4% em PBS *overnight*.

Utilizamos 2×10^6 PFU/ μ l de fagos recombinantes H1, A12 e A9 ressuspendidos em PBS, que foram incubados *overnight* na presença de 1×10^9 parasitas (Figura 10). Nesse estudo, utilizamos como controles negativos PBS, fagos M13 WT (*Wild Type*) e C3. A seleção nesse momento pelos fagos recombinantes H1, A12 e A9, se deu, pois, foram os fagos mais frequentes no quarto *round* de *biopanning* para as espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. infantum*, respectivamente. Outros fagos de interesse, H8, E1, C5 e F6 (vide Figura 9) foram avaliados com os testes de redução da taxa de infecção *in vitro*, como discutido na próxima seção.

Os fagos recombinantes demonstraram interação mais evidente com as espécies das quais foram isolados. Não foi observada fluorescência de fundo significativa nos controles, incluindo o fago recombinante C3 e em WT (*wild type*).

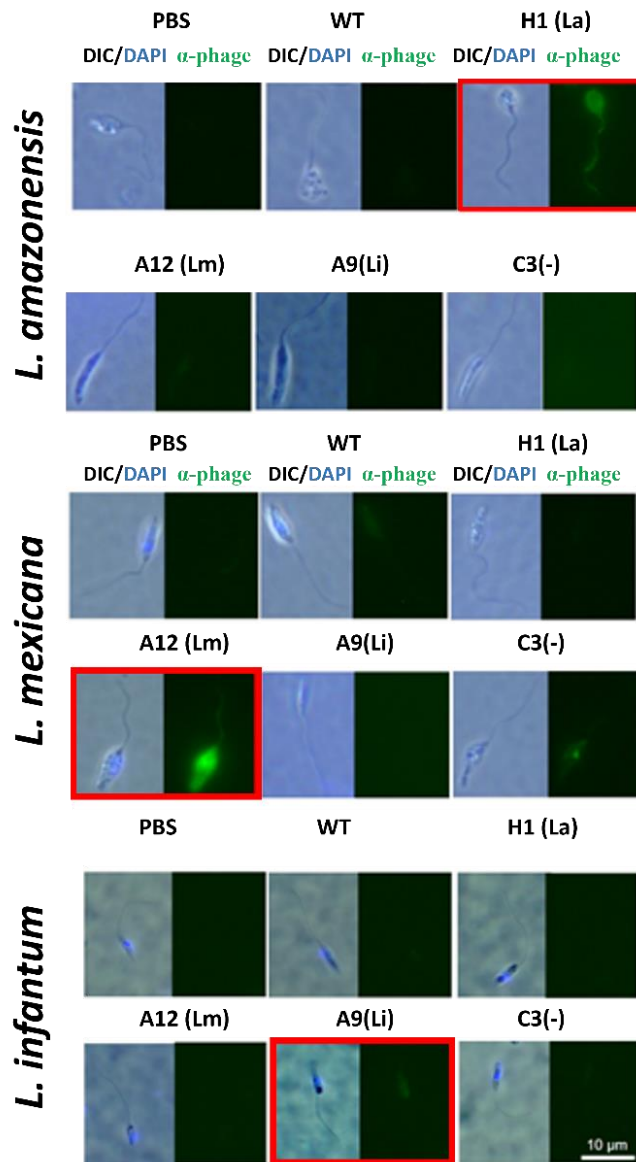


Figura 10: Teste de IFA (Ensaio de Ligação) dos fagos recombinantes H1, A12 e A9, identificados durante o processo de *biopanning* realizados frente as espécies *L. amazonensis* (La), *L. mexicana* (Lm) e *L. infantum* (Li). As amostras foram incubadas *overnight* à 4°C na presença de 2×10^6 PFU/ μ l de fagos recombinantes diluídos em PBS juntamente com os parasitas (1×10^9). Como controles negativos, foram utilizados PBS, os fagos C3 e WT. Após as lavagens, as formas metacíclicas foram incubadas com anticorpo anti-M13 (5 μ g/ml, diluído 1/1000) e em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado Alexa 488® e finalmente coradas com DAPI. Na figura destaca-se em vermelho a interação

parasita:fago espécies específicos, i.e *L. amazonensis*: H1, *L. mexicana*: A12 e *L. infantum*: A9.

5.4 Avaliação da taxa de infecção de macrófagos frente às espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana* após pré-incubação com os fagos recombinantes

A análise da taxa de infecção foi realizada para cada espécie e fagos recombinantes espécie-específico, selecionados durante o processo de *biopanning*. Assim, utilizou-se os fagos H1, A9 e A12 selecionados frente a *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente. Nota-se que o fago A12, apesar de apresentar mutação na posição dos dois resíduos fixos de cisteína, foi utilizado nestes ensaios em função de sua interessante frequência de ocorrência (10%). Utilizou-se ainda o fago recombinante C3 como controle negativo, pois o mesmo mimetiza um fago *Wild type* por apresentar um *stop-códon* no início da sequência codificadora de peptídeo. A taxa de infecção foi inicialmente determinada após a incubação das formas promastigotas metacíclicas: macrófagos, na proporção 5:1, em diferentes tempos: 0 (~ 2 min de incubação), 2, 4 e 8 h de incubação (Time-Course Assay), mantendo-os a 37°C e 5% CO₂. Verificou-se aumento na taxa de infecção ao longo do tempo para todas as espécies, sendo observada maior infectividade da *L. infantum*, por exemplo, em 4 e 8 h pós-infecção.

A seguir, realizamos testes para avaliar a capacidade dos fagos em inibir a taxa de infecção, utilizando diferentes concentrações de fagos recombinantes e diferentes tempos de incubação do parasita. Os resultados para 4 e 8 h de infecção estão representados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Já os resultados para 2 h de infecção estão representados nas Figuras 14, 15 e 16.

Após 4 h de infecção, uma mistura contendo 1×10^5 parasitas totais e $2 \times 10^8/\mu\text{L}$ de fagos recombinantes, foi usada para infectar macrófagos (com a proporção de 5 parasitas para 1 macrófago). O fago recombinante A12, específico para *L. mexicana* inibiu em 31% a taxa de infecção, enquanto os fagos H1 e A9 em 26% e 32%, respectivamente (Figura 12a). Importante destacar que os resultados com fago recombinante C3 foi semelhante a aqueles obtidos com PBS. Para o A9, não foi verificado potencial inibitório significativo na taxa de infecção frente a *L. infantum* (Figura 12b). O fago H1 reduziu em 50% a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* e adicionalmente, o fago A9 também mostrou algum efeito de inibição, alcançando uma taxa de 21% (Figura 12c).

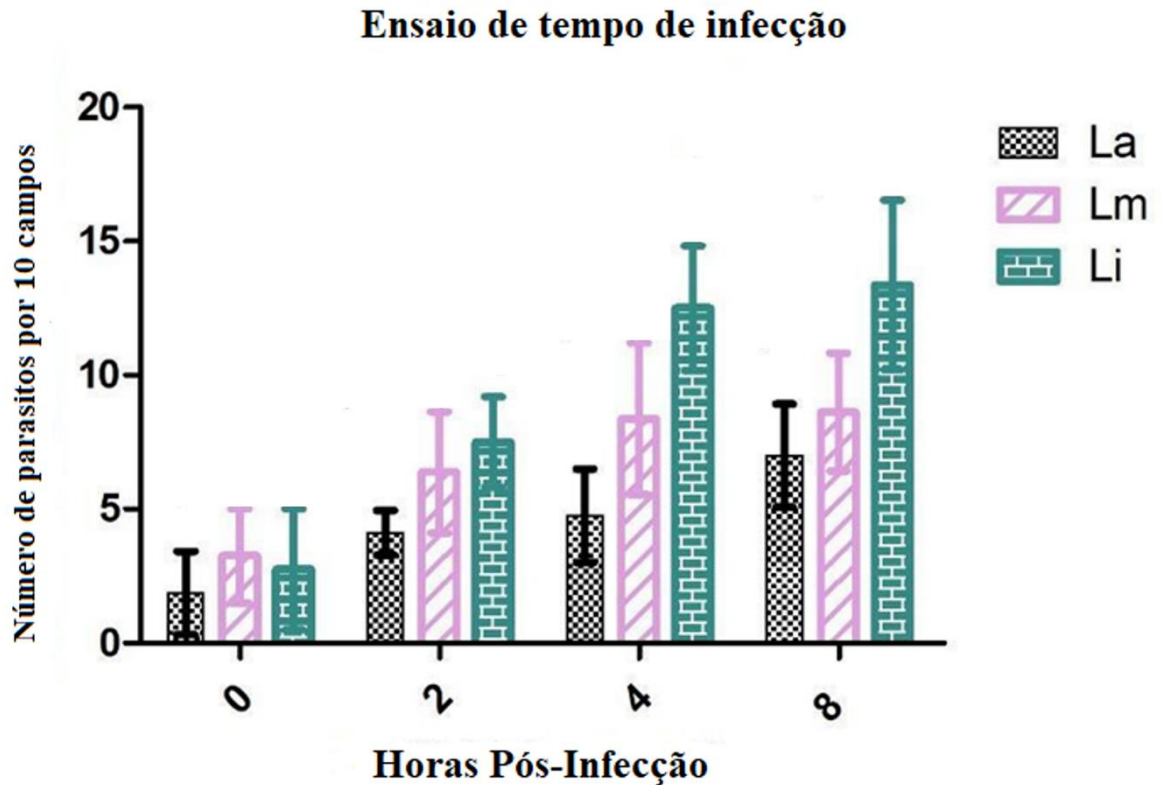


Figura 11: Ensaio de tempo de infecção (*Time course assay*): teste de infectividade dos parasitas incubados a 37°C e 5% CO₂. A infecção foi interrompida em 0 h (2 min após o contato com os macrófagos), 2, 4 e 8 h. Os parasitas foram corados com CFSE antes do ensaio de infecção, posteriormente fixados com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, de acordo com especificações do fabricante e contadas em um microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Dados obtidos em dois experimentos independentes.

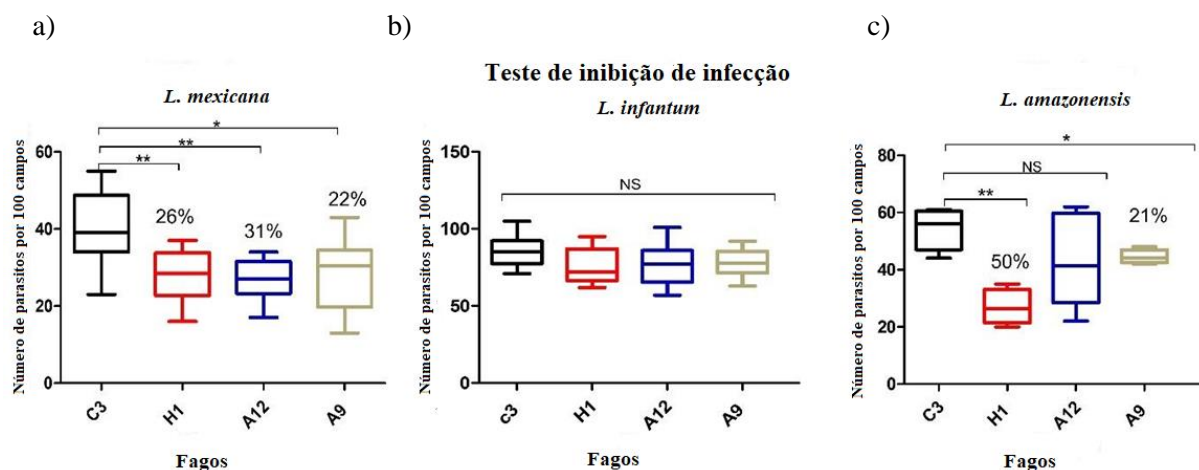


Figura 12: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania* homogeneizadas com $2 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes H1 (específico de *L. amazonensis*), A12 (específico de *L. mexicana*), A9 (específico de *L. infantum*) e controle negativo C3 com macrófagos. Os parasitos foram marcados com CFSE antes da infecção seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram incubadas a 37°C e 5% CO_2 , e a infecção foi interrompida após 4 h, posteriormente fixados com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente ProLong® Gold antifade (Invitrogen), e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Após os testes iniciais, conduzimos experimentos adicionais aumentando a concentração de fagos recombinantes para 5×10^8 PFU/ μL , mantendo o tempo de infecção e tratamento por 8 h (Figura 13). Na Figura 13a, observou-se que somente o fago recombinante A9 foi capaz de reduzir a taxa de infecção de macrófagos infectados com as três espécies em estudo, em média, em 49,6%.

Na Figura 13b, ao aumentar a concentração dos fagos recombinantes, observou-se uma redução de 47% na infecção por *L. infantum* quando tratada com o fago A9. Nos testes com *L. amazonensis*, ilustrados na Figura 13c, os clones A9 e H1 foram capazes de induzir uma redução de infecção de 53% e 54%, respectivamente, em comparação ao controle C3. Vale ressaltar que o clone A9, na concentração $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ demonstrou atividade inibitória contra

todas as três espécies estudadas. Outro critério utilizado para seleção dos candidatos foi que a atividade de inibição deveria ser igual ou superior a 40%.

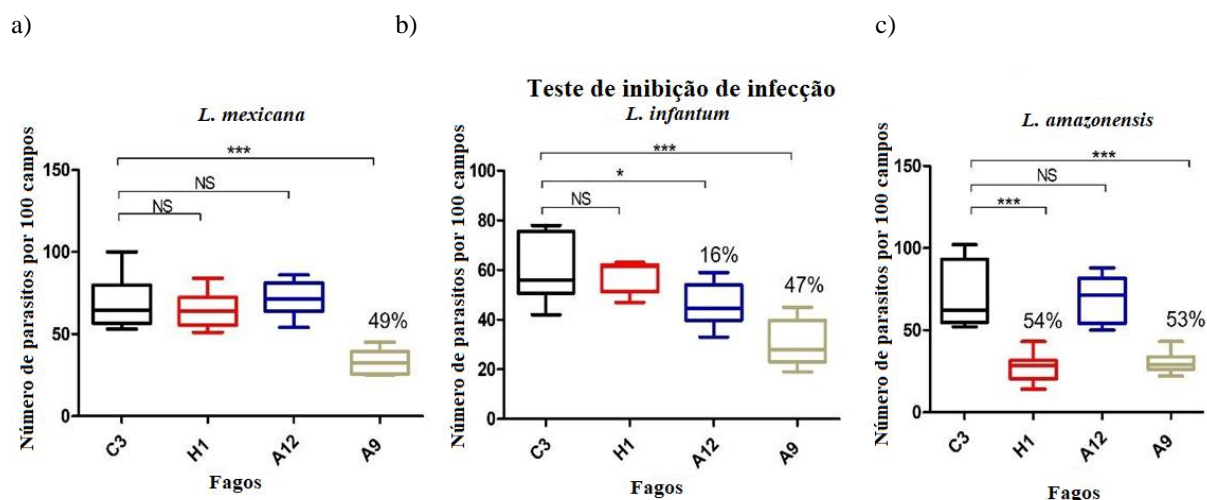


Figura 13: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania* homogeneizadas com $5 \times 10^8 / \mu\text{L}$ fagos recombinantes H1 (específico de *L. amazonensis*), A12 (específico de *L. mexicana*), A9 (específico de *L. infantum*) e controle negativo C3 em macrófagos. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram incubadas a 37°C e 5% CO_2 , e a infecção foi interrompida após 8 h, posteriormente fixados com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente ProLong® Gold antifade (Invitrogen), e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Em prosseguimento às análises supracitadas, novos testes foram realizados com fagos recombinantes na concentração de 5×10^8 PFU/ μL , 1×10^5 parasitas totais, mas com redução no tempo de infecção para 2 h. Isso nos permitiu avaliar a eficácia dos fagos recombinantes específicos em impedir a infecção em macrófagos, quando comparados com o controle C3, com um menor tempo de incubação. Levando em consideração também os resultados do experimento *Time course Assay* (Figura 11) que indicaram a infectividade das cada cepas nos tempos testados, decidimos fixar o tempo de infecção em 2 h nos experimentos descritos a seguir. É válido ressaltar que a taxa de redução da infecção para um mesmo fago frente ao

controle C3, também se mostrou estável quando comparamos experimentos com 8 ou 2 h de infecção.

As Figuras 14 a 16 apresentam os resultados de redução da taxa de inibição dos diversos fagos recombinantes selecionados durante os processos de *biopanning* frente às espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*. Apesar do grande número de fagos testados, a hipótese que buscávamos avaliar era se cada fago seria capaz de reduzir a taxa de infecção em comparação ao fago C3 utilizado como controle negativo, pois mimetiza um *wild type* por não expressar peptídeo em seu capsídeo viral devido ao *stop-códon* no início da sequência. Sendo assim, novamente utilizamos o teste estatístico de *Mann Whitney*, que nos permite comparar cada fago com o controle.

Na Figura 14, apresentamos os fagos recombinantes testados contra a *L. amazonensis*. Observamos que alguns deles não foram mencionados anteriormente, uma vez que durante o processo de padronização dos testes utilizamos apenas os clones H1, A9 e A12, obtidos na quarta rodada de *biopanning*. No entanto, apenas o H1 (*L. amazonensis*) e o A9 (*L. infantum*) mostraram resultados promissores.

Para superar a falta de candidatos, realizamos o quinto *round* de *biopanning* tanto para *L. infantum*, que tinha apenas o candidato A9, quanto para *L. mexicana*. No quinto *round*, identificamos a sequência enriquecida denominada E1 para *L. infantum*. Para *L. mexicana* testamos a maioria dos candidatos enriquecidos, incluindo H8, C5 e F6. Após realizar experimentos de inibição, constatamos que os fagos recombinantes mais relevantes para inibir a infecção de *L. amazonensis* em macrófagos continuaram sendo o H1 e o A9, que apresentaram atividade inibitória de 47.4% e 51.5%, respectivamente.

Na Figura 15, apresentamos os fagos recombinantes candidatos testados contra a *L. infantum*. Os promissores foram o A9 e E1, com taxa de inibição de 53.6% e 38.4%, respectivamente.

