



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM  
SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA  
PLA<sub>2</sub> Lys49 MjTX-I, ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops  
moojeni***

**Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade**

**Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade**

Vitória da Conquista  
2023

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA  
PLA<sub>2</sub> Lys49 MjTX-I, ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops  
moojeni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Daiana Silva Lopes  
Universidade Federal da Bahia - UFBA, Vitória da Conquista - BA

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristiani Baldo da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina- UEL, Londrina-PA

**Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade**

Vitória da Conquista  
2023

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

A553

Andrade, Leonardo Oliveira Silva Bastos.

Avaliação da atividade antileishmania da PLA2 Lys49 MjTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* / Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade.

– Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2023.

70 f.; il.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daiana Silva Lopes.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiani Baldo da Rocha.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) -  
Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2023.

1. Leishmaniose. 2. Drogas Terapêuticas. 3. Peçonha de Serpente. I.  
Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II.  
Lopes, Daiana Silva. IV. Rocha, Cristiani Baldo da. V. Título.

CDU: 616.993.161

Elaborado por Cinthia Gabrielli Gil

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA  
PLA<sub>2</sub> Lys49 MjTX-I, ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops  
moojeni***

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 07 de outubro de 2023.

*Daiana Silva Lopes*

---

Profa. Dra. Daiana Silva Lopes  
Universidade Federal da Bahia

*Juliano G. Amaral*

---

Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral  
Universidade Federal da Bahia

*Leonel Ives Montealegre Paiva Sánchez*

---

Prof. Dr. Leonel Ives Montealegre Paiva Sánchez  
Universidad Autónoma de Occidente

Vitória da Conquista  
2023

Aos meus pais, Aline e Milton, por me ensinarem a perseverar nas mais diversas situações. Por me amarem e acreditarem na minha caminhada. Ao meu noivo, Aníbal, que é responsável por toda essa vitória, obrigado pelos incentivos e por não me deixar desanimar. Agradeço à minha equipe, minha orientadora Daiana, por me orientar com palavras doces e calmas, sempre pensando no meu aprendizado, Luísa e Vinícius, que estiveram mais próximos a mim e me ajudaram em todos os passos, além de todos os dias empregados aos experimentos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aline e Milton, por acreditarem que este sonho era possível. Se hoje sou quem sou, é pelos moldes firmes e exemplos que tive durante minha vida.

Ao meu noivo, Aníbal, que por diversas vezes me amparou e me ajudou a entender que momentos passam, essa conquista é nossa!

Às minhas tias, Catarina, Deyse e Anna Paula, que sempre cuidaram de mim, me viram crescer e cresceram comigo.

Às minhas avós, Denise e Rose, por todo amor, interesse e compreensão em minha caminhada.

Agradeço a toda a equipe de profissionais no Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS) (técnicos de laboratórios e administrativos, professores, profissionais dos serviços gerais e segurança), que contribuíram para a execução desta pesquisa.

Agradeço aos professores da UFBA que disponibilizaram seus laboratórios para a realização dos experimentos, Principalmente Lucas e Guilherme.

A minha coorientadora Cristiani, pelas colaborações.

Agradeço imensamente a Samuel, que sempre esteve disponível para sanar dúvidas e sempre demonstrou ser um excelente pesquisador e professor. Um exemplo de humildade!

A minha orientadora Daiana, por todas as oportunidades, disponibilidade, paciência, pelos ensinamentos.

A minha amiga e parceira de pesquisa Luísa, sem você nada disso seria possível, sou muito grato por sua amizade, seu companheirismo, pelos momentos divertidos, troca de conhecimentos e por estar sempre comigo.

Ao meu amigo Vinícius, que esteve presente em diversos momentos no laboratório, sempre disposto a ajudar. Muito obrigado por tudo!

Aos amigos, obrigado pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos de vida, obrigado por estarem ao meu lado neste momento tão especial.

Aos demais familiares que também contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional ao longo desta etapa, a qual me orgulho tanto.

Agradeço à Universidade Federal da Bahia (IMS), ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e todos que dele fazem parte, à Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto Butantan e todos os pesquisadores e profissionais que tornaram possível a execução desta pesquisa.

Aos meus professores e colegas de mestrado.

Às agências de fomento Capes, FAPESB, FAPEMIG.

“São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá a resposta a um homem, tudo que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas. Assim quando ele encontrar as respostas, elas lhe serão preciosas. Quanto mais difícil a pergunta, com mais empenho procuramos a resposta. Quando mais a procuramos, mais aprendemos.” – Patrick Rothfuss, O Temor do Sábio.

Andrade, Leonardo Oliveira Silva Bastos. Avaliação da atividade antileishmania da PLA<sub>2</sub> lys49 MjTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*. 2023. Dissertação mestrado – Instituto multidisciplinar em saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento disponível atualmente apresenta alta toxicidade, elevado custo, resistência do parasito, além de dificuldades de cura. Nesse sentido, as peçonhas de serpentes constituem uma fonte de estudo promissora, uma vez que possuem uma série de compostos bioativos com potencial terapêutico. dentre estes, destacam-se as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da toxina botrópica PLA<sub>2</sub>, MjTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* na viabilidade e proliferação de formas promastigota de *Leishmania leishmania amazonensis*, alterações na ultraestrutura do parasito por microscopia de varredura, além de avaliar a ação da toxina no processo de infectividade em macrófagos. MjTX-I induziu citotoxicidade nas formas promastigota do parasito nos tempos de 24 e 72 horas, com um IC<sub>50</sub> = 36,54 ug/mL 72 horas após o tratamento. Além disso, os resultados da curva de crescimento demonstram uma inibição total da proliferação do parasito na concentração de 40µg/mL da toxina após 48 horas de tratamento. Estudos ultraestruturais em promastigotas tratados com MjTX-I revelaram presença de duplo flagelo e arredondamento da extremidade do parasito. Também foi observado que a toxina (10 e 40 µg/mL) aumentou a produção de ROS e diminuiu o potencial de membrana mitocondrial no ensaio utilizando a sonda rodamina 123. A MjTX-I interferiu na capacidade de invasão do promastigota em macrófagos com uma diminuição do número de células infectadas e o número de parasitos por células infectadas. Finalmente o tratamento dos macrófagos infectados diminuiu a proliferação dos parasitos tratados com 10 µg/mL da PLA<sub>2</sub> por 72 horas. Nossos resultados sugerem que a PLA<sub>2</sub> MjTX-I é uma importante ferramenta para a descoberta de novos alvos no parasito que possam ser explorados para o desenvolvimento de novas drogas para a terapêutica da leishmaniose.



