

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 17/11/2024.

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: Análises Clínicas 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 leishmaniases, 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 leishmaniases.

Keywords: Infection Inhibition, Phage Display, Leishmaniases.

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 metacicloênese, 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).

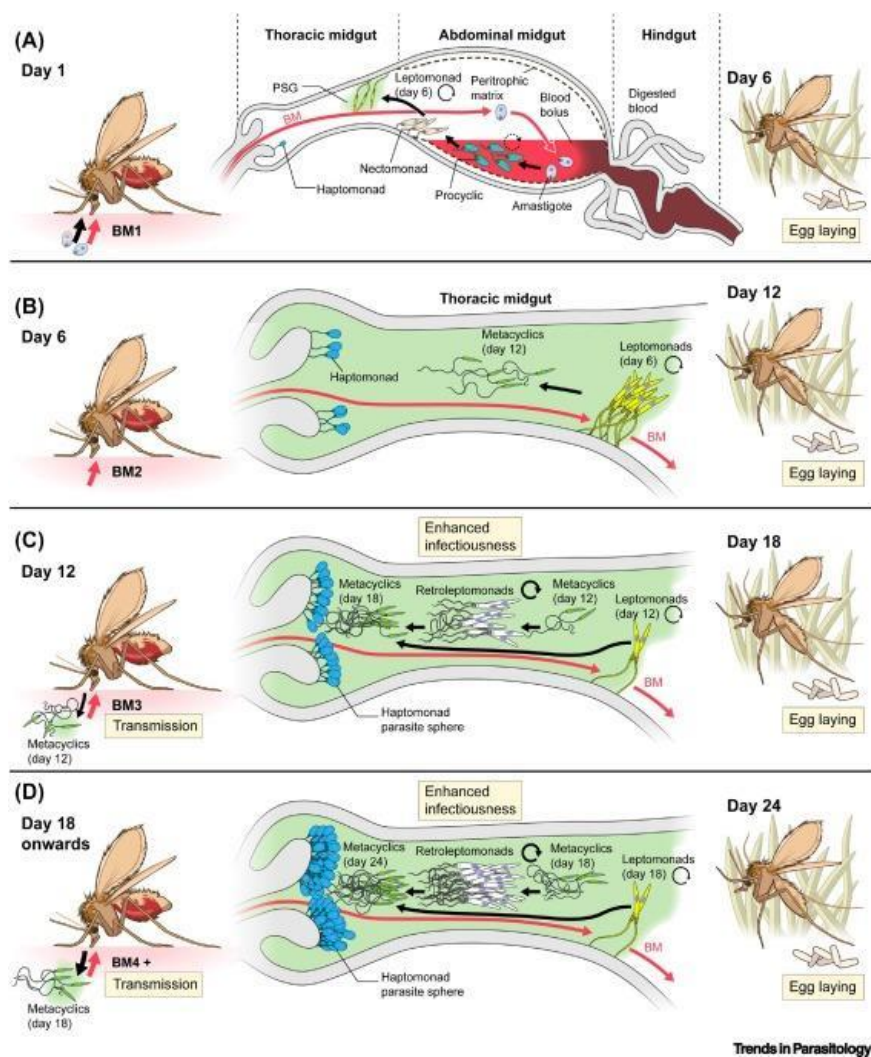


Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Leishmania* no inseto vetor. Cada painel mostra o desenvolvimento do parasita por 6 dias. (A) Ilustra o primeiro repasto sanguíneo *BM1- blood meal 1*, amastigotas são confinados pela matriz peritrófica (MP), os amastigotas se diferenciam em promastigota procíclica,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