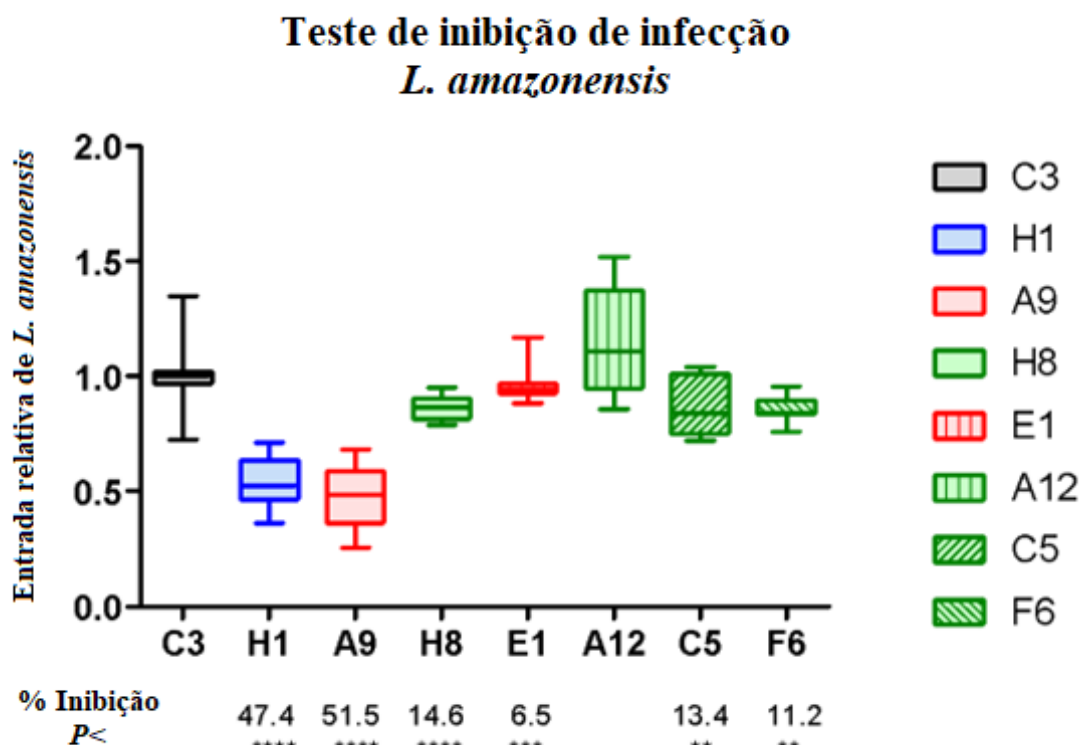


Figura 14: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* homogeneizadas com $5 \times 10^8 / \mu\text{L}$ fagos recombinantes por 2 h. Os seguintes fagos recombinantes foram: C3 – controle negativo, H1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), A9 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), H8 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção), E1 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção), A12 (específico de *L. mexicana* obtido no 4º round de seleção), C5 e F6 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção). Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção seguindo as instruções do fabricante. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, incubação foi realizada a 37°C e 5% CO₂, a infecção foi interrompida após 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

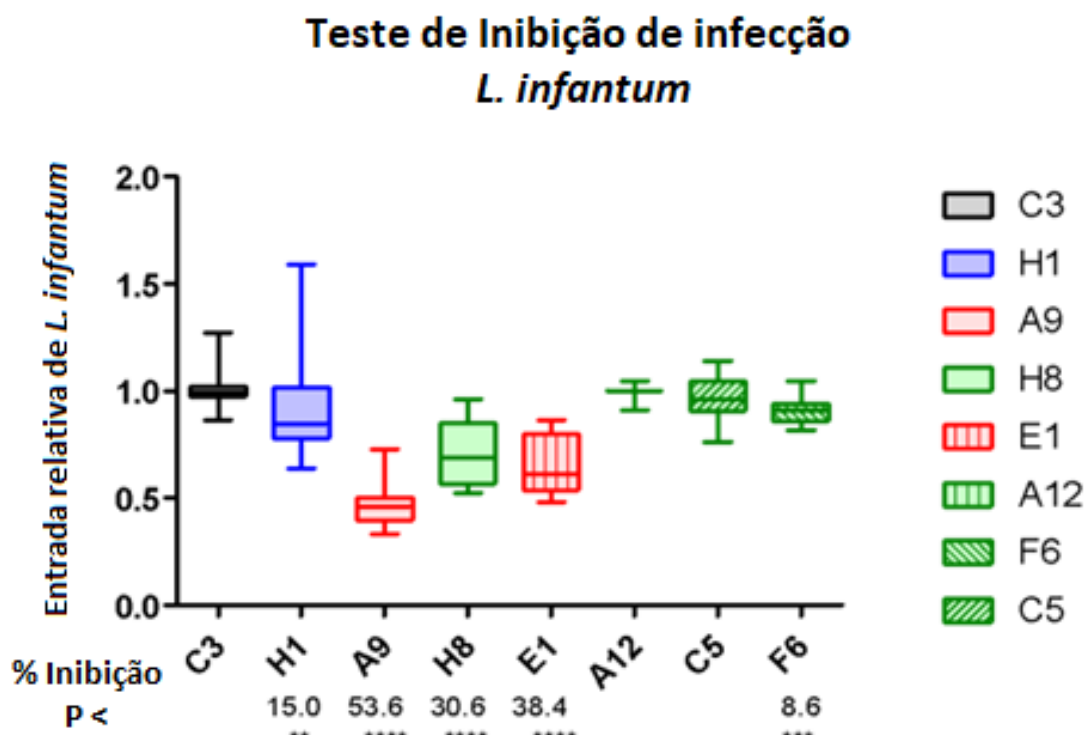


Figura 15: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania infantum* homogeneizadas com $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes por 2 h em macrófagos. Os seguintes fagos recombinantes foram: C3 – controle negativo, H1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), A9 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), H8 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção), E1 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção), A12 (específico de *L. mexicana* obtido no 4º round de seleção), C5 e F6 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção). Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, incubação foi realizada a 37°C e 5% CO₂, a infecção foi interrompida após 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

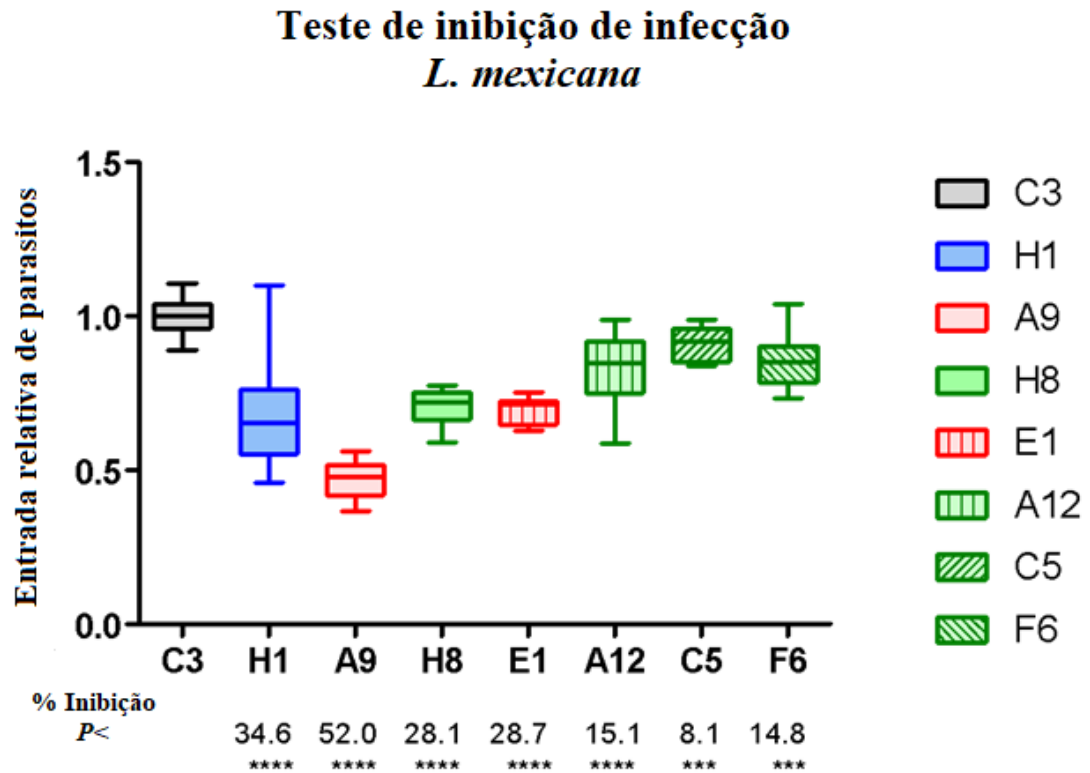


Figura 16: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania mexicana* homogeneizadas com $5 \times 10^8/\mu\text{L}$ fagos recombinantes por 2 h em macrófagos. Os seguintes fagos recombinantes foram: C3 – controle negativo, H1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), A9 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), H8 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção), E1 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção), A12 (específico de *L. mexicana* obtido no 4º round de seleção), C5 e F6 (específico de *L. mexicana* obtido no 5º round de seleção). Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, incubação foi realizada a 37°C e 5% CO₂, a infecção foi interrompida após 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Já na Figura 16, apresentamos os fagos recombinantes testados contra *L. mexicana*. Os candidatos mais interessantes foram o A9 com 52% de inibição, seguido do H1 com 34%. Surpreendentemente, mesmo os fagos recombinantes obtidos na quinta rodada de *biopanning* não apresentaram resultados satisfatórios contra a *L. mexicana*.

6 Avaliação da taxa de infecção de macrófagos frente às espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. mexicana* após pré-incubação com os peptídeos sintéticos baseados nos fagos recombinantes

Com base no processo de *biopanning*, testes de IFA e testes de inibição, selecionamos os clones H1, A9 e E1 para continuidade deste trabalho. Os demais clones não apresentaram as duas propriedades utilizadas para nosso processo de seleção: i) afinidade à superfície de *Leishmania* exibida via *biopanning* ou IFA e ii) capacidade de reduzir a taxa de infecção quando comparado ao controle de ao menos uma das três espécies de *Leishmania*. Posteriormente, as sequências de aminoácidos preditas para os três fagos selecionados foram submetidas à síntese química para obtenção dos peptídeos correspondentes. Esses peptídeos sintéticos foram biotinizados, tornando-os aptos para posterior aplicação em testes de imunodeteção, por exemplo. A realização de novos experimentos *in vitro* com peptídeos sintéticos, nos permite avaliar se a capacidade inibitória dos fagos recombinantes é consequência de impedimento estérico devido ao tamanho dos fagos ou da própria interação entre os peptídeos expressos e moléculas de superfície das espécies de *Leishmania*.

Para fins de nomenclatura, os peptídeos sintéticos correspondentes os clones H1, A9 e E1 foram nomeados como La1, Li1 e Li2, respectivamente. Os nomes dos peptídeos sintéticos foram baseados nas espécies de *Leishmania* utilizadas durante o processo de *biopanning* que os identificou, sendo (La1) identificado de *L. amazonensis* e (Li1 e Li2) identificados de *L. infantum*. Utilizamos também um controle denominado Li1_{SCR} (Scramble), o qual apresenta a mesma composição de aminoácidos, porém em ordem diferente daquela do peptídeo Li1, o que nos permite avaliar se somente a composição peptídica ou a ordem dos aminoácidos é o fator preponderante para a atividade inibitória.

Além disso, utilizamos um controle negativo adicional denominado HP1, proveniente de outro estudo na literatura (CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015), consistindo em um peptídeo sintético biotinizado não relacionado a qualquer sequência peptídica desde estudo. Sendo assim, a avaliação da taxa de infecção de macrófagos foi realizada após tratamentos de promastigotas metacíclicas com os peptídeos sintéticos biotinizados La1, Li1, Li2, e como controle Li1_{SCR} e HP1.

Na Figura 17, apresentamos os resultados obtidos para a espécie *L. amazonensis*, com os experimentos conduzidos ao longo de 2 h de infecção. Utilizamos uma concentração de 0.5 mg/mL de peptídeos sintéticos e 1×10^5 parasitas totais, empregamos um MOI de 5:1. A mistura de peptídeos e parasita foi adicionada aos macrófagos. Observamos que La1, Li2 e Li1 reduziram a taxa de infecção em 45%, 63% e 40%, respectivamente, quando comparados ao HP1. Estes resultados corroboram aqueles obtidos anteriormente com os fagos recombinantes isolados e evidenciando resultados superiores, como os obtidos por Li2.

Na Figura 18, realizamos uma avaliação dos peptídeos sintéticos em relação à infecção por *L. infantum*. Dentro desse grupo, os peptídeos específicos Li1 e Li2 reduziram a infecção em 42% e 47%, respectivamente, quando comparado ao HP1. Esses resultados apresentam um panorama promissor e apontam para o potencial desses peptídeos na infectividade de *L. infantum*.

Já na Figura 19, realizamos as mesmas análises supracitadas para os peptídeos Li1 e Li2 frente a *L. mexicana* e verificamos que estes reduzem em 39% a taxa de infecção de macrófagos. Esses resultados são relevantes e apresentam um viés básico e outro aplicado no que se refere na identificação de novos ligantes na superfície de promastigotas metacíclicas relevantes para a biologia da interação parasita-hospedeiro e outro, na identificação de peptídeos bioativos, contribuindo para a busca por novas opções terapêuticas para o combate das leishmanioses.

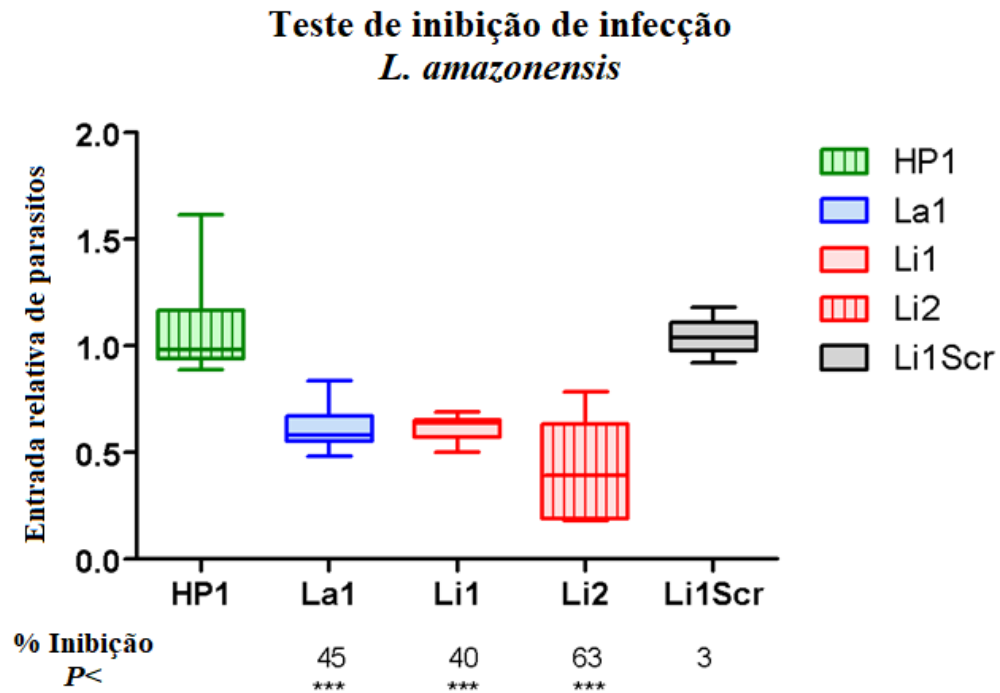


Figura 17: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* homogeneizadas com peptídeos sintéticos em concentração de 0.5 mg/mL por 2 h em macrófagos. Os peptídeos testados foram: HP1 – controle negativo, La1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), Li1 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), Li2 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção) e por fim o Li1_{SCR} controle negativo. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, a incubação foi realizada à 37°C e 5% CO₂, o processo de infecção ocorreu por 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Teste de inibição de infecção *L. infantum*

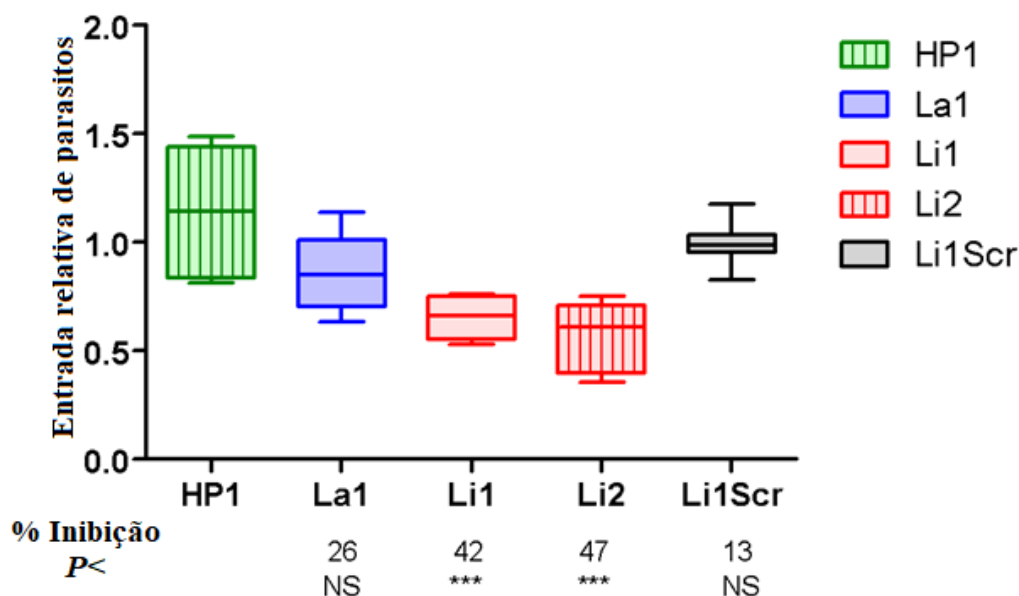


Figura 18: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania infantum* homogeneizadas com peptídeos sintéticos em concentração de 0.5 mg/mL por 2 h em macrófagos. Os peptídeos testados foram: HP1 – controle negativo, La1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), Li1 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), Li2 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção) e por fim o Li1_{SCR} controle negativo. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção a incubação foi realizada à 37°C e 5% CO₂, o processo de infecção ocorreu por 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

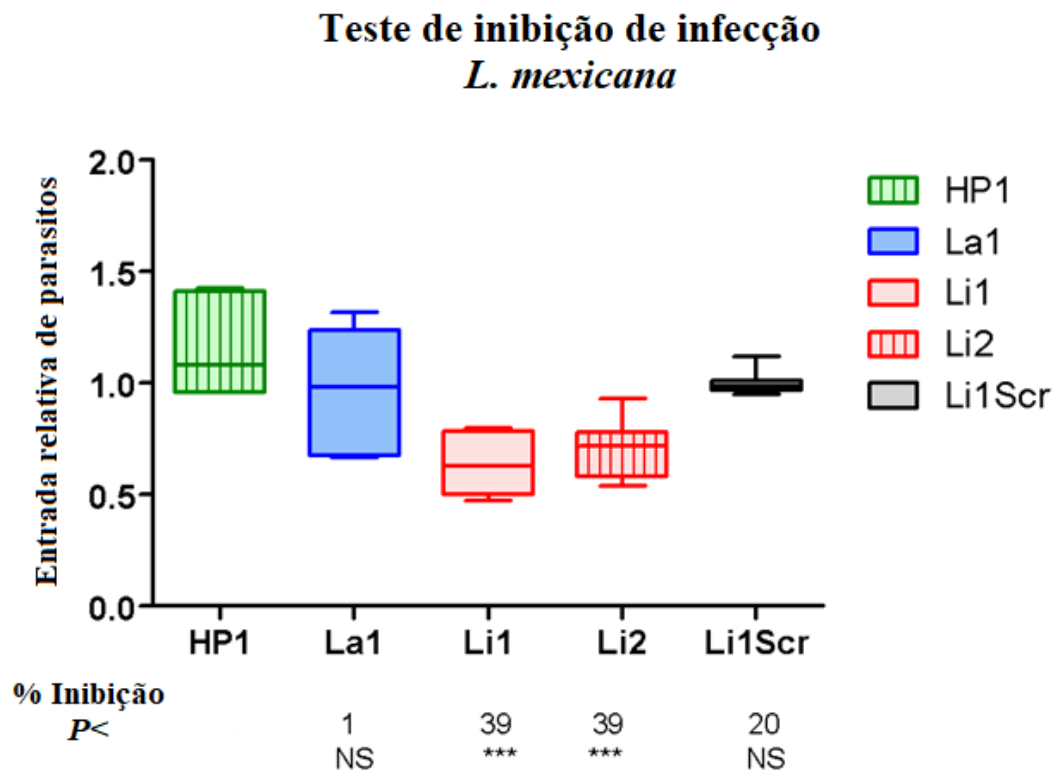


Figura 19: Avaliação do potencial de inibição na taxa de infecção de *Leishmania amazonensis* homogeneizadas com peptídeos sintéticos em concentração de 0.5 mg/mL por 2 h em macrófagos. Os peptídeos testados foram: HP1 – controle negativo, La1 (específico de *L. amazonensis* obtido no 4º round de seleção), Li1 (específico de *L. infantum* obtido no 4º round de seleção), Li2 (específico de *L. infantum* obtido no 5º round de seleção) e por fim o Li1_{SCR} controle negativo. Os parasitas foram marcados com CFSE antes da infecção, a incubação foi realizada à 37°C e 5% CO₂, o processo de infecção ocorreu por 2 h. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído e a lâmina montada com DAPI reagente *ProLong® Gold antifade (Invitrogen)*, e analisadas sob microscópio de fluorescência utilizando uma objetiva de 60x. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes. Em cada experimento, a contagem foi realizada para 100 campos de visão com aumento de 600 vezes, no qual a média de cada 10 pontos foi utilizada como dado, totalizando 10 grupos de dados para cada experimento. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste de *Mann Whitney* (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

6.1 Avaliação do potencial de ligação dos peptídeos à superfície do parasita *Leishmania*

Para avaliarmos qualitativamente a interação entre os peptídeos sintéticos biotinilados e a superfície da *Leishmania*, realizamos o ensaio de IFA. Nesse experimento, os parasitas foram incubados aos peptídeos sintéticos biotinilados em uma concentração de 0.2 mg/mL e, posteriormente, lavados e incubados com estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (absorção 496 nm e emissão 519 nm) ou *Alexa Fluor 594* (absorção 590 nm e emissão 617 nm), o qual interage com a biotina presente nos peptídeos ligados à superfície do parasita. Após isso, realizamos a análise através de microscopia de fluorescência.