**Palavras Chave:** *Leishmania leishmania amazonensis*, fosfolipases A<sub>2</sub>, peçonha de serpente, *Bothrops moojeni*.

### **Abstract**

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The currently available treatment presents high toxicity, high cost, parasite resistance and difficulties in cure. In this sense, snake venoms are a promising source of study, since they have a series of bioactive compounds with therapeutic potential, among these, phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) stand out. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of PLA<sub>2</sub> MjTX -I, isolated from *Bothrops moojeni venom* on the growth and viability of promastigote forms of *Leishmania Leishmania amazonensis*. In addition, were evaluated, changes in the parasite's ultrastructure and action of the toxin in the process of infectivity in macrophages. MjTX-I showed activity against the promastigote forms of the parasite at 24 and 72 hours, with an IC<sub>50</sub>= 36.54 ug / mL 72 hours after treatment. Furthermore, the results of the growth curve demonstrate a total inhibition of parasite proliferation at a concentration of 40µg/ mL of the toxin after 72 hours of treatment. Ultrastructural studies by scanning electron microscopy in promastigotes treated with MjTX-I revealed the presence of a double flagellum and rounding of the parasite tip. It was also observed that the toxin increased the production of ROS and decreased the membrane potential in the assay (10 and 40 µg / mL) using the rhodamine 123 probe. MjTX-I interfered with the invasion capacity of the pre-treated promastigotes (10 and 40 µg / mL), decreasing the number of infected cells and the number of parasites per infected cell. Finally, the treatment of infected macrophages reduced the proliferation of parasites (10 µg / mL) at 72 hours. Our results suggest that PLA<sub>2</sub> MjTX-I is an important tool for the discovery of new targets in the parasite that can be exploited for the development of new drugs for the treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, phospholipases A<sub>2</sub>, snake venom, *Bothrops moojeni*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. Referencial Teórico .....	2
2.1. Leishmaniose - Epidemiologia .....	2
2.2. Agente Etiológico .....	3
2.3. Vetores e Hospedeiros .....	6
2.4. Ciclo de vida.....	7
2.5. Manifestações clínicas.....	9
2.6. Interação Parasito Hospedeiro .....	11
2.7. Tratamento .....	15
3. Peçonha de Serpente.....	18
3.1. PLA <sub>2</sub> de serpentes.....	19
4. Objetivos.....	21
4.1. Objetivo geral .....	21
4.2. Objetivos específicos .....	21
4.2.1. Ensaio em <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	21
4.2.2. Ensaio em macrófagos .....	21
5. Materiais e Métodos .....	22
5.1. Obtenção da MjTX-I .....	22
5.2. Animais e manutenção de cepas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	23
5.3. Cultura de células .....	23
5.3.1. Cultura de Macrófagos .....	23
5.3.2. Cultura de Leishmania.....	24
5.4. Ensaio de Viabilidade dos parasitas.....	24
5.5. Ensaio antiproliferativo .....	24
5.6. Análise de ultraestrutura e morfologia .....	25
5.7. Ensaio de susceptibilidade dos promastigotas a Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) .....	25
5.8. Avaliação de dano mitocondrial.....	25
5.9. Ensaio de Invasão em macrófago.....	26
5.10. Ensaio de Proliferação em macrófagos infectados.....	26
5.11. Análises estatísticas .....	27
REFERÊNCIAS .....	27
CHAPTER I.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância  
Asp 49 – Fosfolipase A2 com aspartato na posição 49  
ATP – Trifosfato de adenosina  
BHI – Meio Brain Heart Infusion  
BnSP-7 – PLA<sub>2</sub> Lys49 do veneno de *B. pauloensis*  
DCF - Diclorofluoresceína  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
IC50 – Concentração capaz de eliminar 50% do grupo amostral  
ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas  
HCl – Ácido clorídrico  
LC – Leishmaniose Cutânea  
LMC – Leishmaniose Mucocutânea  
LV – Leishmaniose Visceral  
Lys 49 – Fosfolipase A2 com lisina na posição 49  
m – Massa  
M – Mol  
mA – Miliampampère  
mg - Miligrama  
min – minuto  
MjTX-I – Miotoxina I  
MjTX-II – Miotoxina II  
mM – Milimol  
MTT – BROMETO DE 3-(4,5-DIMETIL-2-TIAZOLIL)-2,5-DIFENIL-2H-TETRAZÓLIO  
NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de Amônio  
NO - Óxido nítrico  
°C - Grau Celsius  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde  
PBS – Solução salina tamponada com fosfato  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PI – Iodeto de propídio  
PLA<sub>2s</sub> – Fosfolipases A<sub>2</sub>  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
RPMI 1640 – Meio de cultura  
SDS – Dodecil sulfato de sódio (detergente iônico)  
SisLeish – Sistema de Informação de Leishmaniose  
*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*  
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão  
VEGFR-2 – Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular  
µg – Micrograma  
µL – Microlitro

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença crônica multissintomática cujos agentes etiológicos são parasitas do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae (MUKUNYA et al, 2019; AKHOUNDI et al, 2016; ALVAR et al., 2013) e é transmitida entre animais e humanos através da picada de fêmeas de mosquitos flebotomíneos de diferentes gêneros (COURA et al., 2018). A leishmaniose afeta um grande número de pessoas, possui altas taxas de mortalidade e é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada. Em 2017, 49.959 casos foram notificados à Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish – OPAS/OMS) por 17 países endêmicos. Em geral, houve uma diminuição no número de casos em 9 países endêmicos, no entanto, o número total de casos na região manteve-se estável em relação a 2016 devido ao aumento no Brasil (38%), Costa Rica (94%), México (88%) e Equador (36%). Do total de casos de 2017, 72,6% foram notificados pelo Brasil (17.526).