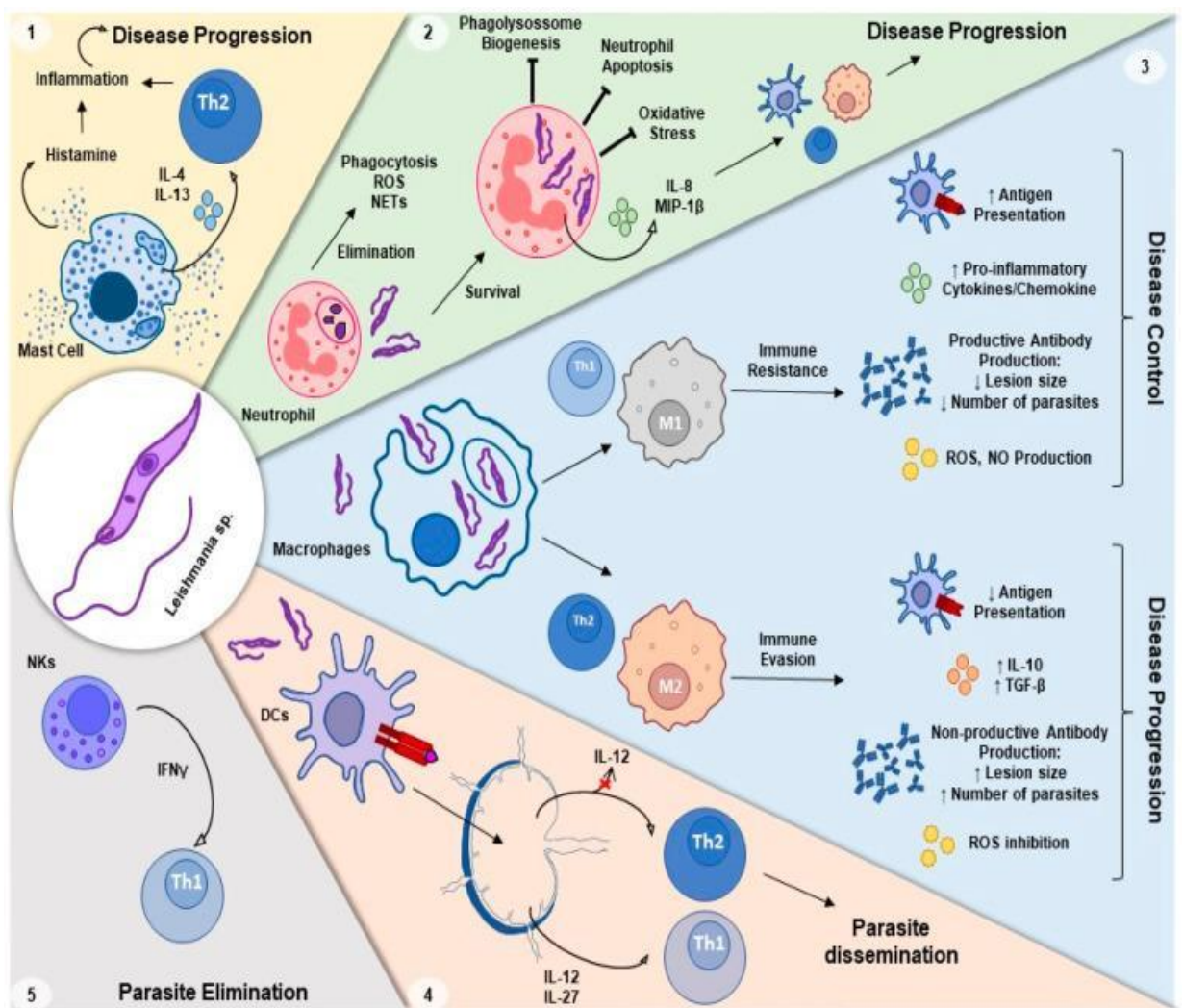


Figura 2: Interação da *Leishmania* spp. com as principais células do sistema imune. Fonte: (COSTA-DA-SILVA; NASCIMENTO; FERREIRA; GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2022).

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*.

7 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.

8 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.; KUHLS, 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 co-infections 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.