Na Figura 20, exibimos os resultados dos testes de IFA. Na primeira coluna, identificada como La1 (H1), apresentamos a presença de interação do peptídeo com *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. infantum*. Ao analisarmos a interação do peptídeo La1 com *L. amazonensis*, notamos uma aparente ausência de interação específica com essa espécie. No entanto, é notável que para *L. mexicana* e *L. infantum*, houve fluorescência na superfície do parasita.

Nas colunas representadas por Li1 (A9) e Li2 (E1), podemos observar a interação dos peptídeos com a superfície das três espécies de *Leishmania*. Adicionalmente, o peptídeo Li2 (E1), mostrou-se particularmente interessante devido à capacidade de inibir a taxa de infecção de macrófagos em até 63%. Assim como o Li1, o peptídeo Li2 não apresentou problemas de solubilidade, o que aumenta a relevância como possível candidato para testes adicionais.

Por fim, temos as colunas de controle representada pelo peptídeo sintético Li1_{SCR} (Li1-*Scramble*) e pelo PBS. O peptídeo sintético Li1_{SCR} mostrou certa afinidade principalmente com a superfície da *L. amazonensis*. No entanto, é importante destacar que essa afinidade não é surpreendente, uma vez que os aminoácidos que compõe o peptídeo sintético Li1_{SCR} foram selecionados a partir de um peptídeo com atividade inibitória. Em outro trabalho, também foi observada a interação do peptídeo sintético com células não utilizadas durante o processo de seleção, mostrando que interações não específicas podem ocorrer nesse tipo de estudo (LI; GAO; XUE; MA *et al.*, 2017).

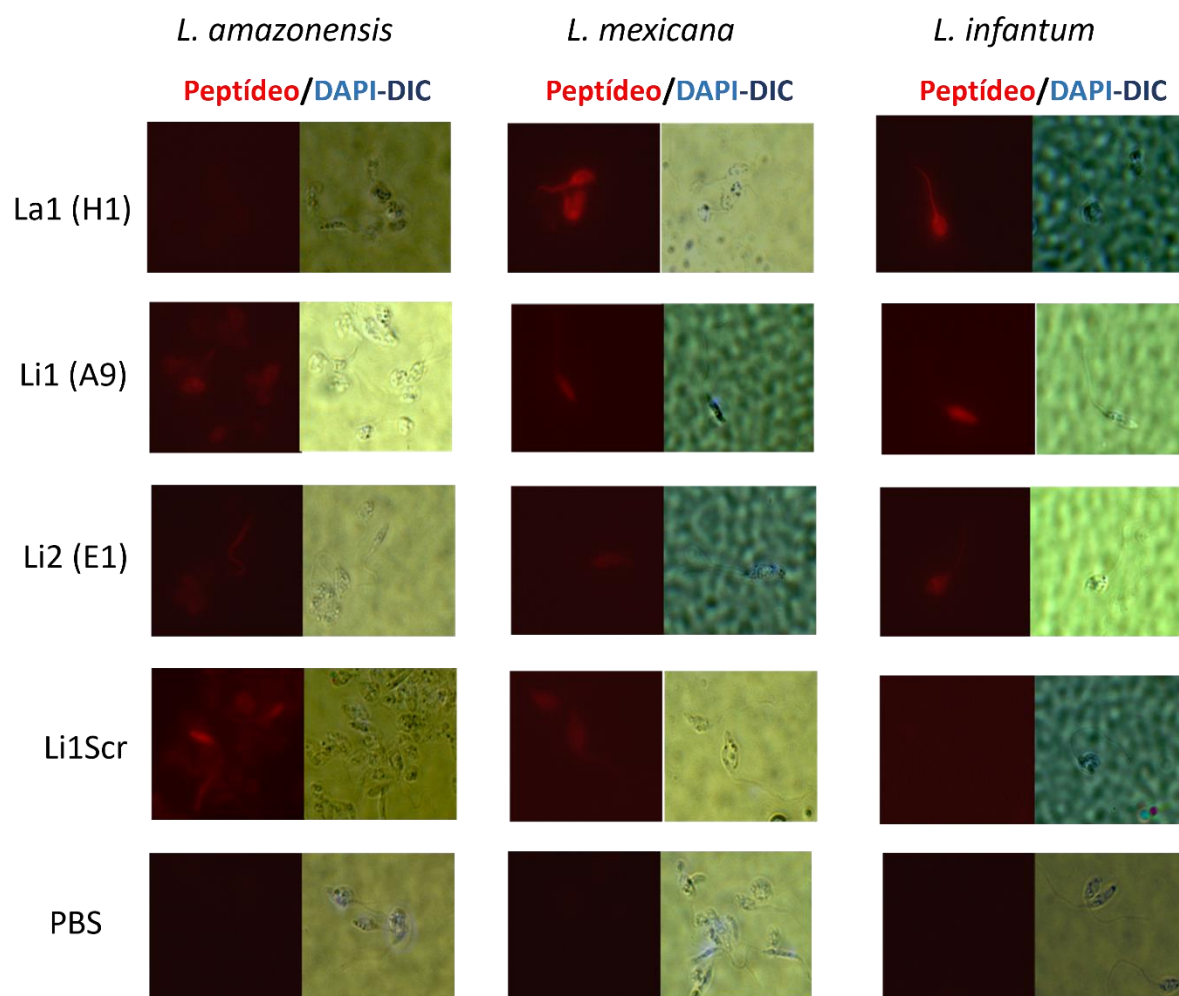


Figura 20: Teste de IFA realizado com peptídeos sintéticos na concentração de 0.2 mg/mL diluídos em PBS e homogeneizados com os parasitas. Após as lavagens as formas metacíclicas foram incubadas com estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor 594* (absorção 590 nm e emissão 617 nm) por 1 h. O núcleo dos parasitas foi corado utilizando DAPI. A marcação na lateral é correspondente às espécies. *La*, *L. amazonensis*; *Lm*, *L. mexicana*; *Li*, *L. infantum*.

É relevante ressaltar que o controle Li1_{SCR} foi utilizado apenas para comparações visuais em testes de IFA. Nos testes de inibição, o peptídeo sintético HP1 foi utilizado como controle, uma vez que não apresentou fluorescência nos testes de IFA. A inclusão desses controles é fundamental para garantir a validade dos resultados e permitir comparações adequadas entre os peptídeos sintéticos e os controles negativos.

Depois de realizar experimentos de microscopia de fluorescência, decidimos avançar para a microscopia confocal. Optamos por utilizar essa técnica para fins de comparação com

os resultados obtidos pela microscopia de fluorescência. A microscopia confocal proporciona uma visão tridimensional das amostras, o que auxilia na redução de confusões nas cores e na localização mais precisa dos sinais das interações entre os peptídeos e a superfície da *Leishmania*. Isso aprimora a confiabilidade e a qualidade dos dados que obtivemos.

Realizamos experimentos de confocal como mostrado na Figura 21, seguindo a mesma metodologia utilizada na microscopia de fluorescência. Trabalhamos com quatro tratamentos distintos (La1, Li1, Li1_{SCR} e HP1), utilizando formas selecionadas de promastigotas metacíclicas. Importante ressaltar que o peptídeo Li2 não foi testado devido a resultados insatisfatórios em outros ensaios.

No caso da *L. amazonensis*, ao avaliarmos as interações dos peptídeos La1 e Li1, notamos que ambos demonstraram fluorescência significativa na superfície do parasita. É interessante observar que, mesmo sendo inespecífico para esta espécie, o peptídeo Li1 exibiu uma intensa fluorescência. O controle específico (Li1_{SCR}), que possui a mesma sequência de aminoácidos do Li1, mas em posições diferentes, exibiu fluorescência consideravelmente baixa. Essa fluorescência pode ser atribuída à natureza circular do peptídeo sintético, que pode induzir interações com a superfície do parasita, possivelmente explicando também a leve fluorescência observada no HP1. Esses resultados ressaltam que a simples fluorescência isolada não é um indicador suficiente para inferir atividade de inibição.

Ao examinarmos *L. infantum* sob as mesmas condições, verificamos resultados distintos. Nesse contexto, somente os peptídeos La1 e Li1 exibiram interações significativas com a superfície do parasita. Enquanto o Li1 é específico para *L. infantum*, o La1 é inespecífico. As imagens confocais confirmaram a relevante interação entre esses peptídeos e a superfície do parasita, enquanto os controles específicos (Li1_{SCR}) e inespecífico (HP1) não apresentaram ligações evidentes.

Tais observações ressaltam a importância da abordagem confocal para distinguir entre interações inespecíficas e a fluorescência de fundo, algo que é frequentemente observado na microscopia de fluorescência. Esses resultados são promissores e nos motivaram a explorar esses peptídeos através aplicação em modelos *in vivo* para uma melhor compreensão de suas capacidades de inibição e potenciais benefícios terapêuticos.

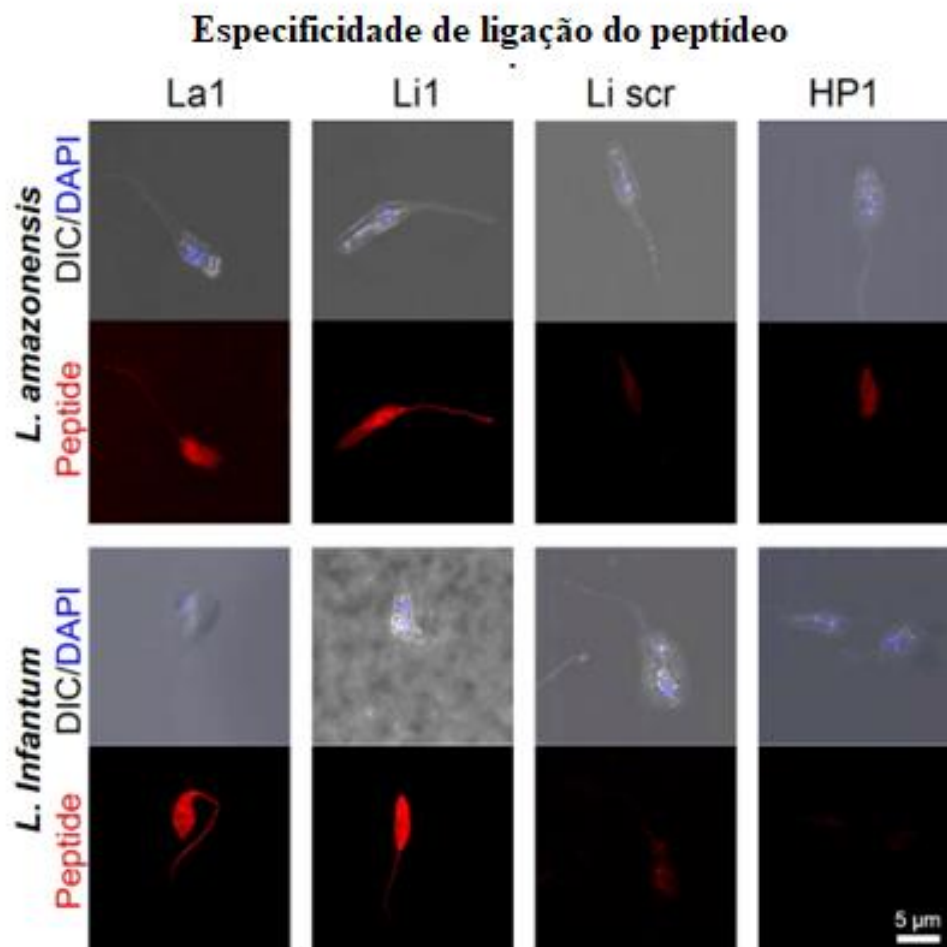


Figura 21: Peptídeos selecionados se ligam à superfície da *Leishmania*. Imagens de microscopia confocal demonstram a especificidade de ligação dos peptídeos selecionados a promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os parasitas foram fixados e tratados com peptídeos sintéticos biotinilados após o bloqueio com 4% de BSA. A especificidade dos peptídeos foi visualizada usando estreptavidina *Alexa Fluor 594*.

6.2 Avaliação *in vivo* da taxa de infecção de *L. infantum* em BALB/c

Para corroborar os resultados obtidos na taxa de infecção em macrófagos *in vitro*, realizamos ensaios de inibição de infecção *in vivo*. Empregamos a técnica RT-qPCR, investigamos os efeitos de diferentes peptídeos na infecção causada por *L. infantum*, utilizando o modelo murino BALB/c. O experimento foi dividido em três grupos experimentais: La1, Li1

e Li1_{SCR}, e repetido quatro vezes, fazendo com que cada grupo fosse composto por um total de 12 camundongos.

Para cada grupo, após 30 dias de infecção, coletamos amostras de fígado e baço os quais realizamos a extração do RNA. Posteriormente, realizamos a transcrição reversa para sintetizar o cDNA a partir das amostras de RNA obtidas. As amostras resultantes de cDNA foram então submetidas à amplificação por qPCR, utilizando primers específicos para o gene alvo de interesse, L-asparaginase, que está associado à infecção por *Leishmania*.

O grupo Li1_{SCR} foi designado como grupo controle, enquanto os grupos La1 e Li1 foram os grupos tratados. Os camundongos nos grupos tratados foram infectados com parasitas de *L. infantum* previamente incubados com os respectivos peptídeos (La1 e Li1), que já demonstraram atividade de inibição nas taxas de infecção em macrófagos.

Para permitir comparações precisas entre os grupos, utilizamos o gene de referência GAPDH como controle endógeno para normalizar os dados de expressão gênica. Essa normalização considerou variações na quantidade de RNA e garantiu resultados mais confiáveis. A quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, permitindo a avaliação das mudanças na expressão gênica entre os grupos tratados (La1 e Li1) e o grupo controle (Li1_{SCR}).

Após a análise, os resultados foram notáveis. No grupo Li1, observamos uma inibição significativa da infecção, atingindo uma taxa de inibição de 84% tanto para o fígado quanto para o baço. Isso indica que o peptídeo Li1 teve um impacto positivo na inibição da infecção por *L. infantum* nos dois órgãos analisados. Em contraste, as análises no grupo La1 não mostraram uma inibição tão significativa da infecção quando comparadas ao grupo Li1. Esse impacto positivo do peptídeo Li1 na inibição da infecção é ilustrado de forma expressiva na Figura 22. A figura destaca claramente a diferença nas taxas de infecção entre os grupos Li1 e La1, comparando-os com o peptídeo controle Li1_{SCR} validando. Embora ambos os órgãos tenham apresentado uma inibição de 84%, é importante ressaltar que essa inibição foi estatisticamente mais significativa no baço.

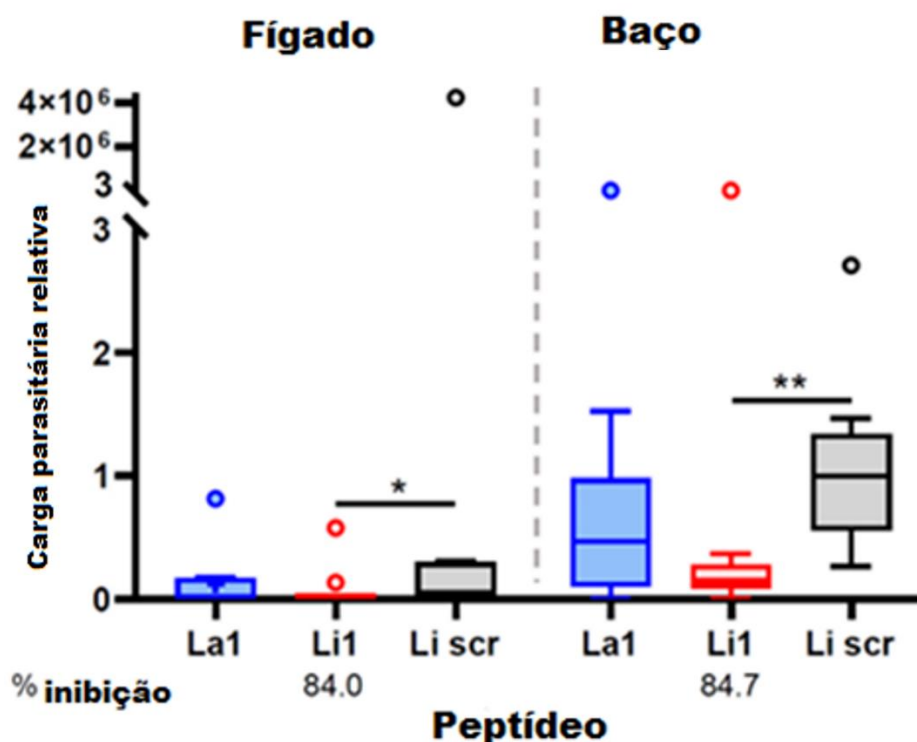


Figura 22: Ensaio de inibição de infecção *in vivo* utilizando peptídeos sintéticos biotinilados. Camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, pré-tratados com peptídeos selecionados (La1, Li1 e Li_{SCR}). Os camundongos foram sacrificados após 30 dias para análise da carga parasitária no fígado e baço. Dados combinados de quatro experimentos independentes (total de 12 camundongos por grupo). Valores de p (*, <0,05; **, <0,01) calculados utilizando o teste de *Mann-Whitney U*.

Para estabelecer uma conexão significativa entre os resultados das taxas de inibição em macrófagos *in vitro*, e as investigações das infecções *in vivo*, é fundamental compreender as interações que os parasitas de *Leishmania* estabelecem ao longo do processo de infecção no hospedeiro. Por meio de experimentos *in vitro*, os macrófagos simulam uma interação inicial controlada entre os parasitas e as células fagocíticas do hospedeiro. Isso nos permitiu analisar as interações parasita-célula nos estágios iniciais da infecção. Ao analisarmos a atividade dos peptídeos, como La1 e Li1, notamos uma redução da taxa de infecção somente para o peptídeo Li1, o que corrobora os resultados observados *in vitro*. Uma análise mais detalhada dessas interações nos permitiria desvendar mecanismos pelos quais os peptídeos afetam a infecção e identificar potenciais alvos terapêuticos.