As formas mais comuns da doença são a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar e a leishmaniose mucocutânea (LMC). A LC é a forma mais comum e costuma produzir úlceras nas partes expostas do corpo, como rosto, braços e pernas. além disso, podem existir muitas lesões que podem causar incapacidades graves. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* afeta a pele causando úlceras características da leishmaniose cutânea (CROFT, et al., 2003; OUELLETTE, et al., 2004).

As leishmanioses representam um desafio para a saúde devido a variação sintomatológica e tratamentos com elevados custos, a falta de terapias eficazes, os efeitos adversos dos tratamentos e as restrições das vias de administração contribuem para a dificuldade no tratamento da patologia e consequente desenvolvimento de cepas resistentes a medicamentos. A terapia de primeira escolha para a leishmaniose baseia-se em compostos antimoniais pentavalentes, enquanto a anfotericina B, a pentamidina e a paromomicina são consideradas alternativas para casos resistentes (CROFT, et al., 2003; OUELLETTE, et al., 2004, PELISSARI, et al., 2011). Nas últimas décadas, o tratamento da leishmaniose permanece como um desafio constante (AKBARI et al., 2021). Portanto, é imperativo explorar novas substâncias com propriedades

antiparasitárias, particularmente para o tratamento da leishmaniose. Nesse contexto, as Fosfolipases A2 (PLA<sub>2</sub>s) presentes nos venenos de serpentes emergem como alvos promissores para essa investigação.

As PLA<sub>2</sub>s são capazes de hidrolisar a ligação 2-acil éster dos fosfolipídios, liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos (ARNI, et al. 1996; KINI, 2003). Porém, a substituição do aminoácido aspartato por uma lisina na posição 49 provoca perda da atividade enzimática destas PLA<sub>2</sub> (LOMONTE et al., 2003). Curiosamente, estas Lys49-PLA<sub>2</sub>s cataliticamente inativas ainda provocam muitos efeitos farmacológicos ao perturbar a integridade das membranas (LOMONTE et al., 2003, 2012).

Diversas PLA<sub>2</sub>s foram caracterizadas de diferentes venenos por seu potencial antileishmania, como *Bothrops pauloensis* (NUNES et al., 2013), *Bothrops moojeni* (Stabeli et al., 2006), *Bothrops mattogrossensis* (MOURA et al., 2014) e *Bothrops brazili*. (COSTA et al., 2008). BnSP-7, uma PLA<sub>2</sub> Lys49 do veneno de *B. pauloensis* inibiu o crescimento de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e induziu um atraso na diferenciação amastigota-promastigota e alterações ultraestruturas na morfologia das promastigotas. Diante desses aspectos, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos antiparasitários da PLA<sub>2</sub> Lys49 MjTX-I de *Bothrops moojeni* em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em macrófagos murinos infectados em abordagens in vitro.

## **2. Referencial Teórico**

### **2.1. Leishmaniose - Epidemiologia**

Leishmaniose é considerada uma doença multissintomática crônica causada por parasitas do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. Diagnósticos de Leishmaniose são reportados em mais de 98 países e 3 territórios, colocando mais de 1 bilhão de pessoas em risco (MUKUNYA et al, 2019; AKHOUNDI et al, 2016). Os tipos de leishmaniose afetam mais de 1 milhão de pessoas a cada ano, sendo que a leishmaniose visceral leva cerca de 20.000 a 40.000 pessoas a óbito anualmente (ALVAR et al., 2013). No continente americano, casos de leishmaniose são registrados em 76 países. Dos casos registrados, a maioria ocorre no Brasil. De acordo Organização Mundial de saúde

(OMS), estima-se que a doença afete mais de 3.500 pessoas.

A leishmaniose é uma zoonose, transmitida entre animais e seres humanos. A transmissão se dá através da picada de fêmeas de mosquitos flebotomíneo dos gêneros *Lutzomya* e *Phlebotomus* (COURA, F. M. et al., 2018).

Os hospedeiros de leishmaniose incluem cães, roedores e outros mamíferos. Até o momento, mais de 70 espécies de mamíferos e répteis foram identificadas como reservatórios de leishmaniose (READY et al., 2014).

## **2.2. Agente Etiológico**

Os agentes etiológicos causadores da Leishmaniose são protozoários do gênero *Leishmania*. Este gênero foi criado em 1903 por Ross, após observações feitas no parasito. Desta forma, taxonomicamente a localização sistemática destes parasitos unicelulares causadores da leishmaniose começa no reino protista, transpassando o filo sarcomastigophora, ordem kinetoplastida, família trypanosomatidae, alcançando o gênero *Leishmania*, e ainda se dividindo nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (ASSIS et al., 2021).

A leishmania - abarcada pelo reino Protista, o qual possui exemplares de diversas classes e tipos, uni e pluricelulares, é caracterizado por ser um reino polifilético, pois seus descendentes não compartilham um mesmo ancestral comum, ainda pode ser definida por outras características presentes nas definições seguintes, como o filo Sarcomastigophora e a ordem Kinetoplastida, que juntos definem organismos capazes de se locomover graças aos seus flagelos, cujo DNA mitocondrial se encontra numa região próxima ao corpúsculo basal do flagelo denominada cinetoplasto (LUPI et al., 2009; DA CUNHA et al., 2013; DA ROCHA et al., 2017).

Os organismos pertencentes ao gênero *Leishmania* possuem dois estágios morfológicos diferentes durante seu ciclo de vida: 1) Amastigota, presente no interior de células fagocíticas como macrófagos, não possuem motilidade, é aflagelada e possuem formato arredondado; 2) Promastigota, presente nos mosquitos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomya* e *Phlebotomus*, o parasito encontra-se na forma promastigota, caracterizada por ser flagelada, apresentando capacidade motora, sendo extracelular (CROFT et al., 2003;

MARLOW et al., 2013; MOREIRA et al., 2015; TELES et al., 2019).