Portanto, as infecções *in vivo* nos permitem observar os efeitos dos peptídeos inibidores em um sistema mais abrangente, no qual as interações entre parasitas, células hospedeiras e

respostas imunológicas naturais ocorrem simultaneamente. Ao determinarmos a carga parasitária no fígado e baço, obtemos uma visão mais completa do impacto dos peptídeos na disseminação da infecção por *L. infantum*. Observamos que o Li1, além de ter se comportado nos testes *in vitro* como um inibidor universal das taxas de infecção em macrófagos, inibiu a infecção de *L. infantum* em 84% nos testes *in vivo* em ambos os órgãos. A correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* contribui para confirmar o potencial eficaz dos peptídeos sintéticos como possível terapia.

7 Discussões e perspectivas

A fim de compreender melhor o impacto de nosso trabalho no âmbito da pesquisa básica e aplicada no combate às leishmanioses, realizamos nesta seção uma análise mais aprofundada de nossos resultados, contextualizando-os em relação às descobertas e conclusões da literatura. Inicialmente, é válido comparar o processo de *biopanning* para as espécies de *Leishmania* deste estudo com trabalhos semelhantes realizados para outras doenças parasitárias. No presente estudo, utilizamos a frequência de ocorrência de uma mesma sequência peptídica como o primeiro parâmetro para selecionar fagos recombinantes capazes de inibir a internalização das espécies de *Leishmania* em macrófagos. As sequências selecionadas por meio do *biopanning* (H1, A9, H8, E1, A12, C5, F6) apresentaram uma frequência de ocorrência de 12,9%, 6,9%, 10,6%, 8,7%, 10%, 6,7% e 6,7%, respectivamente.

Quando comparadas com outros estudos na literatura, as frequências de ocorrência de nossas sequências peptídicas são significativamente inferiores, o que, como demonstrado durante este trabalho, não significa que os peptídeos selecionados não são bons candidatos para a inibição da infecção de macrófagos por *Leishmania*. Em um estudo no qual a mesma biblioteca de fagos foi testada contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, os fagos recombinantes mais promissores apresentaram frequência de ocorrência de 29% (DE PAULA; LOPES-TORRES; JACOBS-LORENA; PAES *et al.*, 2022). Similarmente, o mesmo processo contra as células de Kupffer para combater o *Plasmodium spp.*, apresentou uma recorrência máxima de 47% (CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015).

Como ressaltado anteriormente, a frequência de ocorrência em nosso processo de *biopanning* poderia levar a uma conclusão precipitada e incorreta de que nenhuma das sequências peptídicas se ligariam de maneira eficiente e seletiva às superfícies da *Leishmania*. Para exemplificar o conceito de que os resultados de *biopanning* podem ser insuficientes quando interpretados de maneira isolada, enfatizamos aqui as sequências peptídicas dos clones A12 e H8, que apesar de apresentarem uma frequência de ocorrência semelhante ao clone A9, demonstraram ter uma capacidade reduzida de inibir a internalização de ambas as espécies de *Leishmania* em macrófagos. Além disso, o fato de não ter sido observada nenhuma sequência comum às três espécies, também poderia nos levar a acreditar que possíveis atividades inibitórias seriam, necessariamente, espécie-específicas. No entanto, essas suposições se

mostraram inadequadas quando confrontadas com os resultados das taxas de inibição de infecção em macrófagos *in vitro*, destacando a necessidade de testes além de *biopanning* para uma seleção mais precisa de candidatos.

Nossos resultados de microscopia de fluorescência utilizando os fagos recombinantes ajudaram a evidenciar a presença da interação fago-parasita. Esse tipo de técnica é essencial para confirmar qualitativamente a ligação do fago ao alvo. A técnica de microscopia de fluorescência para confirmar qualitativamente os resultados do *screening* também foi aplicada em trabalhos que utilizaram *phage display* para estudar peptídeos que pudessem ser utilizados em estratégias contra outros parasitas como *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*, ou até mesmo em aplicações onde o alvo do *screening* com *phage display* eram ligantes presentes na glândulas salivares e intestino médio de mosquitos (CHA; KIM; NA; JACOBS-LORENA, 2021; CHA; KIM; PANDEY; JACOBS-LORENA, 2016; DE PAULA; LOPES-TORRES; JACOBS-LORENA; PAES *et al.*, 2022; GHOSH; RIBOLLA; JACOBS-LORENA, 2001). Apesar de validar a presença da ligação, nossos testes de microscopia de fluorescência também indicaram que os fagos A9 e H1 possuíam interação específica à espécie identificada. Tal interpretação também não correspondeu a atividade inibitória observada para o fago recombinante A9, que se mostrou ativo tanto para a espécie de identificação quanto para *L. amazonensis*. Tais resultados ressaltam a importância dos estudos adicionais com testes *in vitro* da inibição da infecção em macrófagos como parte fundamental do *screening* de candidatos para estudos futuros *in vivo*.

As divergências nas conclusões obtidas a partir das análises de inibição, em comparação com os dados de *biopanning* e de imunofluorescência podem ser explicadas devido a possíveis interações entre as sequências peptídicas e regiões da superfície de *Leishmania* que não estão diretamente implicadas no processo de internalização em macrófagos. Uma estratégia sugerida na literatura de *phage display* para melhorar o processo de seleção de candidatos em estudos futuros seria utilizar proteínas de superfície específicas de *Leishmania*, que desempenhem papéis cruciais na interação hospedeiro-parasita, como alvos iniciais para o processo de *biopanning* (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010).

Por exemplo, uma abordagem inicial de *biopanning* poderia ser conduzida com uma proteína recombinante de GP63 como alvo. A utilização de tal proteína recombinante como alvo primário se justifica pois tal metaloproteinase corresponde a cerca de 1% do proteoma

total do parasita, e auxilia, dentre outras coisas, na interação da *Leishmania* com diversas proteínas da célula hospedeira (MERCADO-CAMARGO; CERVANTES-CEBALLOS; VIVAS-REYES; PEDRETTI *et al.*, 2020). No entanto, é importante ressaltar que essas proteínas recombinantes podem adotar conformações diferentes das encontradas na superfície de parasitas. Assim, realizar novos ciclos de seleção, utilizando a próprias *Leishmania* como alvo, poderia aumentar substancialmente a probabilidade de identificar sequências peptídicas que demonstrem afinidade com alvos terapêuticos específicos (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010).

Ao analisarmos os dados de inibição com fagos recombinantes, observamos que os fagos HP1 e WT, isolados em outro estudo, não demonstram diferença estatisticamente significativa nas taxas de infecção em comparação ao controle negativo, PBS. Esse resultado mostra que a inibição possivelmente ocorra pela interação da sequência peptídica com a superfície da *Leishmania* e não devido a impedimentos estéricos causados pelo tamanho do fago. Essa interpretação também foi verificada na literatura para peptídeos selecionados via *phage display* contra *Leishmania major* (RHAJEM; HOUIMEL, 2016). Os autores observaram que fagos recombinantes usados como controle, que não eram específicos para o estudo em questão, também não demonstraram reatividade em comparação com os fagos selecionados por *biopanning*.

As comparações entre os resultados de taxa inibição de infecção em macrófagos *in vitro* realizadas com fagos recombinantes e com peptídeos sintéticos mostraram uma correlação significativa, o que reforça ainda mais que a inibição da interação entre *Leishmania* e macrófago é mediada pela sequência peptídica ou composição de alguns aminoácidos na formação do *loop* conformacional. Essa observação sugere que os experimentos de inibição com fagos recombinantes podem ser úteis para identificar quais candidatos devem ser selecionados para síntese química e análises adicionais. Essa conclusão é valiosa para reduzir o ônus e os custos associados à síntese de vários candidatos.

Ainda sobre as análises dos resultados das taxas de inibição de infecção em macrófagos *in vitro*, observamos que o peptídeo sintético Li1 reduziu as taxas de infecção entre 39% e 42% quando testado para *L. amazonensis*, *L. mexicana* ou *L. infantum*. Por outro lado, o peptídeo La1 mostrou-se específico para a espécie, inibindo somente a infecção por *L. amazonensis* em 45%. Ao compararmos nossos resultados com a literatura, notamos que nossos peptídeos

podem ser considerados comparáveis a outras abordagens que visam inibir a interação parasita-hospedeiro, não necessariamente sendo os mais eficazes.

Por exemplo, Palatnik et al. (PALATNIK; BOROJEVIC; PREVIATO; MENDONÇA-PREVIATO, 1989) analisou frações glicoproteicas que incluíam fucose e manose isoladas de *L. donovani* e selecionou três monossacarídeos dessas frações para testes de inibição de internalização de *L. donovani* em macrófagos de BALB/c. Dentre os três monossacarídeos testados, o FML (do inglês fucose-mannose glycoproteic ligand) e o PMGL (do inglês phosphate mannogalactan) foram capazes de inibir a internalização em mais de 60% em diversas concentrações. Recentemente, a utilização de anticorpos anti-LPG também se mostrou capaz de inibir a internalização de *Leishmania donovani* em aproximadamente 60%, conforme inferido a partir da interpretação das figuras no artigo original. Resultados semelhantes de inibição foram observados no mesmo estudo quando estratégias de supressão da expressão do receptor de macrófagos TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) foram empregadas. Esses resultados, juntamente com outras análises realizadas no estudo, confirmaram a importância da interação entre a LPG de *Leishmania* e os TLR4 dos macrófagos (MAZUMDER; SINHA; GHOSH; SHARMA et al., 2023).

Nossos experimentos *in vivo* corroboram as principais tendências observadas *in vitro*. O peptídeo Li1 reduziu a carga parasitária de *L. infantum* no fígado e baço de BALB/c em 84%, enquanto o peptídeo La1, específico para *L. amazonensis*, não apresentou reduções consideráveis frente a *L. infantum*. Diferenças quantitativas entre os resultados *in vivo* e *in vitro* não são surpreendentes, dada a complexidade adicional dos testes *in vivo*. No entanto, tais descobertas reforçam a perspectiva de que essa abordagem pode ser útil na identificação de peptídeos com potenciais implicações clínicas. Resultados semelhantes foram observados por Rhaïem e Houïmel (RHAÏEM; HOUÏMEL, 2016) ao utilizarem uma biblioteca de fagos para encontrar peptídeos direcionados a promastigotas metacíclicas de *Leishmania major*. Em seus testes *in vivo*, observou-se uma redução de 81.94% na infecção por meio do peptídeo P2 em lesões cutâneas na pata de BALB/c infectados.

Devido ao nosso método de seleção de peptídeos por *biopanning*, que considera a afinidade da ligação da sequência peptídica com a superfície de promastigotas metacíclicas como parâmetro principal, podemos conjecturar que o efeito inibitório desses peptídeos, expressos pelos fagos ou por seus análogos sintéticos, pode ser resultado da interação com

moléculas de superfície responsáveis pela internalização de *Leishmania* em macrófagos. A lista de moléculas de superfície importantes para interação parasita-hospedeiro é longa e ainda vem sendo desmistificada (PISSARRA; PAGNIEZ; PETITDIDIER; SÉVENO *et al.*, 2022). Dentre as importantes moléculas identificadas para tais interações temos componentes como lipofosfoglicanos (LPG), proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), glicoinositolfosfolipídios (GIPLs), PSA (*Promastigote Surface Antigen*), entre outros (AL-KHALAIFAH, 2022; KAUSHAL; NAIK; PRAJAPATI; RANE *et al.*, 2023; OLIVEIRA; FIGUEIREDO; REZENDE; VERANO-BRAGA *et al.*, 2020; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A complexidade de tal tópico pode ser observada em um recente estudo que explorou as moléculas secretadas por promastigotas de sete espécies de *Leishmania* via análises proteômicas (PISSARRA; PAGNIEZ; PETITDIDIER; SÉVENO *et al.*, 2022). Apesar do enorme número de proteínas e diferenças entre espécies, os autores observaram a presença de ao menos 20 proteínas conservadas entre diversas espécies patogênicas aos seres humanos. Até o momento, não identificamos os ligantes responsáveis por essas interações, no entanto, o grupo pretende realizar tais experimentos como continuidade a este trabalho.

Ainda assim, com base nos resultados da literatura, é possível especular sobre os tipos de moléculas que podem estar envolvidas nos efeitos observados. Em um estudo que empregou uma metodologia de seleção semelhante a realizada em nosso trabalho, Rhaïem e Houïmel (RHAÏEM; HOUÏMEL, 2016) observaram que o peptídeo mais ativo na inibição da infecção por *Leishmania major* se ligava seletivamente à metaloproteinase GP63. A interação com a GP63 foi confirmada por *Western blot*, enquanto estudos de *molecular docking* mostraram a capacidade de interação e a complementariedade do formato do peptídeo e de um sítio ativo da GP63 de *L. major*.

Considerando a capacidade do nosso peptídeo Li1 de inibir a internalização *in vitro* de *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. infantum* em proporções semelhantes, podemos supor que moléculas prevalentes na superfície de parasitas pertencentes a diferentes complexos do gênero *Leishmania*, possam ser os alvos afetados por esse peptídeo. Por exemplo, um estudo realizado por Schlagenhauf *et al* (SCHLAGENHAUF; ETGES; METCALF, 1998), revelou informações sobre a GP63. Ao calcular a similaridade dos aminoácidos da GP63 de diferentes espécies de *Leishmania* em relação a sequência da *L. major* (GenBank ID: sw:GP63_LEIMA), os autores observaram que a *L. infantum* (GenBank ID: gnl|PID|e266653) apresentou 81% de

similaridade, enquanto a *L. amazonensis* (GenBank ID: gi|1100213) demonstrou 78%, e *L. mexicana* (GenBank ID: pir/A48564) 76%. Técnicas de proteômica também identificaram a presença da isoforma P15706 (leishmanolisina) de GP63 como prevalente em diversas espécies de *Leishmania* na forma promastigota (PISSARRA; PAGNIEZ; PETITDIDIER; SÉVENO *et al.*, 2022).

Caso uma molécula de grande abundância e prevalência em diversas espécies de *Leishmania* seja confirmada como como alvo do peptídeo Li1, estudos adicionais podem ser realizados para entender a contribuição de tal peptídeo no desenvolvimento de vacinas para diversas espécies de *Leishmania*. Por exemplo, o alvo GP63 é conhecido por sua eficácia na geração de vacinas peptídicas (DE BRITO; CARDOSO; REIS; VIEIRA *et al.*, 2018). Outro exemplo, são as proteínas KMP-11 (Kinetoplastid membrane protein-11), presentes na superfície de *Leishmania* em diferentes estágios da vida e associadas ao processo de aderência e internalização em macrófagos, que também poderiam ser consideradas como bons alvos para o desenvolvimento de vacinas (HALDER; SANNIGRAHI; DE; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2020).

Enquanto uma molécula que possua semelhanças em diversas espécies de *Leishmania* pode ser conjecturada como alvo do peptídeo Li1, o mesmo não pode ser dito para o caso do peptídeo La1. Nesse caso, acredita-se que moléculas de menor frequência presentes na superfície da *Leishmania*, como por exemplo a lipofosfoglicano (LPG), podem ser os responsáveis pela resposta que foi observada. A variação na estrutura dos LPGs entre diferentes espécies de *Leishmania* foi experimentalmente observada e identificada como um fator significativo para a virulência do parasita. Logo, se o alvo do La1 estiver relacionado com porções do LPG que são influenciados pela variação estrutural entre as espécie, a ação de inibição específica poderia ser explicada (ELMAHALLAWY; ALKHALDI, 2021).

Como dito anteriormente, pretendemos realizar experimentos para elucidar as proteínas de superfície da *Leishmania* que se ligam aos peptídeos selecionados como continuidade deste trabalho. Tal abordagem já foi realizada na literatura, onde utilizou-se *phage display* como ferramenta de seleção de peptídeos para aplicação em doenças parasitárias. Além da identificação do peptídeo P39 como capaz de inibir o processo de entrada de esporozoítos nas células de Kupffer, os autores conseguiram relacionar a ligação de tal peptídeo com um receptor

hipotético CD68, que desempenha função crucial na invasão dos esporozoítos nas células de Kupffer (CHA; PARK; SRINIVASAN; SCHINDLER *et al.*, 2015).

Também é possível considerar futuras pesquisas que utilizem os resultados apresentados nesta tese em conjunto com estudos recentes na literatura. Nosso processo de *biopanning* resultou em uma lista extensa de sequências peptídicas que se ligam à superfície da *Leishmania*, e somente as sequências mais recorrentes foram selecionadas para novos testes. Entretanto, como discutido anteriormente, não observamos uma correlação necessária entre a atividade inibitória dos peptídeos e a frequência de aparecimento no processo de *biopanning*. Sendo assim, uma continuação possível ao trabalho seria aproveitar os resultados obtidos e analisá-los novamente utilizando diversas técnicas de ciência de dados e bioinformática disponíveis, realizando assim, uma seleção de peptídeos *in silico*. Tal estudo pode fazer uso dos resultados obtidos por outros trabalhos em proteômica de diferentes espécies de *Leishmania* (PISSARRA; PAGNIEZ; PETITDIDIER; SÉVENO *et al.*, 2022) ou utilizar banco de dados publicados recentemente e desenvolvidos especificamente para armazenar e catalogar proteínas de superfícies identificadas para diferentes espécies de *Leishmania* (GÁBOR; ANDRÁS; ZSÓFIA; MARIE *et al.*, 2023).

Também podemos vislumbrar a utilização de tais peptídeos ou dos próprio fagos recombinantes para desenvolver estratégias para potenciais vacinas contra a leishmaniose, uma vez que fagos podem desempenhar um papel como adjuvantes naturais (GONZÁLEZ-MORA; HERNÁNDEZ-PÉREZ; IQBAL; RITO-PALOMARES *et al.*, 2020). Ademais, utilizando como inspiração trabalhos desenvolvidos para combater patógenos resistentes a diversas drogas, podemos supor a utilização dos nossos peptídeos na geração de biconjugados com atividade leishmanicida. Em um recente trabalho, um peptídeo híbrido PA2-GNU7, foi desenvolvido combinando um peptídeo de alta afinidade descoberto via *phage display*, PA2, com um peptídeo antimicrobiano GNU7. Tal híbrido une as duas características (afinidade e capacidade antimicrobiana) e se mostrou apto a eliminar células de *P. aeruginosa* de maneira seletiva e com baixa níveis de toxicidade (KIM; JANG; KIM; CHO, 2020). Sendo assim, a mesma abordagem pode ser testada no futuro, utilizando nosso peptídeo como uma ferramenta de *drug delivery* para tornar tratamentos existentes mais seletivos.

8 Conclusões

O nosso projeto teve como objetivo identificar peptídeos com afinidade às superfícies de diferentes espécies de *Leishmania* que pudessem contribuir no combate e prevenção das leishmanioses, grupo de doenças que afeta milhões de pessoas e que ainda carece de tratamentos e prevenções efetivas. Para tanto, utilizamos a técnica de *phage display* utilizando promastigotas metacíclicas de três diferentes espécies de *Leishmania* como alvo do processo de *biopanning*. Além disso, testamos a capacidade dos peptídeos selecionados em reduzir a taxa de infecção de macrófagos do tipo THP-1 por *Leishmania* spp.

Os testes de *biopanning* nos forneceram fagos recombinantes com alta afinidade para as diferentes espécies de *Leishmania*, entretanto, não observamos a presença de nenhum fago recombinante universal à todas as espécies estudadas. A afinidade dos fagos com a superfície dos parasitas foi confirmada qualitativamente via estudos de fluorescência. Já a capacidade de tais fagos de reduzir a taxa de infecção em macrófagos foi analisada em testes de inibição *in vitro*. Experimentos análogos foram realizados com peptídeos sintéticos com as sequências peptídicas expressas pelos fagos recombinantes. A similaridade da taxa de redução de infecção com peptídeos sintéticos ou fagos recombinantes nos permitiu refutar a hipótese de que a atividade inibitória observada pelos fagos seria consequência de impedimento estérico, mostrando que tal atividade está ligada a interação *Leishmania*-peptídeo.

Utilizando tal procedimento, nosso trabalho foi capaz de identificar dois candidatos: o peptídeo selecionado durante testes de *biopanning* com *L. infantum* (Li1) e o selecionado no procedimento com *L. amazonensis* (La1). Enquanto o peptídeo La1 se mostrou capaz de reduzir a taxa de infecção em macrófagos somente por *L. amazonensis*, o peptídeo sintético Li1 apresentou inibição da taxa de infecção para *L. infantum* e *L. amazonensis*. Nossos experimentos *in vivo* corroboraram os resultados *in vitro* sobre a capacidade inibitória do peptídeo Li1 contra a *L. infantum*, causadora da leishmaniose visceral. Os resultados *in vivo*, reforçam a capacidade de nossa pesquisa em contribuir no âmbito de ciência aplicada. Além disso, por termos identificado dois peptídeos, um específico a *L. amazonensis* e o outro capaz de afetar diversas espécies, nossa pesquisa abre portas para novos projetos que consigam elucidar mecanismos universais ou específicos de infecção em macrófagos, o que pode contribuir para a ciência básica da interação hospedeiro-parasita.

9 Referências Bibliográficas

- ABEDON, S. T.; DANIS-WLODARCZYK, K. M.; WOZNIAK, D. J.; SULLIVAN, M. B. Improving Phage-Biofilm In Vitro Experimentation. **Viruses**, 13, n. 6, Jun 19 2021.
- ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; MORTARA, R. A.; TEDESCO, R. C. *et al.* Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**, 128, n. 4, p. 385-390, 2004.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**, 17, p. 593-623, 1999.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016.
- AKILOV, O. E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol**, 46, n. 2, p. 132-142, Feb 2007.
- AL-KHALAIFAH, H. S. Major Molecular Factors Related to *Leishmania* Pathogenicity. **Front Immunol**, 13, p. 847797, 2022.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J Immunol**, 161, n. 12, p. 6794-6801, Dec 15 1998.
- ALEXANDRE, J.; SADLOVA, J.; LESTINOVA, T.; VOJTKOVA, B. *et al.* Experimental infections and coinfections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 3566, 2020/02/27 2020.
- ALFALEH, M. A.; ALSAAB, H. O.; MAHMOUD, A. B.; ALKAYYAL, A. A. *et al.* Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. **Front Immunol**, 11, p. 1986, 2020.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, n. 3, p. 403-410, 1990/10/05/ 1990.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immun**, 58, n. 3, p. 779-787, Mar 1990.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol**, 6, n. 10, p. 392-401, Oct 1998.
- BADIRZADEH, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; ABDOSAMADI, Z. *et al.* Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11, n. 7, p. e0005774, 2017.
- BAILEY, T. L.; BODEN, M.; BUSKE, F. A.; FRITH, M. *et al.* MEME Suite: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, 37, n. suppl_2, p. W202-W208, 2009.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007/08/01/ 2007.

- BATES, P. A.; ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Expression of cysteine proteinases by metacyclic promastigotes of *Leishmania mexicana*. **J Eukaryot Microbiol**, 41, n. 3, p. 199-203, May-Jun 1994.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**, 4, n. 6, p. 601-609, Sep 2004.
- BATISTA, M. F.; NÁJERA, C. A.; MENEGHELLI, I.; BAHIA, D. The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. **Front Cell Dev Biol**, 8, p. 396, 2020.
- BILGIC-TEMEL, A.; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. **Int J Womens Dermatol**, 5, n. 3, p. 158-165, Jul 2019.
- BONNYCASTLE, L. L.; MEHROKE, J. S.; RASHED, M.; GONG, X. *et al.* Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. **J Mol Biol**, 258, n. 5, p. 747-762, May 24 1996.
- BRAS-GONÇALVES, R.; PETITDIDIER, E.; PAGNIEZ, J.; VEYRIER, R. *et al.* Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*. **Infection, Genetics and Evolution**, 24, p. 1-14, 2014/06/01/ 2014.
- BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitology today**, 12, p. 444-447, 1996.
- CHA, S.-J.; KIM, M.-S.; NA, C. H.; JACOBS-LORENA, M. Plasmodium sporozoite phospholipid scramblase interacts with mammalian carbamoyl-phosphate synthetase 1 to infect hepatocytes. **Nature Communications**, 12, n. 1, p. 6773, 2021/11/19 2021.
- CHA, S. J.; KIM, M. S.; PANDEY, A.; JACOBS-LORENA, M. Identification of GAPDH on the surface of Plasmodium sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. **J Exp Med**, 213, n. 10, p. 2099-2112, Sep 19 2016.
- CHA, S. J.; PARK, K.; SRINIVASAN, P.; SCHINDLER, C. W. *et al.* CD68 acts as a major gateway for malaria sporozoite liver infection. **J Exp Med**, 212, n. 9, p. 1391-1403, Aug 24 2015.
- CLEMENTINO, L. D. C.; ODA, F. B.; TEIXEIRA, T. R.; TAVARES, R. S. N. *et al.* The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. **Natural Product Research**, 35, n. 23, p. 5470-5474, 2021/12/02 2021.
- COELHO, V. T. S.; OLIVEIRA, J. S.; VALADARES, D. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. *et al.* Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like *Leishmania* Using an Immunoproteomic Approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 6, n. 1, p. e1430, 2012.
- COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. **Curr Opin Infect Dis**, 28, n. 5, p. 426-437, Oct 2015.
- COSTA-DA-SILVA, A. C.; NASCIMENTO, D. D.; FERREIRA, J. R. M.; GUIMARÃES-PINTO, K. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 7, n. 4, 2022.
- DA SILVA, I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; PEREIRA, L. I. D. A. *et al.* *In Vitro* Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed Research International**, 2015, p. 393049, 2015/01/28 2015.

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infection and immunity**, 55, n. 11, p. 2802-2806, 1987.

DE BRITO, R. C. F.; CARDOSO, J. M. D. O.; REIS, L. E. S.; VIEIRA, J. F. *et al.* Peptide Vaccines for Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, 9, 2018. Review.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit Vectors**, 9, p. 264, May 4 2016.

DE PAULA, J. I.; LOPES-TORRES, E. J.; JACOBS-LORENA, M.; PAES, M. C. *et al.* The Screen of a Phage Display Library Identifies a Peptide That Binds to the Surface of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes and Impairs Their Infection of Mammalian Cells. **Frontiers in Microbiology**, 13, 2022-March-10 2022. Original Research.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, 5, n. 1, p. 276, 2012/12/03 2012.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M. Insights into *Leishmania* Molecules and Their Potential Contribution to the Virulence of the Parasite. **Vet Sci**, 8, n. 2, Feb 20 2021.

FALCÃO DE OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, A. G. D.; ARRUDA, C. C. P. D.; FERNANDES, W. D. S. *et al.* Spatio-temporal modeling of visceral leishmaniasis in Midwest Brazil: An ecological study of 18-years data (2001–2018). **PLOS ONE**, 15, n. 10, p. e0240218, 2020.

FERNÁNDEZ COTRINA, J.; INIESTA, V.; MONROY, I.; BAZ, V. *et al.* A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**, 36, n. 15, p. 1972-1982, Apr 5 2018.

FERREIRA, B. A.; COSER, E. M.; SABORITO, C.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H. *et al.* In vitro miltefosine and amphotericin B susceptibility of strains and clinical isolates of *Leishmania* species endemic in Brazil that cause tegumentary leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, 246, p. 108462, 2023/03/01/ 2023.

FERREIRA, L. T.; RODRIGUES, J.; CASSIANO, G. C.; TAVELLA, T. A. *et al.* Computational Chemogenomics Drug Repositioning Strategy Enables the Discovery of Epirubicin as a New Repurposed Hit for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 64, n. 9, p. e02041-02019, 2020.

FERREIRA-PAES, T.; CHARRET, K. D. S.; RIBEIRO, M. R. D. S.; RODRIGUES, R. F. *et al.* Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. **PLOS ONE**, 15, n. 12, p. e0230545, 2020.

FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. **MAbs**, 8, n. 7, p. 1177-1194, Oct 2016.

GHOSH, A. K.; RIBOLLA, P. E. M.; JACOBS-LORENA, M. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98, n. 23, p. 13278-13281, 2001/11/06 2001.

GONZÁLEZ-MORA, A.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; IQBAL, H. M. N.; RITO-PALOMARES, M. *et al.* Bacteriophage-Based Vaccines: A Potent Approach for Antigen Delivery. **Vaccines (Basel)**, 8, n. 3, Sep 4 2020.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infection and immunity**, 61, n. 4, p. 1553-1558, 1993.

- GÁBOR, E. T.; ANDRÁS, Z.; ZSÓFIA, E. K.; MARIE, F. *et al.* LeishMANIAdb: an integrative structural resource of Leishmania proteins. **bioRxiv**, p. 2023.2003.2008.531706, 2023.
- HALDER, A.; SANNIGRAHI, A.; DE, N.; CHATTOPADHYAY, K. *et al.* Kinetoplastid Membrane Protein-11 Induces Pores in Anionic Phospholipid Membranes: Effect of Cholesterol. **Langmuir**, 36, n. 13, p. 3522-3530, 2020/04/07 2020.
- HALL, A. R.; BLAKEMAN, J. T.; EISSA, A. M.; CHAPMAN, P. *et al.* Glycan–glycan interactions determine Leishmania attachment to the midgut of permissive sand fly vectors. **Chemical Science**, 11, n. 40, p. 10973-10983, 2020.
- HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, 27, n. 9, p. 403-409, 2011/09/01/ 2011.
- HAY, I. D.; LITHGOW, T. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. **EMBO Rep**, 20, n. 6, Jun 2019.
- HIDE, M.; BAÑULS, A. L. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the Leishmania (Leishmania) donovani complex. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 102, n. 2, p. 105-106, Feb 2008.
- HORTA, M. F.; ANDRADE, L. O.; MARTINS-DUARTE É, S.; CASTRO-GOMES, T. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **J Cell Sci**, 133, n. 4, Feb 20 2020.
- HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 56, n. 9, p. 4569-4582, Sep 2012.
- IBORRA, S.; SOLANA, J. C.; REQUENA, J. M.; SOTO, M. Vaccine candidates against leishmania under current research. **Expert Rev Vaccines**, 17, n. 4, p. 323-334, Apr 2018.
- IKEOGU, N. M.; AKALUKA, G. N.; EDECHI, C. A.; SALAKO, E. S. *et al.* Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. **Microorganisms**, 8, n. 8, p. 1201, 2020.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr Opin Hematol**, 7, n. 1, p. 26-31, Jan 2000.
- KAUSHAL, R. S.; NAIK, N.; PRAJAPATI, M.; RANE, S. *et al.* Leishmania species: A narrative review on surface proteins with structural aspects involved in host–pathogen interaction. **Chemical Biology & Drug Design**, 2023.
- KAYE, P. M.; CRUZ, I.; PICADO, A.; VAN BOCXLAER, K. *et al.* Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. **Seminars in Immunopathology**, 2020/03/09 2020.
- KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, 133, n. S2, p. S87-S112, 2006.
- KIM, H.; JANG, J. H.; KIM, S. C.; CHO, J. H. Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of Pseudomonas aeruginosa. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 185, p. 111814, 2020/01/01/ 2020.
- KOLÁŘOVÁ, I.; VALIGUROVÁ, A. Hide-and-Seek: A Game Played between Parasitic Protists and Their Hosts. **Microorganisms**, v.9, n. 12, DOI: 10.3390/microorganisms9122434.

- LEMOS-SILVA, T.; TELLERIA, E. L.; TRAUB-CSEKÖ, Y. M. The gene expression of *Leishmania infantum* chagasi inside *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 116, 2021.
- LI, C.; GAO, N.; XUE, Q.; MA, N. *et al.* Screening and identification of a specific peptide binding to cervical cancer cells from a phage-displayed peptide library. **Biotechnology Letters**, 39, n. 10, p. 1463-1469, 2017/10/01 2017.
- LIU, D.; UZONNA, J. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2, 2012-June-12 2012. Review.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *In: Methods*. United States: 2001 Elsevier Science (USA). 2001. v. 25, p. 402-408.
- LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; CHICHARRO, C. *et al.* Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. 2014.
- LUDOLF, F.; RAMOS, F. F.; COELHO, E. A. F. Immunoproteomics and phage display in the context of leishmaniasis complexity. **Frontiers in Immunology**, 14, p. 1112894, 2023.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 4, p. 84-95, 1912.
- LØSET, G. Å.; ROOS, N.; BOGEN, B.; SANDLIE, I. Expanding the Versatility of Phage Display II: Improved Affinity Selection of Folded Domains on Protein VII and IX of the Filamentous Phage. **PLOS ONE**, 6, n. 2, p. e17433, 2011.
- MACHADO, G.; ALVAREZ, J.; BAKKA, H. C.; PEREZ, A. *et al.* Revisiting area risk classification of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, 19, n. 1, p. 2, 2019/01/03 2019.
- MACHADO, J. M.; COSTA, L. E.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F. *et al.* Diagnostic markers selected by immunoproteomics and phage display applied for the serodiagnosis of canine leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, 126, p. 4-8, 2019/10/01/ 2019.
- MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L. H.; VILLASBOAS, L. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, 4, n. 12, p. e912, Dec 21 2010.
- MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; MCKERROW, J. H. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. **Exp Parasitol**, 106, n. 3-4, p. 158-163, Mar-Apr 2004.
- MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, 8, n. 2, p. 121-132, 2021/06/01 2021.
- MAZUMDER, S.; SINHA, A.; GHOSH, S.; SHARMA, G. C. *et al.* *Leishmania* LPG interacts with LRR5/LRR6 of macrophage TLR4 for parasite invasion and impairs the macrophage functions. **Pathogens and Disease**, 81, p. fad019, 2023.
- MCCONVILLE, M. J.; BLACKWELL, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. **Journal of Biological Chemistry**, 266, n. 23, p. 15170-15179, 1991.

- MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P. *et al.* Proteases in parasitic diseases. **Annu Rev Pathol**, 1, p. 497-536, 2006.
- MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S. *et al.* Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, 41, n. W1, p. W597-W600, 2013.
- MERCADO-CAMARGO, J.; CERVANTES-CEBALLOS, L.; VIVAS-REYES, R.; PEDRETTI, A. *et al.* Homology Modeling of Leishmanolysin (gp63) from *Leishmania panamensis* and Molecular Docking of Flavonoids. **ACS Omega**, 5, n. 24, p. 14741-14749, Jun 23 2020.
- MERIDA-DE-BARROS, D. A.; CHAVES, S. P.; BELMIRO, C. L. R.; WANDERLEY, J. L. M. Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy? **Parasites & Vectors**, 11, n. 1, p. 536, 2018/10/03 2018.
- MIRANDA, L. F. C.; PACHECO, R. D. S.; PIMENTEL, M. I. F.; SALGUEIRO, M. M. *et al.* Geospatial analysis of tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: Species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 11, p. e0007748, Nov 2019.
- MOAFI, M.; REZVAN, H.; SHERKAT, R.; TALEBAN, R. Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. **Int J Prev Med**, 10, p. 95, 2019.
- MOREIRA, D.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J. *et al.* Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 1, p. e1469, Jan 2012.
- MORENO, J.; VOULDOUKIS, I.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D. *et al.* Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 6, p. e1683, 2012.
- MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A. S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC Molecular Biology**, 6, n. 1, p. 3, 2005/02/03 2005.
- NDJAMEN, B.; KANG, B. H.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cell Microbiol**, 12, n. 10, p. 1480-1494, Oct 2010.
- NICOLLE, C. Sur trois cas d'infection splénique infantile a corps de Leishman observes en Tunisia. **Archives de l'Institut Pasteur**, 3, p. 1-26, 1908.
- NIXON, A. E.; SEXTON, D. J.; LADNER, R. C. Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. **MAbs**, 6, n. 1, p. 73-85, Jan-Feb 2014.
- 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. **Experimental Parasitology**, 218, p. 107964, 2020/11/01/ 2020.
- ORGANIZATION, W. H. **Leishmaniasis Geneva: WHO**. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, 2023. Acesso em: Nov 26 2023.
- PAHO, O. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838> 2019.
- PAHO/WHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. 2017.

- PALATNIK, C. B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infection and immunity**, 57, n. 3, p. 754-763, 1989.
- PALMA, M. Aspects of Phage-Based Vaccines for Protein and Epitope Immunization. **Vaccines (Basel)**, 11, n. 2, Feb 14 2023.
- PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, 28, n. 6, p. 849-858, 2010/11/01/ 2010.
- PARANAÍBA, L. F.; DE ASSIS, R. R.; NOGUEIRA, P. M.; TORRECILHAS, A. C. *et al.* *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. **Parasites & Vectors**, 8, n. 1, p. 31, 2015/01/17 2015.
- PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol Rev**, 213, p. 159-179, Oct 2006.
- PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321, n. 5891, p. 970-974, Aug 15 2008.
- PETRENKO, V. Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. **Expert opinion on drug delivery**, 5, n. 8, p. 825-836, 2008.
- PETRENKO, V. A. Landscape Phage: Evolution from Phage Display to Nanobiotechnology. **Viruses**, 10, n. 6, Jun 7 2018.
- PETROPOLIS, D. B.; RODRIGUES, J. C.; VIANA, N. B.; PONTES, B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. **PeerJ**, 2, p. e317, 2014.
- PISSARRA, J.; PAGNIEZ, J.; PETITDIDIER, E.; SÉVENO, M. *et al.* Proteomic Analysis of the Promastigote Secretome of Seven *Leishmania* Species. **Journal of Proteome Research**, 21, n. 1, p. 30-48, 2022/01/07 2022.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, 10, n. 1, p. 111-129, 2015/01/01 2015.
- RABELLO, A.; GERMANO, A. M. T.; MIRANDA, A. B. D. **Leishmaniose visceral : recomendações clínicas para redução da letalidade**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2011.
- RATNAPRIYA, S.; KEERTI; SAHASRABUDDHE, A. A.; DUBE, A. Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. **Vaccine**, 37, n. 27, p. 3505-3519, 2019/06/12/ 2019.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, 7, n. 9, p. 581-596, Sep 2007.
- RHAIEM, R. B.; HOUIMEL, M. Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Tropica**, 159, p. 11-19, 2016/07/01/ 2016.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C. A. *et al.* Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, 172, n. 7, p. 4454, 2004.

- ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, 124, n. 5, p. 495-507, 2002.
- SAKANARI, J. A.; NADLER, S. A.; CHAN, V. J.; ENGEL, J. C. *et al.* *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. **Exp Parasitol**, 85, n. 1, p. 63-76, Jan 1997.
- SALLES, B. C.; COSTA, L. E.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C. *et al.* *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 87, n. 3, p. 219-225, Mar 2017.
- SANDOVAL PACHECO, C. M.; ARAUJO FLORES, G. V.; FAVERO FERREIRA, A.; SOSA OCHOA, W. *et al.* Histopathological features of skin lesions in patients affected by non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. **Int J Exp Pathol**, 99, n. 5, p. 249-257, Oct 2018.
- SATTAR, S.; BENNETT, N. J.; WEN, W. X.; GUTHRIE, J. M. *et al.* Ff-nano, short functionalized nanorods derived from Ff (f1, fd, or M13) filamentous bacteriophage. **Front Microbiol**, 6, p. 316, 2015.
- SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, 6, n. 8, p. 1035-1046, Aug 15 1998.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 9, p. 581-592, Sep 2016.
- SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; DEY, R.; KISSINGER, R. *et al.* Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends Parasitol**, 37, n. 11, p. 976-987, Nov 2021.
- SERAFIM, T. D.; FIGUEIREDO, A. B.; COSTA, P. A.; MARQUES-DA-SILVA, E. A. *et al.* *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 9, p. e1833, 2012.
- SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B. A.; RIBEIRO-GUIMARÃES, M. L.; ALVES, C. R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasit Vectors**, 5, p. 160, Aug 7 2012.
- SINGH, J.; KHAN, M. I.; SINGH YADAV, S. P.; SRIVASTAVA, A. *et al.* L-Asparaginase of *Leishmania donovani*: Metabolic target and its role in Amphotericin B resistance. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, 7, n. 3, p. 337-349, Dec 2017.
- SIQUEIRA-NETO, J. L.; DEBNATH, A.; MCCALL, L.-I.; BERNATCHEZ, J. A. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 12, n. 8, p. e0006512, 2018.
- SMEAL, S. W.; SCHMITT, M. A.; PEREIRA, R. R.; PRASAD, A. *et al.* Simulation of the M13 life cycle I: Assembly of a genetically-structured deterministic chemical kinetic simulation. **Virology**, 500, p. 259-274, 2017/01/01/ 2017.
- SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A Lipophosphoglycan-Independent Method for Isolation of Infective *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Density Gradient Centrifugation. **Experimental Parasitology**, 99, n. 2, p. 97-103, 2001/10/01/ 2001.
- STAQUICINI, D. I.; TANG, F. H. F.; MARKOSIAN, C.; YAO, V. J. *et al.* Design and proof of concept for targeted phage-based COVID-19 vaccination strategies with a streamlined cold-free supply chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 118, n. 30, p. e2105739118, 2021/07/27 2021.
- STENT, G. S. Molecular biology of bacterial viruses. **Molecular biology of bacterial viruses.**, 1963.

- STIERHOF, Y.-D.; BATES, P. A.; JACOBSON, R. L.; ROGERS, M. E. *et al.* Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European Journal of Cell Biology**, 78, n. 10, p. 675-689, 1999/10/01/ 1999.
- SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, 7, n. 9, p. 170165, 2017.
- TEDESCO, S.; DE MAJO, F.; KIM, J.; TRENTI, A. *et al.* Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? **Frontiers in Pharmacology**, 9, 2018-February-22 2018. Original Research.
- TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg**, 52, n. 3, p. 287-292, Mar 1995.
- TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, 6, p. 750, 2017.
- UENO, N.; BRATT, C. L.; RODRIGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. **Cellular Microbiology**, 11, n. 12, p. 1827-1841, 2009/12/01 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01374.x>.
- UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol**, 28, n. 8, p. 335-344, Aug 2012.
- VALE, E. C. S. D.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 80, p. 421-428, 2005.
- VALERO, N. N. H.; PRIST, P.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors for visceral and cutaneous leishmaniasis in São Paulo, Brazil. **Science of The Total Environment**, 797, p. 148960, 2021/11/25/ 2021.
- VAN WEZENBEEK, P. M. G. F.; HULSEBOS, T. J. M.; SCHOENMAKERS, J. G. G. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. **Gene**, 11, n. 1, p. 129-148, 1980/10/01/ 1980.
- WANG, Z.; WANG, G.; LU, H.; LI, H. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Molecular Biomedicine**, 3, n. 1, p. 35, 2022/11/22 2022.
- WELLS, A.; NUSCHKE, A.; YATES, C. C. Skin tissue repair: Matrix microenvironmental influences. **Matrix Biology**, 49, p. 25-36, 2016/01/01/ 2016.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Mol Microbiol**, 79, n. 3, p. 647-662, Feb 2011.
- WHO. **Leishmaniasis Geneva**. 2023. Acesso em: Nov 26 2023.
- WILSON, A. L.; COURTENAY, O.; KELLY-HOPE, L. A.; SCOTT, T. W. *et al.* The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14, n. 1, p. e0007831, 2020.
- WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. **Infection and immunity**, 56, n. 2, p. 363-369, 1988.

WU, C.-H.; LIU, I. J.; LU, R.-M.; WU, H.-C. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of Biomedical Science**, 23, n. 1, p. 8, 2016/01/19 2016.

YADAV, P.; AZAM, M.; RAMESH, V.; SINGH, R. Unusual Observations in Leishmaniasis—An Overview. **Pathogens**, v.12, n. 2, DOI: 10.3390/pathogens12020297.

YAO, C.; CHEN, Y.; SUDAN, B.; DONELSON, J. E. *et al.* Leishmania chagasi: homogenous metacyclic promastigotes isolated by buoyant density are highly virulent in a mouse model. **Exp Parasitol**, 118, n. 1, p. 129-133, Jan 2008.

YENKOIDIOK-DOUTI, L.; WILLIAMS, A. E.; CANEPA, G. E.; MOLINA-CRUZ, A. *et al.* Engineering a Virus-Like Particle as an Antigenic Platform for a Pfs47-Targeted Malaria Transmission-Blocking Vaccine. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 16833, 2019/11/14 2019.


ZABALA-PEÑAFIEL, A.; TODD, D.; DANESHVAR, H.; BURCHMORE, R. The potential of live attenuated vaccines against Cutaneous Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, 210, p. 107849, 2020/03/01/ 2020.

ZUFFEREY, R.; ALLEN, S.; BARRON, T.; SULLIVAN, D. R. *et al.* Ether Phospholipids and Glycosylinositolphospholipids Are Not Required for Amastigote Virulence or for Inhibition of Macrophage Activation by *Leishmania major* *. **Journal of Biological Chemistry**, 278, n. 45, p. 44708-44718, 2003.

ÁVILA, I. R.; DE ARAÚJO, G. R.; BARBOSA, D. S.; BEZERRA, J. M. T. Occurrence of human visceral leishmaniasis in the Central-West region of Brazil: A systematic review. **Acta Tropica**, 237, p. 106707, 2023/01/01/ 2023.

Anexo I. Síntese Química do peptídeo La1

Data Analysis Report

Peptide Name	La1
Sequence	 Biotin-KCRQWWLDSRCG
M.W. (Theoretical)	1762.10 g/mol
Reference No.	158461-001
% of Hydrophobic amino acids	25.00%
% of Acidic amino acids	8.33%
% of Basic amino acids	25.00%
% of Neutral amino acids	41.67%

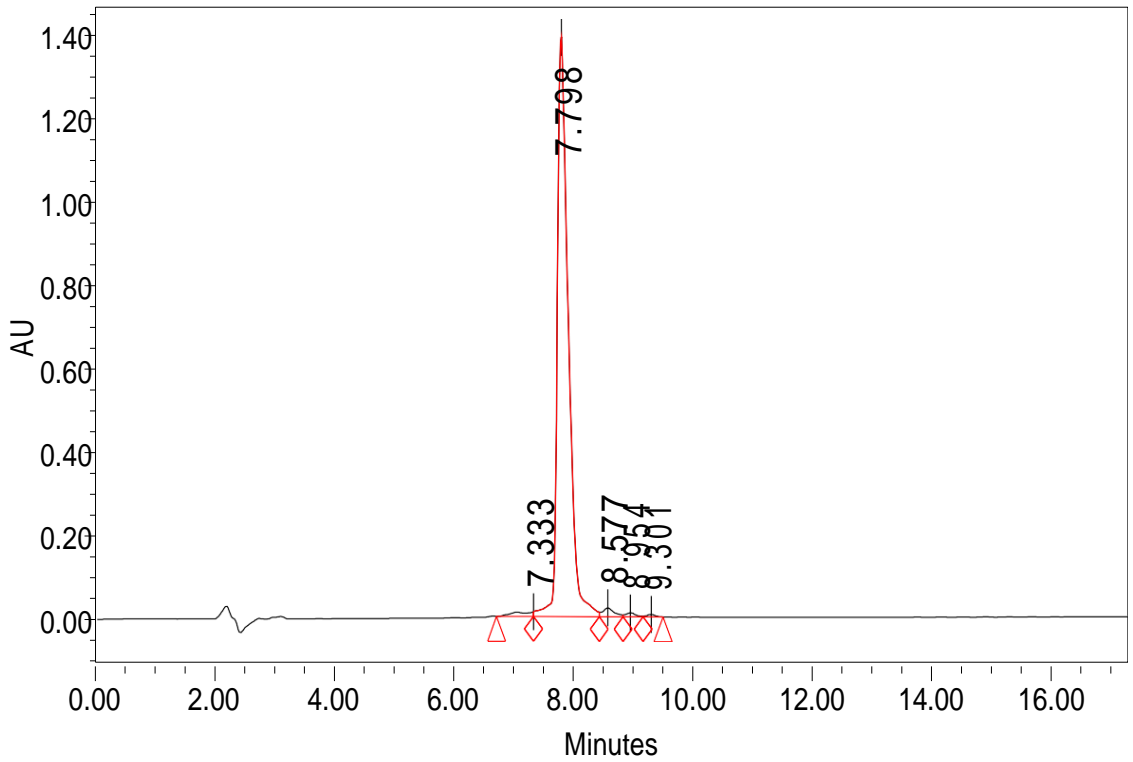
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	20.0 mg
MS (M+H⁺)	1762.92 (see raw data enclosed)
MS (M+Na⁺)	
MS (M+K⁺)	
Purity (HPLC)	96.21% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

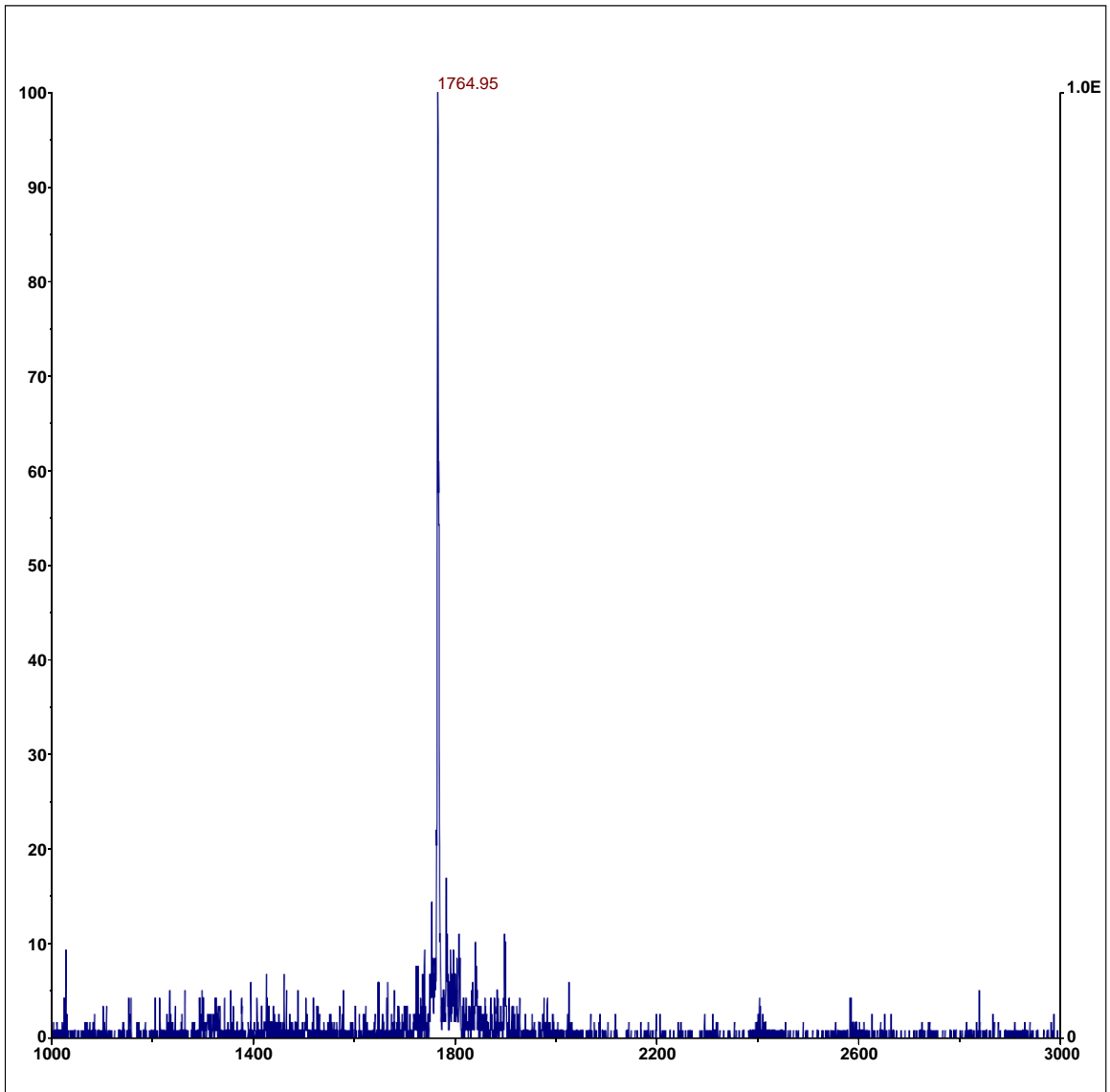
HPLC Column Agela (250×4.6mm I.D.) C18
 Detection wavelength 220 nm
 Gradient 25-43%B in 18 min
 Buffer A 0.05%TFA in H₂O
 Buffer B 0.05%TFA in 90% CH₃CN
 Gradient A B
 0.01 min 75% 25%
 18.0 min 57% 43%
 18.1 min 0% 100%
 28.0 min STOP



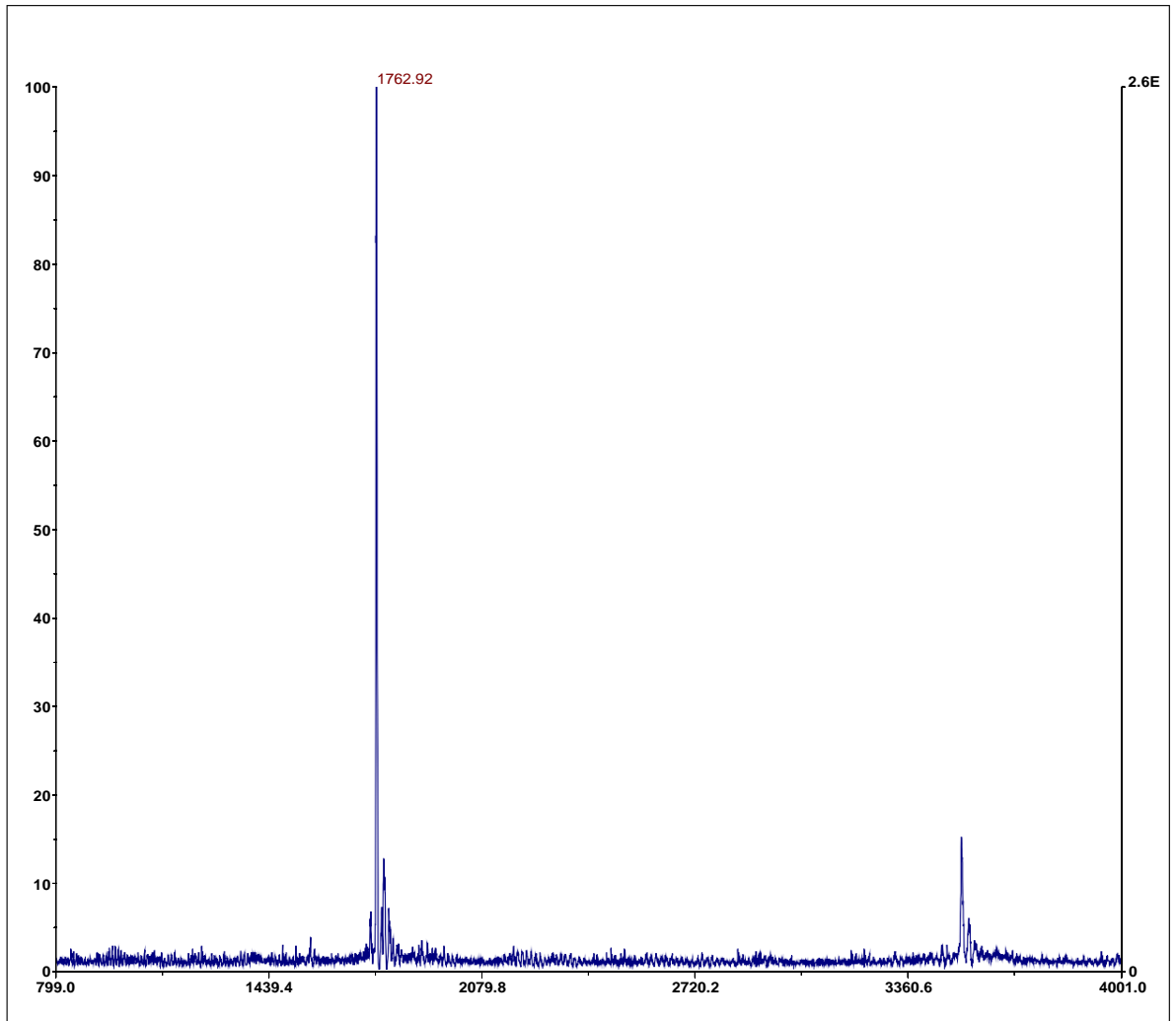
	Retention Time	Area	% Area	Height
1	7.333	248513	1.34	11340
2	7.798	17829847	96.21	1389926
3	8.577	287561	1.55	21182
4	8.954	110507	0.60	9796
5	9.301	56408	0.30	5914

MS Data

Linear:




Cyclized:



Anexo II. Síntese Química do peptídeo Li1

Data Analysis Report

Peptide Name	Li1
Sequence	 Biotin-ECKRARSAPNQN
M.W. (Theoretical)	1572.84 g/mol
Reference No.	158461-002
% of Hydrophobic amino acids	25.00%
% of Acidic amino acids	8.33%
% of Basic amino acids	25.00%
% of Neutral amino acids	41.67%

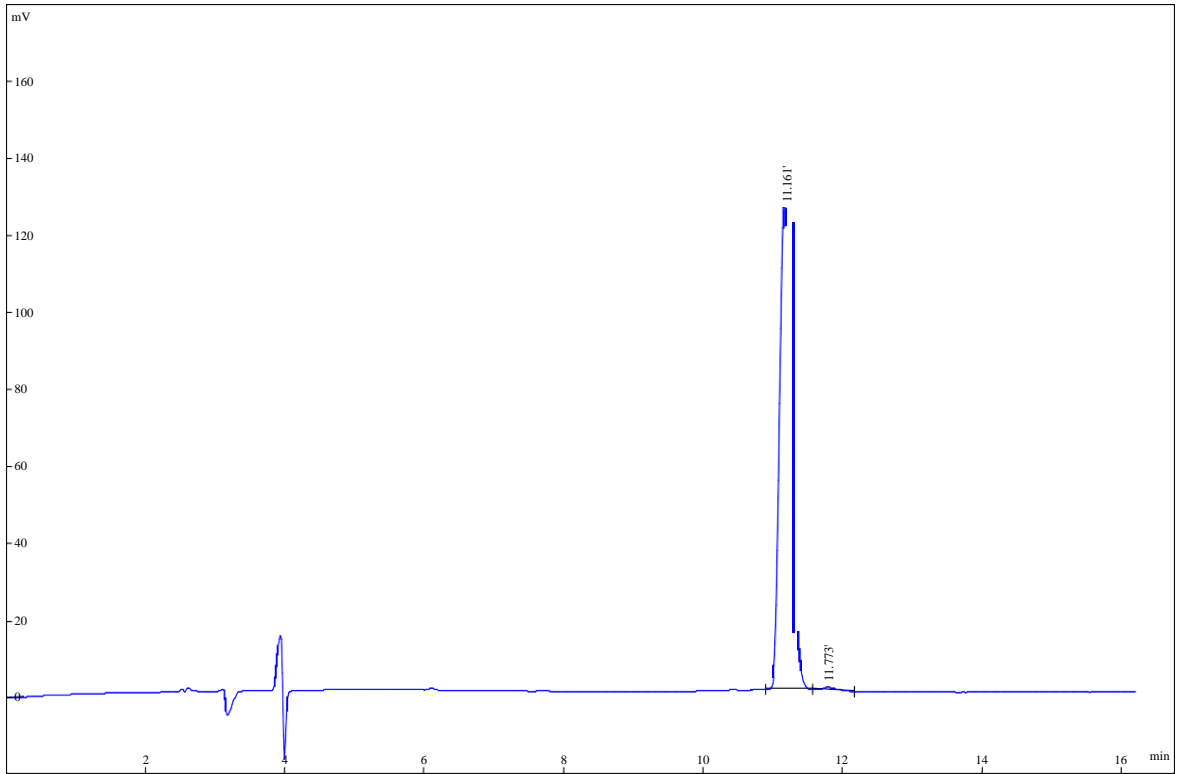
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	20.0 mg
MS (M+H⁺)	1573.19 (see raw data enclosed)
MS (M+Na⁺)	
MS (M+K⁺)	
Purity (HPLC)	99.20% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