Ambos os estágios do parasita possuem estruturas em comum, como complexo de golgi, núcleo e retículo endoplasmático, vista a necessidade de regulação e produção de componentes de membrana celular, além da expressão em sua superfície de sinais que consigam evitar seu reconhecimento e morte nos hospedeiros. Porém, alguns elementos diferem nestas estruturas, a principal delas é a existência de um flagelo motor na estrutura promastigota e sua ausência na fase amastigota, essa diferença é gerada pela falta de necessidade de mobilidade a partir do momento que os amastigotas invadem as células fagocíticas, como macrófagos. Estas variações na estrutura da leishmania é caracterizada por variações na disponibilidade e tipo de nutrientes, pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio. A estratégia adotada pelos parasitas para sobreviver a essas mudanças é se tornar altamente especializado e desenvolver formas adaptadas, desta forma, os estágios alcançados por este parasita variam suas necessidades nutricionais, seu crescimento e velocidade de divisão celular (BESTEIRO et al., 2007; URSINE et al., 2021; VARIZA et al., 2016).

Existem diversas espécies de *Leishmania* descritas no mundo, e dentre essas, aproximadamente 20 podem gerar sintomas de leishmaniose no homem. Com o desenvolvimento de pesquisas, foi-se observando que além da nomenclatura que utilizava vetores e distribuição geográfica, estas linhagens poderiam ser intituladas de acordo com reações moleculares e bioquímicas apresentadas pelos mesmos, visto que eles não sofrem influência do meio ambiente ou do hospedeiro infectado. Dando seguimento a estes estudos, foi proposta uma classificação de subgênero para as leishmanias, surgindo então as *Vianna* e *Leishmania*, que variam sua nomenclatura devido ao local do intestino do vetor em que estes parasitas amadurecem (ROCHA et al., 2018; KEVRIC et al., 2015; DAVID et al., 2009; HANDER et al., 2015).

Estes subgêneros dão origem as espécies mais estudadas de leishmanias, porém, é importante ressaltar que ainda existem outros tipos de parasitos advindos deste grupo predecessor, conhecido por euleishmania. Este grupo também engloba o subgrupo de *Sauroleishmania* e *Mundinia*. Devido a esta capacidade de desenvolvimento em diversos tipos de situações, sejam ambientes diferentes ou até mesmo o local de maturação dos parasitos, além de

características intrínsecas de cada subgênero, as cepas de leishmania desenvolvem métodos diferentes de interação com o ser humano, causando diferentes tipos de lesões e sintomas.

### **2.3. Vetores e Hospedeiros**

A transmissão destes parasitos de diversas espécies de leishmania está relacionada com seu vetor primário, onde este parasito será amadurecido. Este vetor pertence à família Psychodidae, que compreende insetos hematófagos normalmente com hábitos noturnos, dentro desta família ainda é possível aprofundar a subfamília phlebotominae, e os gêneros que estão mais associados a transmissão dos parasitas são *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Estes insetos são dípteros, de pequeno porte, corpo piloso, delgado e diferem-se dos demais dípteros por, principalmente, desenvolverem seu estágio larval completo em matéria orgânica contida em solo, e não em água. Quando adultos, estes insetos apresentam dimorfismo sexual, e enquanto os machos alimentam-se de seiva para manter a homeostase corporal, as fêmeas precisam de uma dieta sanguínea, necessária para a maturação ovariana e assim prosseguir com a oviposição, dando continuidade ao ciclo vital dos insetos (RISPAIL et al., 1998; ARANSAY et al., 2000).

Insetos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* estão presentes em diversos países, dentre eles, o Brasil. Por serem encontrados em lugares diferentes dentro de um país de proporções continentais como o Brasil, existem algumas variações de nomes populares para estes insetos, como “mosquito-palha”, “cangalha”, “tatuíra”, entre outros. Como dito anteriormente, as fêmeas possuem alimentação baseada em sangue, então a transmissão destes parasitos, caso o inseto esteja contaminado, pode ocorrer entre diversas espécies de animais, tais como canídeos, primatas, roedores e até mesmo marsupiais. O homem também é alvo destes insetos, podendo servir como hospedeiro para o parasito, porém a manutenção do ciclo de vida deste protozoário na natureza não parece ter dependência com o ser humano (LAINSON et al., 2010; ASATO et al., 2009).



## 2.4. Ciclo de vida

O ciclo de vida dos parasitas é heteroxênico, necessitando de um hospedeiro intermediário para realizar maturações necessárias, desta forma, os parasitas vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados mamíferos e insetos, que são os vetores de transmissão (EFSTATHIOU et al., 2021; MANN et al., 2021).

O ciclo se inicia a partir da ingestão de macrófagos contaminados ou amastigotas livres presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado mamífero contaminado pela fêmea de flebotomíneo. Estas células amastigotas ao se depositarem no intestino do inseto passam por uma intensa modificação, onde estas se tornarão promastigotas procíclicas, caracterizadas por formato alongado e com mobilidade flagelar. O amadurecimento destas células segue quando os promastigotas procíclicos passam pela metaciclogênese, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas enquanto são enviadas a porção valvular da faringe dos insetos, fato importante sobre a metaciclogênese é que as células agora as células não são capazes de se dividir, porém adquirem uma maior capacidade infectiva. Desta forma, quando o mosquito realiza a aspiração de sangue durante a alimentação, ele inocula no hospedeiro certa quantidade de promastigotas metacíclicas (EFSTATHIOU et al., 2021; MANN et al., 2021; SASIDHARAN et al., 2021; DAMIANOU et al., 2020).

As espécies de mosquitos hematófagos possuem em sua saliva componentes anticoagulantes que ajudam o sangue a continuar fluindo sem a formação dos complexos de plaquetas para estancamento de sangue, além de componentes bioquímicos que possam aumentar o influxo de sangue para o local, modulando uma resposta imune no hospedeiro, que na maioria das vezes não sente a picada do inseto, visto que os mesmos possuem hábitos noturnos (SERAFIM et al., 2021; LAZAR et al., 2020; EFSTATHIOU et al., 2020).