HPLC Column Agela (250x4.6mm I.D.) C18
 Detection wavelength 220 nm
 Gradient 8-24%B in 16 min
 Buffer A 0.05%TFA in H₂O
 Buffer B 0.05%TFA in 90% CH₃CN
 Gradient A B
 0.01 min 92% 8%
 16.0 min 76% 24%
 16.1 min 0% 100%
 26.0 min STOP

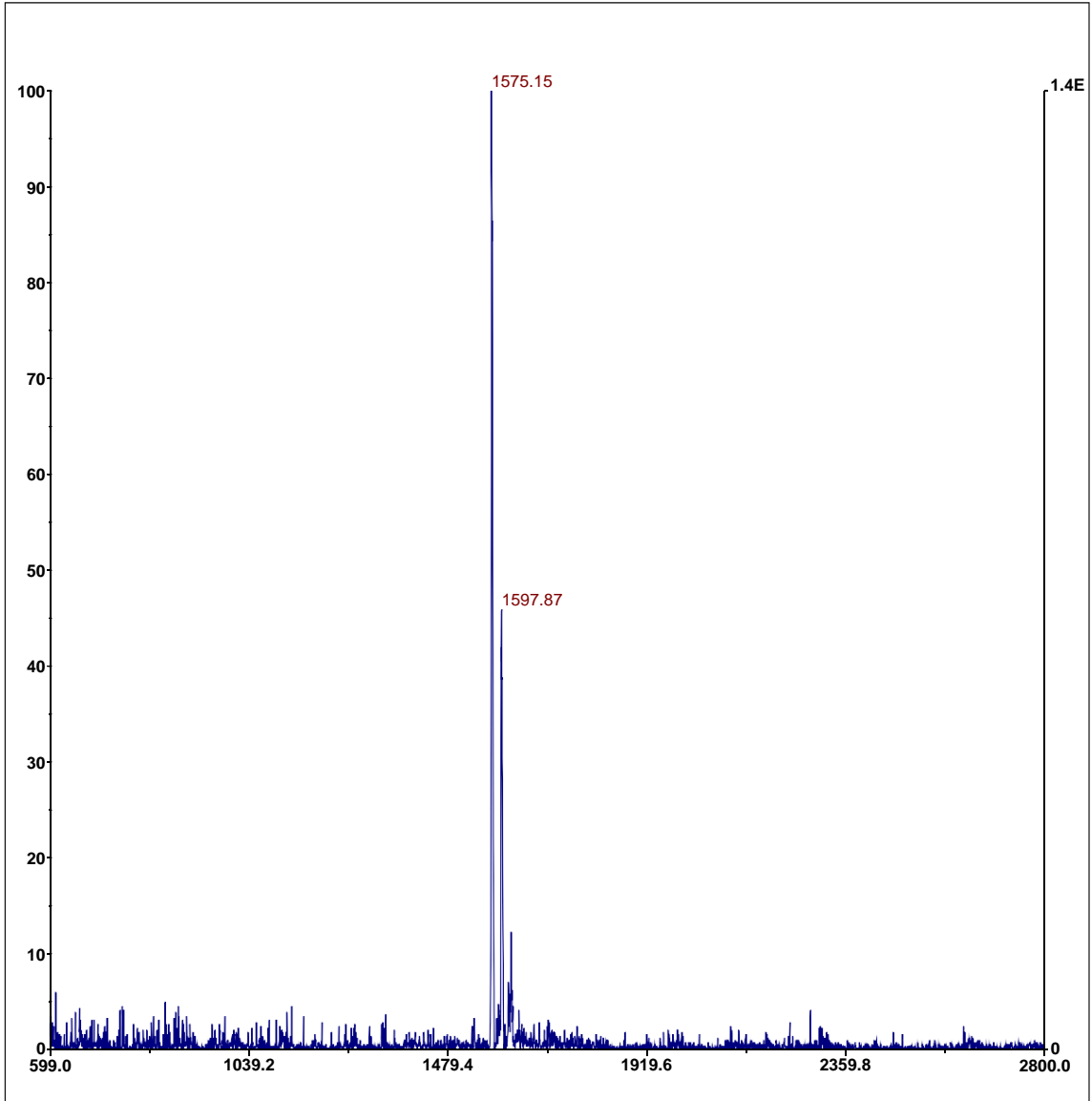


Peak Results

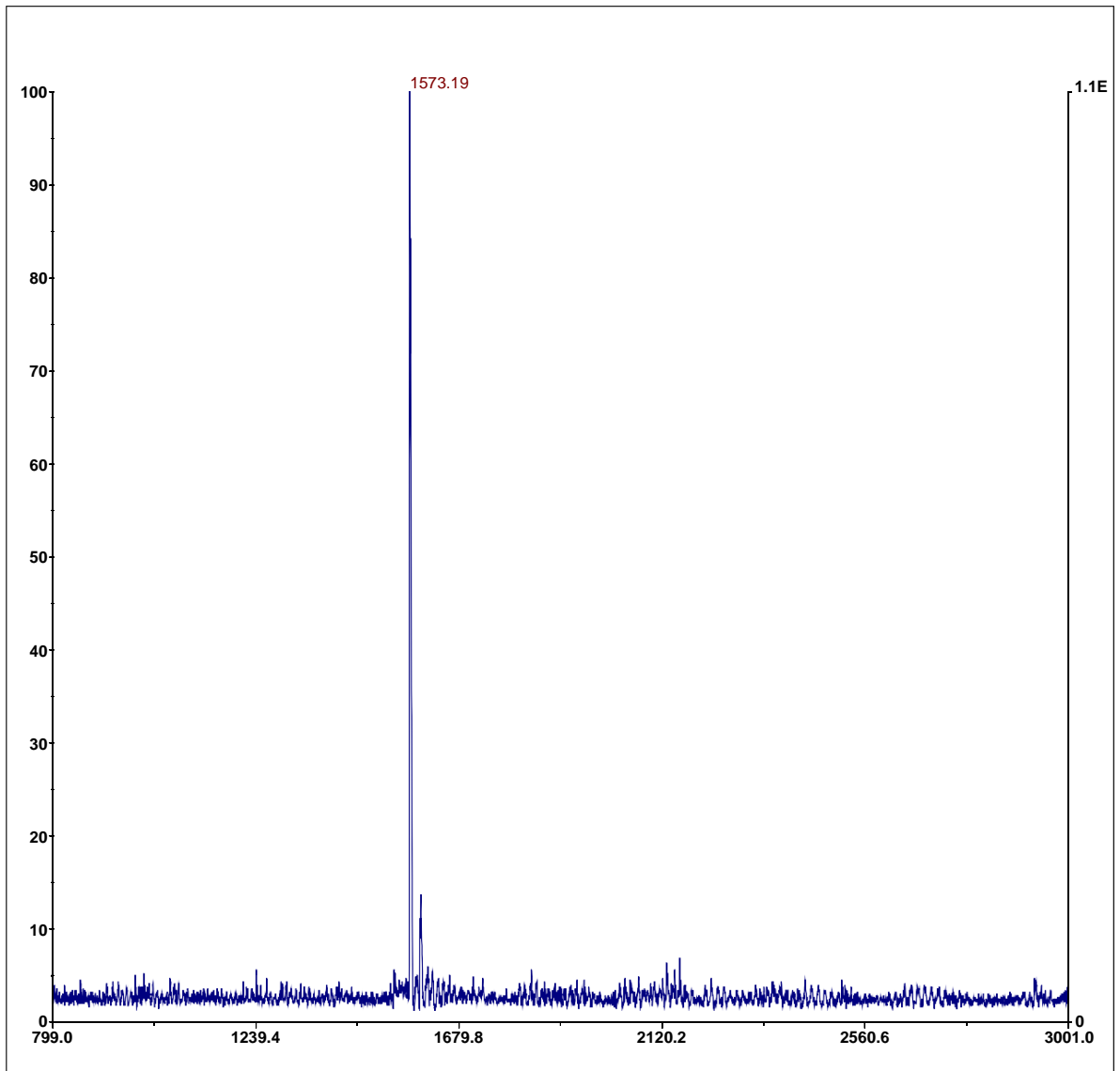
Time	Conc.	Area	Height	Rank
1 11.161	99.2	1424016	125608	
2 11.773	0.8014	11504	795	
Total				
100	1435520	126403		

MS Data

Linear:



Cyclized:



Anexo III. Síntese Química do peptídeo Li1_{SCR}

Data Analysis Report

Peptide Name	Li1Scr
Sequence	$\overbrace{\text{Biotin-ACRKNRESNACP}}$
M.W. (Theoretical)	1572.84 g/mol
Reference No.	158461-004
% of Hydrophobic amino acids	25.00%
% of Acidic amino acids	8.33%
% of Basic amino acids	25.00%
% of Neutral amino acids	41.67%

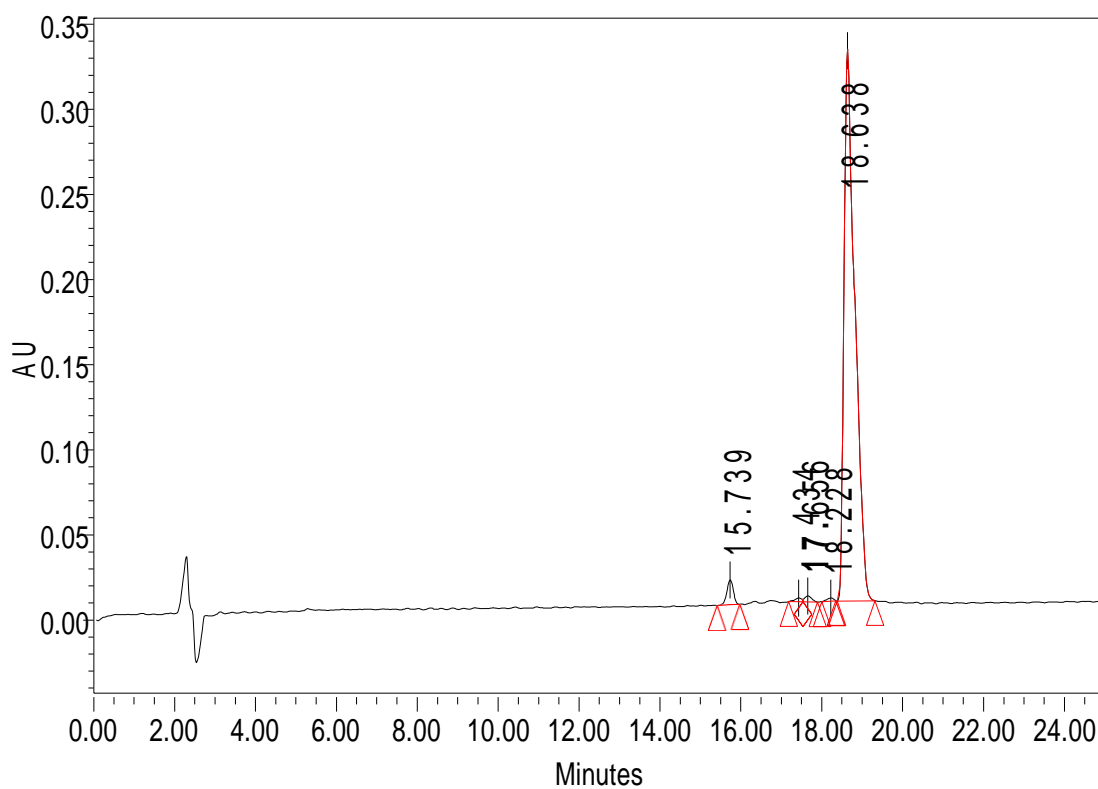
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	20.0 mg
MS (M+H⁺)	1573.66 (see raw data enclosed)
MS (M+Na⁺)	1594.51
MS (M+K⁺)	
Purity (HPLC)	96.02% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

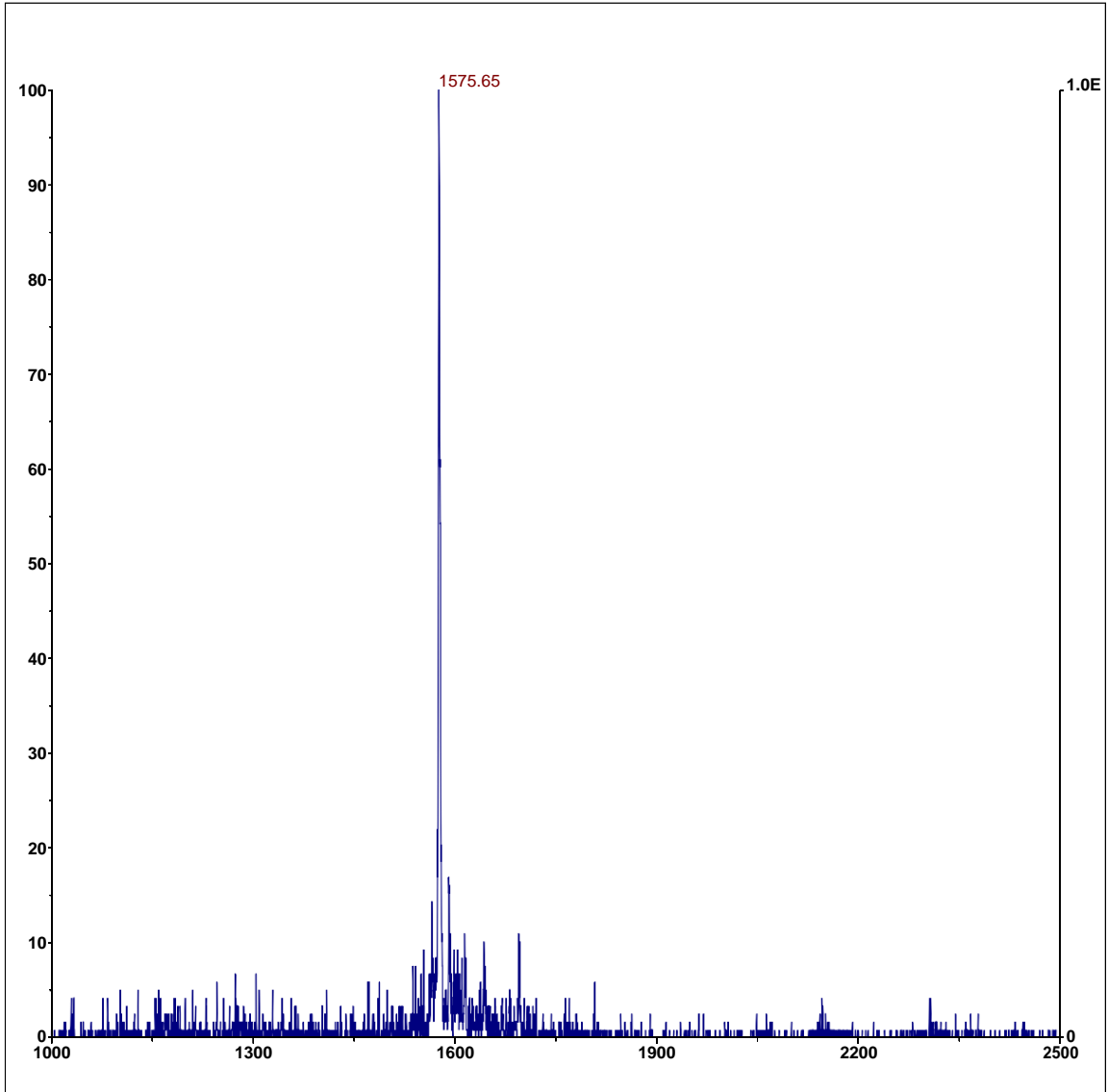
HPLC Column Agela (250x4.6mm I.D.) C18
 Detection wavelength 220 nm
 Gradient 3-28%B in 25 min
 Buffer A 0.05%TFA in H₂O
 Buffer B 0.05%TFA in 90% CH₃CN
 Gradient A B
 0.01 min 97% 3%
 25.0 min 72% 28%
 25.1 min 0% 100%
 35.0 min STOP



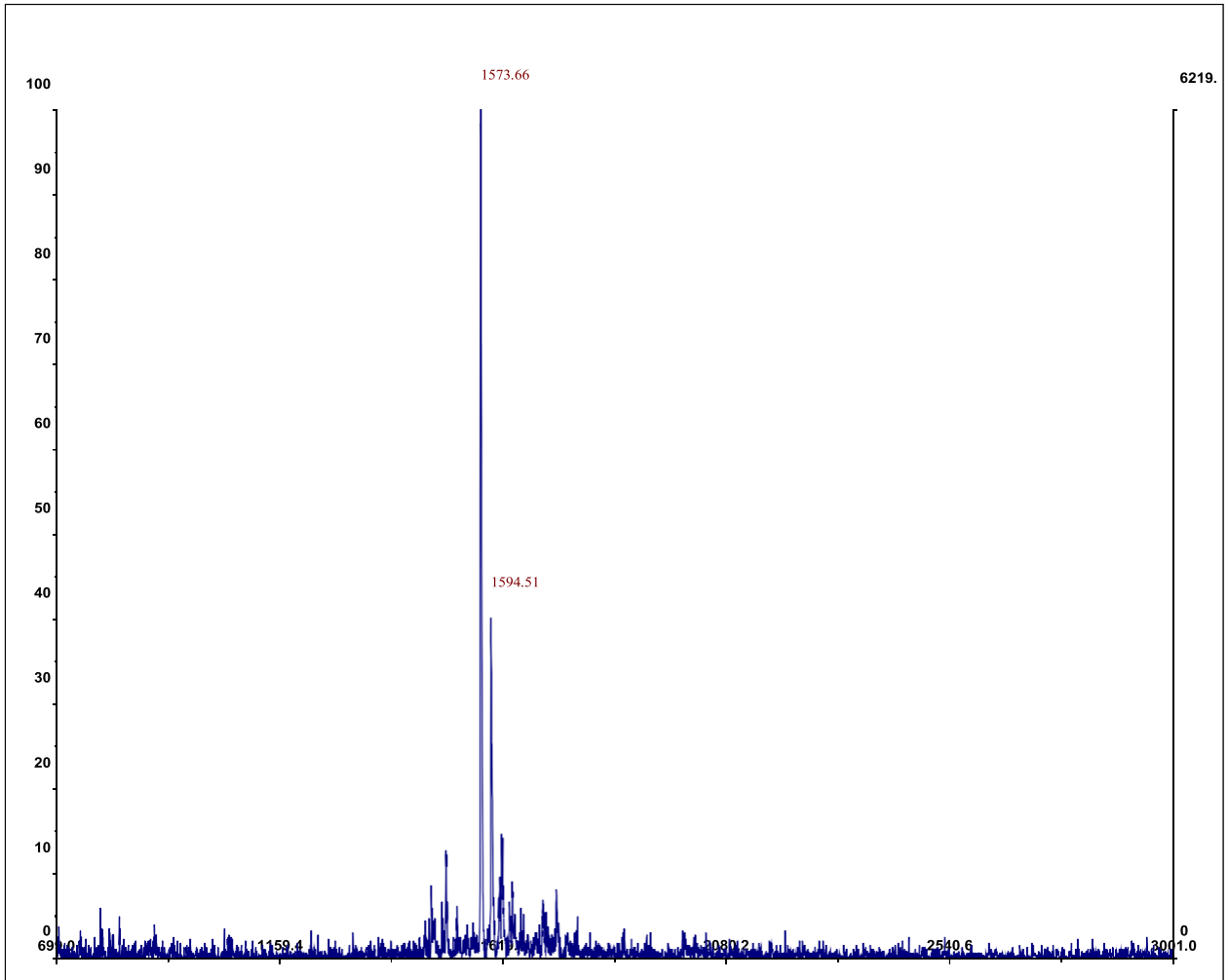
	Retention Time	Area	% Area	Height
1	15.739	163602	2.60	14766
2	17.434	25046	0.40	2120
3	17.656	40771	0.65	3527
4	18.228	20545	0.33	1754
5	18.638	6036788	96.02	324413