Os parasitas em sua forma promastigota metacíclica são então fagocitados por células da primeira linha de resposta a infecções, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Como visto anteriormente, os promastigotas possuem uma estrutura chamada acidocalcisoma, enzimas capazes de regular o PH e a osmolaridade de estruturas, desta forma, ao ser engolfado por células fagocíticas mononucleares e formado o lisossomo primário, esta enzima é capaz de interferir na metabolização e destruição os parasitas. A fusão dessas células

com os lisossomos não forma o lisossomo tardio, que seria excretado da célula por meio de exocitose, agora a estrutura formada é o vacúolo parasitóforos. Dentro deste vacúolo existe então a última diferenciação a qual o parasita passará, as células promastigotas metacíclicas passam a ser amastigotas, que não possuem motilidade devido a perda do flagelo e são intracelulares obrigatórios (ANTONIA et al., 2020).

Após se multiplicarem dentro dos vacúolos dos macrófagos, as amastigotas, que são altamente infectivas, lizam as barreiras do macrófago e são liberadas na corrente sanguínea, onde encontrarão outros macrófagos e continuarão se replicando, aumentando drasticamente sua quantidade no hospedeiro. Até o momento em que uma fêmea de flebotomíneo necessite da ingesta de hemácias e acabe aspirando macrófagos contaminados ou amastigotas livres, reiniciando o ciclo (ASSIS et al., 2021; BAKER et al., 2021; YASMIN et al., 2022).

## **2.5. Manifestações clínicas**

Após a infecção pela picada do inseto e internalização do parasita nos macrófagos, é iniciado o quadro de sintomas relacionados a doença. Como visto anteriormente, existem diversas espécies de leishmania e dependendo da localização de maturação no inseto vetor, e a espécie do inseto vetor, algumas características desses protozoários podem variar, o que acarreta em sintomas diferentes para cada interação específica, pois, além de variar a espécie do agente infeccioso, também varia a capacidade imunológica do paciente, bem como seu estilo de vida, variando o espectro sintomático apresentado. Dada a toda essa variação, a leishmaniose não é considerada uma doença simples, mas sim um complexo de doenças com diferentes manifestações clínicas, uma doença multissintomática (ABADÍAS-GRANADO, et al. 2021).

Deste modo, para compreender a variação sintomática causada pelas diferentes estirpes de *leishmania. spp*, foram criadas classificações que englobem os sintomas que os diferentes tipos de parasitos possam causar, sendo as mais comuns: a leishmaniose cutânea (LC), a mucocutânea (LMC), a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Leishmaniose Cutânea (LC) – No local de inoculação do parasita se forma

uma pápula, que normalmente evolui para um nódulo que posteriormente se tornará uma úlcera. Frequentemente é encontrada em locais expostos, como face ou extremidades corporais. As lesões da LC podem ser únicas ou múltiplas e podem ter lesões com distribuição esporotricóide. É causada, principalmente, pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (V.) panamensis* e *Leishmania (L.) guyanensis*, é a forma mais comum da doença e é relativamente benigna, porém existem outras formas de apresentação da doença, como lesões eczematosas, erisipeloides, lupoides, anulares, verrucosas (ARONSON et al. 2019; DE MORAIS et al., 2015).

As lesões podem sarar naturalmente em períodos de meses e cicatrizar deixando apenas cicatrizes superficiais, no entanto, alguns podem se tornar crônicos ou disseminados. A forma crônica recidivante é típica da *L. tropica*, que se apresenta como pápulas na periferia da cicatriz da úlcera anterior. A cronicidade das lesões tem sido relacionada, entre outros fatores, ao aumento da atividade da arginase em leucócitos polimorfonucleares. Por outro lado, existe também a forma difusa, produzida por exemplares de *L. aethiopica*, *L. mexicana* e *Leishmania (L.) amazonensis*, que apresenta múltiplas pápulas com a presença de nódulos não ulcerados que acometem maior parte da pele, as lesões contêm diversos parasitas e podem afetar gravemente a face quando esta é exposta (GOTO et al., 2010; HANDLER et al., 2015).

Leishmaniose Mucocutânea (LMC) – Durante a infecção, o envolvimento das mucosas pode coexistir com o da pele, em outros casos pode aparecer após a resolução deste último, mesmo que muito tempo após curada a infecção cutânea. A via de disseminação pode ser hemática ou linfática. Em países endêmicos, a prevalência de acometimento de mucosas pode chegar até 20%. A maioria dos casos é desenvolvida por espécies de *Leishmania (L.) braziliensis*, embora também possa ser causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) guyanensis* e *Leishmania (L.) panamensis*. As mucosas mais frequentemente atingidas são a nasal e a oral, embora estas lesões possam se estender à orofaringe e laringe. As lesões se apresentam em forma ulcerativa, podem ser desfigurantes e em caso de inexistência de tratamento, até mesmo fatais (GOTO et al., 2010; HANDLER et al., 2015).

Leishmaniose Visceral (LV) – Através da disseminação de macrófagos infectados pelo sistema reticuloendotelial, podendo atingir a medula óssea, baço e fígado, é caracterizado por febre, emagrecimento, hepato e esplenomegalia e linfadenopatia. É causada principalmente por *Leishmania (L.) donovani* em adultos e *Leishmania (L.) infantum* ou *Leishmania (L.) chagasi* em crianças e indivíduos imunocomprometidos. A LV também pode apresentar manifestações cutâneas, que podem se apresentar como pápulas, nódulos ou úlcera. Mas também podem se apresentar de forma inespecífica, como purpura ou hiperpigmentação (referente ao termo kala-azar, febre negar em hindi). A presença desta pigmentação está associada ao aumento de hormônios adrenocorticotróficos, porém, em lâmina histológica do tecido, é possível visualizar amastigotas internalizadas no tecido. Pode também, após o tratamento realizado evoluir para a forma clínica de leishmaniose dérmica pós-calazar (VAN GRIENSVEN et al., 2019; FIGUEIRO-FILHO et al., 2004).

Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – É caracterizada por ser uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas, de forma única ou múltipla. Pelo menos sete tipos de leishmanias estão associadas ao desenvolvimento desta doença, mas os protozoários mais associados, por ordem de registro, são das espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (NUNES et al., 2013).

Das espécies citadas, a que se destaca é a *Leishmania (L.) amazonensis*, pois sua distribuição em território Brasileiro é bem difusa, passando pela floresta amazônica, percorrendo estados do Norte, como o Pará, perpassando por estados do Nordeste, como Maranhão e Bahia, chegando até o Sudeste em Minas Gerais. O vetor de contaminação relacionado a sua transmissão é do gênero *Lutzomyia*, um flebotomíneo hematófago de hábitos noturnos (TASLIMI et al., 2018).

Durante o início dos anos 1900, a existência de LTA já era registrada e diversas tentativas de tratamentos foram propostos, porém dada a falta de estudo e de medicamentos específicos para as patologias corretas, muitos pacientes relatavam intoxicação medicamentosa, gerando complicações ao processo de cura. As lesões causadas por *Leishmania (L.) Amazonensis* curam-se espontaneamente principalmente quando expostas ao tratamento adequado,

porém, alguns pacientes que apresentam problemas imunológicos ou deficiências, como o HIV, estão mais susceptíveis a desenvolver a forma múltipla da doença, onde o parasita percorre vasos linfáticos, provocando lesões em toda pele e mucosas, podendo se prolongar dentro do hospedeiro. Destaca-se que não existe resposta eficaz aos tratamentos quando a doença alcança estes patamares, pois existe o aparecimento de lesões não-ulcerosas com focos necróticos e granulomas, podendo atingir rosto e membros do hospedeiro infectado (MACHADO et al., 2019).

## **2.6. Interação Parasito Hospedeiro**

A interação entre o parasita e o hospedeiro se dá a partir de sua inoculação, como visto anteriormente, as modulações causadas pela picada do inseto contribuem para uma quimiotaxia de células susceptíveis ao parasita. Deste modo, ambas as formas do parasita, promastigota e amastigota, desencadeiam reações imunológicas no hospedeiro (GONÇALVES et al., 2019).

A primeira reação de defesa do organismo infectado é o englobamento do parasita por células da primeira linha de defesa contra ameaças, macrófagos residentes no tecido, e monócitos recém diferenciados em macrófagos por estímulos inflamatórios, partem para a defesa do corpo e engolfam os parasitas. Macrófagos são células de linhagem mieloide, consideradas células grandes, de possuem diâmetro entre 25 a 50µm, encontrados nos mais diferentes tipos de tecidos, variando também sua nomenclatura, por exemplo sendo osteoclastos em tecidos ósseos e células de Kupfer no fígado. Além disso, os macrófagos tem a capacidade de apresenta o complexo de histocompatibilidade tipo II (HLA II) presentes nos genes MHC, que são mais específicos e podem ajudar a desenvolver uma resposta humoral mediada por imunoglobulinas (VOLPEDO et al., 2021; GONÇALVES et al., 2019).

Após essa fagocitose realizada por macrófagos mediada por padrões de reconhecimento celulares, que são do interesse do parasita, por isso este apresenta uma série de proteínas em sua membrana que facilitem esse englobamento, como por exemplo a proteína gp63, o parasita deve sobreviver ao lisossomo. Esta estrutura tem como principal função a degradação de estruturas englobadas e lise de estruturas celulares que estejam em mal funcionamento ou muito velhas. Essa degradação se dá pelo fato de o lisossomo

apresentar diversas lipases, moléculas desenvolvidas especificamente com a função de degradar ligações, como proteases, nucleases, fosfolipases e fosfatases, e além de tudo, apresentar um pH próximo de 5,0 (ELMAHALLAWY et al., 2021; AKBARI et al., 2021; TASLIMI et al., 2018).

Para que o parasita seja bem-sucedido em sua missão de evadir os mecanismos celulares, muitas proteínas expressas em sua membrana atuam em diferentes momentos da infecção. Em sua forma Promastigota, por exemplo, a proteína LGP inibe a fusão do endossomo e o lisossomo, além de interagir e retirar radicais hidroxil (H<sup>+</sup>) através da molécula acidocalcisoma. Dessa forma, o parasita tem tempo hábil a se diferenciar em amastigota e começar sua replicação (ELMAHALLAWY et al., 2021; AKBARI et al., 2021).

Desta forma, é notório que o parasita lança mão de diversas vias complexas para sobreviver aos mecanismos de defesa gerados pela imunidade inata, macrófagos e neutrófilos são consideradas as células primárias que reagem à infecção por leishmania, porém o sistema complemento também possui interação com o parasito no decorrer da infecção, bem como várias outras células imunes, como monócitos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK) e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como moléculas efetoras, como citocinas, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina (IL-12) e óxido nítrico (NO) produzido pela NO sintase induzível (iNOS), também desempenham papéis distintos na resposta do hospedeiro (VOLPEDO et al., 2021; GONÇALVEZ et al., 2019).

O sistema complemento representa uma rede complexa de ativadores, reguladores, efetores e sinalizadores que aumentam a capacidade dos anticorpos e células fagocíticas de eliminar o microrganismo. Na infecção por *Leishmania* sp. a cascata do complemento é diretamente ativada após a penetração dos promastigotas na derme através da saliva do mosquito, e por sua vez, é capaz de matar eficientemente cerca de 90% dos parasitas inoculados. No entanto, a parcela restante de parasitas é capaz ainda de causar a infecção. O grau de resposta ao sistema complemento varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita e sua espécie. Os promastigotas de leishmania são mais sensíveis à lise pelo complemento que os promastigotas metacíclicos, enquanto que os amastigotas são mais infecciosos e mais resistente a lise que os estágios anteriores. Outro papel desempenhado pelo sistema complemento durante a infecção por leishmania sp. inclui a

opsonização dos parasitas por seus fragmentos (iC3b e C3b), visto que a leishmania pode usar o C3b depositado para facilitar sua entrada em macrófagos e neutrófilos através do receptor do complemento 2 (CR2) (CARALHO et al., 2019; VOLPEDO et al., 202).