MS Data

Linear:




Cyclized:



Anexo IV. Síntese Química do peptídeo Li2

Data Analysis Report

Peptide Name	Li2
Sequence	 Biotin-TCTRKIWPDRCG
M.W. (Theoretical)	1660.00 g/mol
Reference No.	158461-003
% of Hydrophobic amino acids	25.00%
% of Acidic amino acids	8.33%
% of Basic amino acids	25.00%
% of Neutral amino acids	41.67%

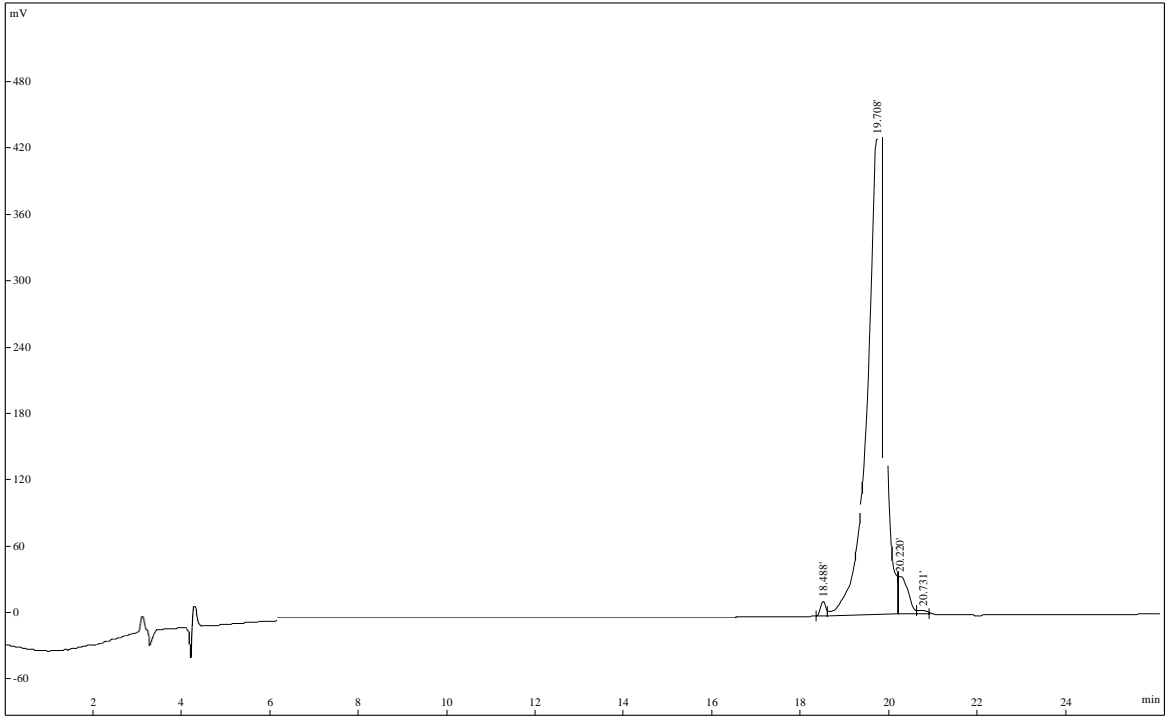
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	20.0 mg
MS (M+H⁺)	1661.69 (see raw data enclosed)
MS (M+Na⁺)	
MS (M+K⁺)	
Purity (HPLC)	95.16% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

HPLC Column Agela (250x4.6mm I.D.) C18
 Detection wavelength 220 nm
 Gradient 10-35%B in 25 min
 Buffer A 0.05%TFA in H₂O
 Buffer B 0.05%TFA in 90% CH₃CN
 Gradient A B
 0.01 min 90% 10%
 25.0 min 65% 35%
 25.1 min 0% 100%
 35.0 min STOP

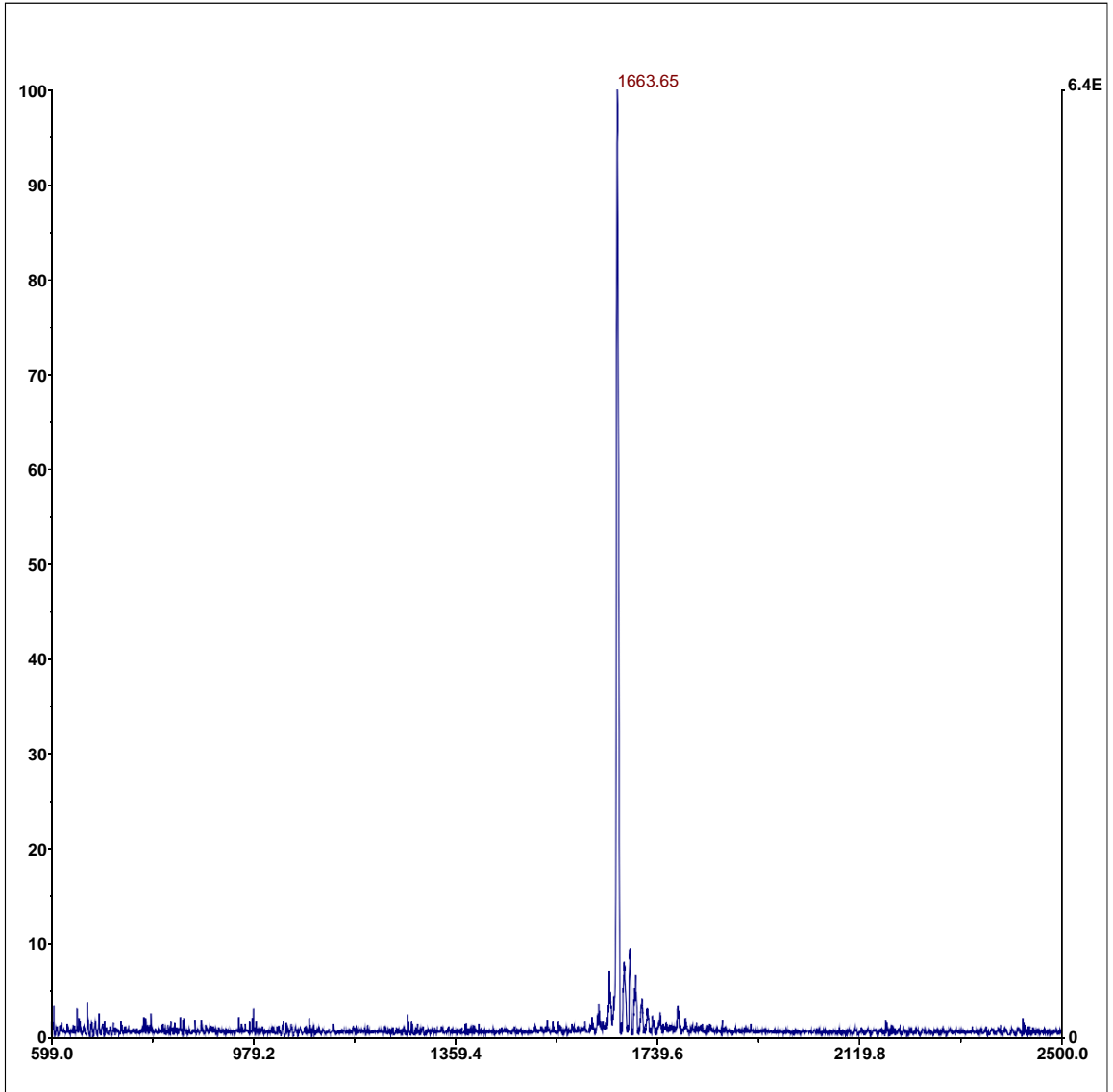


Peak Results

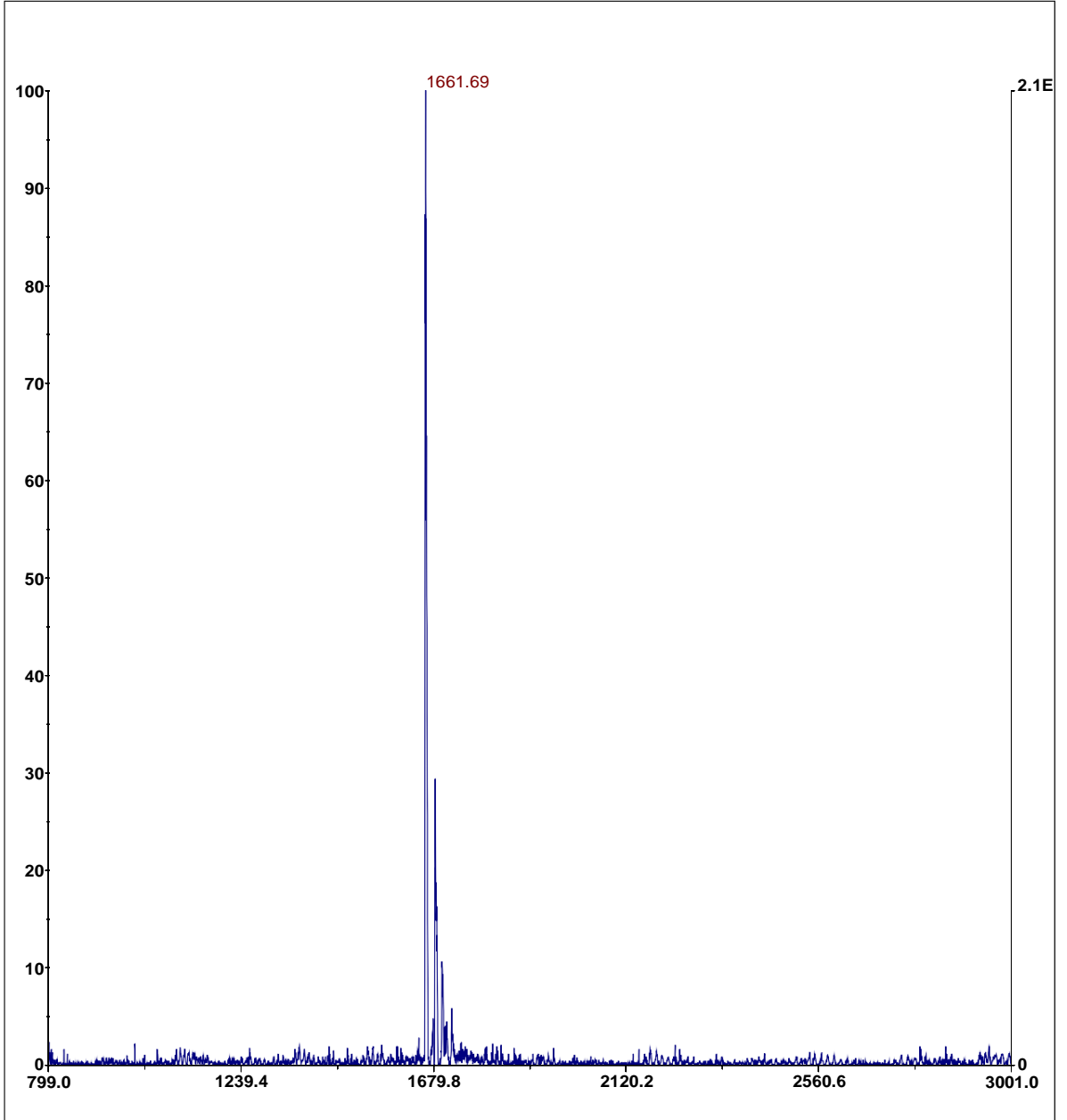
Rank	Time	Quantity	Area	Height
1	18.488	0.8139	92487	12562
2	19.708	95.16	10812586	422035
3	20.220	3.731	423994	33791
4	20.731	0.2977	33825	2781
Total		100	11362892	471169

MS Data

Linear:



Cyclized:



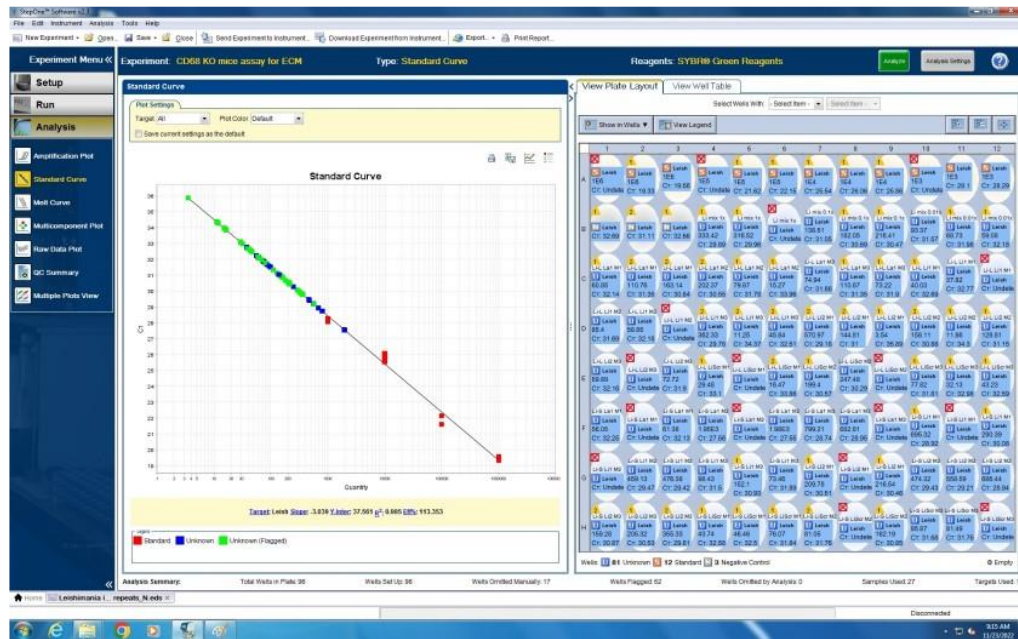
Anexo V. Controle RT-qPCR:

Curva padrão do GAPDH: referência para normalização dos dados de expressão gênica, pois acredita-se que sua expressão seja relativamente constante entre as amostras. Além disso, o uso do gene L-asparaginase como alvo de amplificação permite medir a expressão relativa desse gene específico e, portanto, avaliar as mudanças na expressão associadas à infecção por *Leishmania*. Esses controles são fundamentais para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos através do RT-qPCR.

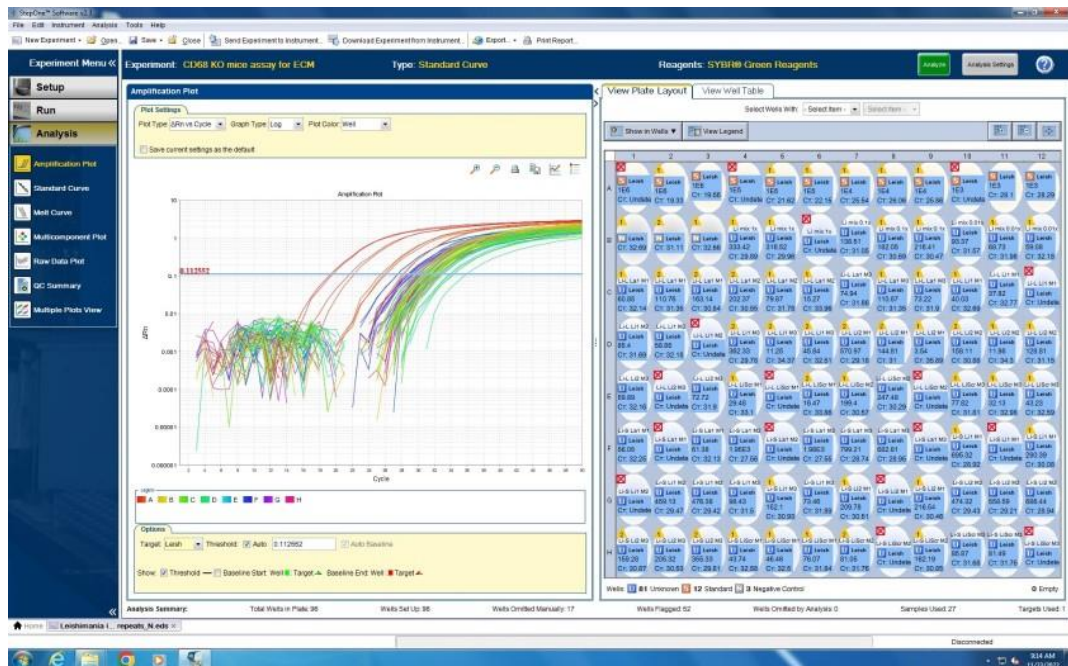


A análise da curva de *melting* é fundamental para avaliar a especificidade da amplificação. A curva de fusão confirma se os picos de fusão estão ocorrendo nas temperaturas

esperadas para os produtos de amplificação específicos de cada gene. Um pico de fusão nos valores esperados indica que a amplificação está ocorrendo conforme o esperado e que os produtos amplificados são específicos para os genes de interesse. Isso valida a especificidade e a confiabilidade dos resultados de expressão gênica, garantindo que a amplificação esteja acontecendo de maneira seletiva para os genes desejados.



A curva padrão do gene de referência GAPDH é fundamental para a normalização dos dados de expressão gênica. A utilização do gene alvo L-asparaginase na amplificação permite a medição da expressão relativa desse gene específico e, portanto, avalia as mudanças na expressão associadas à infecção por *Leishmania* dos camundongos tratado com La1, Li1 e Li1_{SCR}. Esses controles são fundamentais para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos por meio da técnica de RT-qPCR. A correlação entre o GAPDH e o L-asparaginase possibilita a análise da influência da infecção por *Leishmania* na expressão desse gene específico.



O gráfico do *amplicon* exibe a amplificação específica do gene alvo L-asparaginase. A presença da curva de amplificação indica que o gene de interesse foi amplificado e quantificado no ensaio de RT-qPCR. O gráfico do *amplicon* permite a visualização da presença e da quantidade relativa do gene L-asparaginase nas amostras analisadas, o que auxilia na compreensão da expressão gênica associada à infecção por *Leishmania*.