A resposta imune aos diferentes estágios do parasita é dependente principalmente de uma resposta imune do tipo I, que se caracteriza pela produção inicial de interleucina- 12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), isso então ativa as células Th1 secretoras de IFN-  $\gamma$ . Desencadeando na ativação dos mecanismos microbicidas do macrófago, com a geração de espécies de Oxido Nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas citocinas T helper-1 (Th1) são neutralizadas por fatores imunossupressores, como a IL -10 (ELMAHALLAWY et al., 2021).

As células da resposta imune adaptativa, principalmente as células B e células T, são muito importantes para determinar o curso da infecção por leishmania e as manifestações clínicas da doença. Sua ação geralmente é moldada pela produção de citocinas durante os estágios iniciais da resposta imune inata. Este subconjunto de células também é importante para ligar o sistema imunológico inato ao adaptativo. É válido ressaltar que as células T possuem receptores de superfície exclusivos que reconhecem proteínas derivadas de patógenos (PAMPs) ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície das APCs. As células T virgens tornam-se ativadas após o reconhecimento do antígeno ligado ao MHC, e essa ativação é potencializada pelos sinais secundários ou auxiliares. As citocinas locais secretadas fornecem um ambiente adequado a conduzir a resposta de células T antígeno-específicas e os subconjuntos de memória dos linfócitos T auxiliares CD4+, acarretando as manifestações clínicas da doença (TOEPP et al., 2020).

Além disso, as células T efetoras, diferenciam-se em dois subtipos principais, os tipos Th1 e Th2. As células Th1 são geralmente efetoras contra bactérias intracelulares e protozoários, e destroem os parasitos intracelulares por ativação dos macrófagos parasitados. As principais células efetoras da imunidade Th1 são macrófagos, células T CD8+, células B IgG e células T CD4+ IFN- $\gamma$  (TASLIMI et al., 2018).

Já as células B, se subdividem em dois subconjuntos, as células B1 e B2. A

B1 são o subconjunto de linfócitos B envolvidos nas respostas imunes humorais e são representados principalmente pela produção de anticorpos contra antígenos gerais. As células B2 fazem parte da resposta imune adaptativa humoral para liberação de anticorpos contra antígenos específicos e associados a geração de memória imunológica. Alguns estudos sugerem que células B poderiam estar associadas a exacerbação da infecção por leishmania através da produção de citocinas. Claramente, o papel das células B durante a leishmaniose e os dados relatados são escassos, portanto, estudos futuros são obrigatórios para explorar as principais funções dos subconjuntos de células B em infecções por *Leishmania* spp. (TOEPP et al., 2020; GHORBANI et al., 2017; ELMAHALLAWY et al., 2021).

Como foi descrito nos tópicos acima, existem diversas moléculas e sistemas que contribuem para uma melhor defesa a infecção de parasitas do gênero *Leishmania*, porém, com o passar do tempo e sucessivas evoluções, os parasitas desenvolveram métodos de escape ao sistema imune inato, adaptativo, desenvolvimento de condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento nos macrófagos (ELMAHALLAWY et al., 2021).

## **2.7. Tratamento**

O tratamento para leishmaniose vem se aperfeiçoando com o passar dos anos e desenvolvimento científico. historicamente, o antimônio pentavalente foi considerado o tratamento medicamentoso de primeira linha contra leishmaniose, no entanto, estava associada a cardiotoxicidade, cirrose e toxicidade pancreática. A forma amastigota do parasito é sensível aos antimoniais, pois somente ele é capaz de realizar a redução química necessária dentro do hospedeiro. Embora fosse o medicamento mais utilizado contra a leishmaniose, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está claro, o entanto, nas últimas décadas, a resistência impôs sérios desafios ao seu uso no tratamento da leishmaniose (AKBARI et al., 2021).

Subsequentemente, a anfotericina B, com e sem sua formulação lipídica, surgiram como terapias de segunda linha. Desde então a miltefosina tem sido usada nos mais diversos casos de leishmaniose, seja cutânea ou visceral. Como uma droga anticâncer e anti-*Leishmania*, Miltefosine é a única medicação oral disponível contra Leishmaniose visceral e cutânea. Além disso, houve relatos de



desconforto gastrointestinal. A miltefosina atua sobre a *Leishmania* por três mecanismos diferentes, inibição da proteína quinase, que leva à apoptose, efeito imunomodulador em macrófagos, e alterações na estrutura da membrana plasmática do parasita, e esse medicamento tem a vantagem de ser um fármaco oral com boa eficiência e baixo custo, porém a teratogenicidade e a resistência ao fármaco são suas questões mais limitantes (ARONSON et al., 2019; GOTO et al., 2010; AKBARI et al., 2021).

A paromomicina é categorizada como um aminoglicosídeo natural. Os aminoglicosídeos são eficazes contra várias espécies bacterianas e também estão sendo usados por via oral contra parasitas entéricos, como amebas, giárdias e tênias. A forma parenteral da droga é conhecida por ser eficaz contra espécies de *leishmania* e, seja na forma de pomada pura ou em combinação com Gentamicina (15% Paromomomicina + 0,5% Gentamicina), também é indicada para o tratamento da leishmaniose cutânea. A paromomomicina pode afetar a atividade ribossomal, inibindo a síntese proteica e o potencial de membrana mitocondrial, o que priva o parasita de energia, vale ressaltar que a ligação da Paromomomicina aos ribossomos é altamente seletiva e limitada ao parasita, o que indica sua segurança como fármaco antileishmania (TSAI et al., 2002; MITROPOLOUS et al., 2010)

A anfotericina B é um potente medicamento antifúngico que também demonstrou eficácia no tratamento das infecções causadas pelo protozoário *Leishmania*, particularmente na forma visceral da leishmaniose, que pode ser fatal se não tratada adequadamente. A formulação lipossomal da anfotericina B, chamada Ambisome, é amplamente utilizada nesse contexto (KUMARI, et al. 2022).

A ação da anfotericina B contra *Leishmania* envolve vários mecanismos. Primeiramente, ela se auto-oxida, levando à produção de radicais livres, que são altamente tóxicos para o parasita, danificando sua membrana celular e componentes internos, eventualmente resultando em sua morte. Além disso, a anfotericina B se liga a esteróis na membrana do parasita, criando poros que perturbam o equilíbrio iônico, afetando as funções vitais do protozoário e levando à sua destruição (MOSIMANN, et al. 2018).

Outra característica interessante é a interação seletiva da anfotericina B com o colesterol na membrana dos macrófagos, que são células

frequentemente alvo de infecção por *Leishmania*. Essa interação bloqueia a entrada do parasita em células não infectadas, impedindo a disseminação da infecção (MOSIMANN, et al. 2018).

Embora a anfotericina B seja eficaz, seu uso pode ser desafiador, pois geralmente é administrada por via intravenosa e pode estar associada a efeitos colaterais. Além disso, a versão lipossomal é mais cara e pode estar disponível apenas por meio de organizações internacionais de saúde, limitando seu acesso em algumas regiões (VAN GRIENSVEN, et al. 2019).

Apesar dessas limitações, a anfotericina B continua desempenhando um papel crucial no tratamento da leishmaniose visceral, particularmente em casos graves e resistentes a outros medicamentos, contribuindo significativamente para o controle da doença. (NUNES et al., 2013; TUON et al., 2008).

Os medicamentos existentes reaproveitados para leishmaniose incluem miltefosina e petamidina. Antifúngicos azólicos também foram estudados para serem utilizados em casos de leishmaniose, itrazonazol foi superior ao cetoconazol e fluconazol para inibir o crescimento da maioria de cepas em estudos. A pentamidina é usada por via muscular ou por via intravenosa, mas não está disponível em formulação oral. Tem a vantagem do baixo custo, mas sua eficácia varia de acordo com as espécies de *leishmania*, além de seu uso estar associado a disglucemia e outros efeitos adversos (ARONSON et al., 2019; AKBARI et al., 2021).

Além de tratamentos baseados em medicamentos, existem tratamentos alternativos estudados para casos de leishmaniose. Um destes casos é o uso da terapia fotodinâmica (PDT). Essa terapia envolve o uso de um ácido aminolevulínico (ALA) ou metil-aminolaevulinato aplicado topicamente na pele, seguido de uma irradiação com laser ou pulso intenso claro, variando o comprimento de onda. Alguns estudos abordam os princípios subjacentes ao uso da PDT para o tratamento de leishmaniose cutânea. Porém, estudos in vivo mostraram que o ALA-PDT tópico resultou em extensa destruição tecidual, apesar da significativa redução da carga parasitária, o número de macrófagos e o nível de interleucina-6 (IL-6) diminuiu na pele infectada. Os efeitos antileishmania de ALA-PDT para leishmaniose, principalmente cutânea, são mediados pela morte das células hospedeiras, devido à falta de dados suficientes, este tratamento não é recomendado na prática clínica (PRADHAN et

al., 2022).

Alguns estudos vêm testando novos fármacos para tratamentos relacionados aos casos de leishmanioses, as quinolonas semelhantes às endoquinas são inibidores competitivos do complexo citocromo bc<sub>1</sub>, que podem afetar a cadeia transportadora de elétrons (ETC) mitocondrial em várias espécies de *Leishmania*. A hidroxinaftoquinona buparvaquona atua depletando os níveis de trifosfato de adenosina (ATP) e, assim, produzindo inibição da ETC em amastigotas. Novos sais de bisfosfônio derivados de benzofenona são leishmanicidas e têm como alvo o complexo II da cadeia respiratória do parasita, levando à morte. A artemisinina mostrou efeito antileishmania desencadeando a indução da parada do ciclo celular e apoptose. A tafenoquina prejudica o metabolismo bioenergético de promastigotas de *Leishmania*, causando uma queda rápida nos níveis intracelulares de ATP, resultando em apoptose e, assim, levando à disfunção mitocondrial. Os principais esteróis essenciais para o crescimento e viabilidade em tripanossomatídeos são ergosterol e 24-metil esterol, portanto, a via metabólica de esteróis e ácidos graxos pode ser um potencial alvo de drogas na leishmaniose. Em estudos experimentais, descobriu-se que sinvastatina, atorvastatina e resveratrol inibem o crescimento de promastigotas de espécies de *Leishmania*, outras enzimas envolvidas na biossíntese de esteróis também são alvos potenciais para drogas antileishmania. Análogos de alquilfosfolípidos foram recentemente demonstrados como possíveis fármacos. Em estudos experimentais, a edelfosina matou promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. As poliaminas estão fortemente associadas à sobrevivência, crescimento e proliferação celular, várias enzimas envolvidas no metabolismo das poliaminas e no metabolismo do folato também podem ser usadas como alvos para a atividade antileishmania (PRADHAN et al., 2022; AKBARI et al., 2021; MITROPOLOUS et al., 2010).

Desta forma, é notório que os tratamentos relacionados aos tipos de leishmaniose ainda precisam de uma validação científica maior, pois estes ainda apresentam diversas desvantagens, representando assim um obstáculo ao tratamento adequado a doença. Alguns dos problemas relacionados a estes tratamentos previamente descritos são alta toxicidade, vias de administração, resistência do parasita a droga, alto custo e inviabilidade de produção em larga escala. Neste sentido, estudos seguem buscando o tratamento ideal para o

combate a esta patologia. Diversos compostos estão sendo testados para desenvolvimento de uma droga leishmanicida, com baixa toxicidade as células dos hospedeiros, dentre estes compostos, encontram-se uma gama de moléculas que já vem sendo utilizadas através dos tempos, os produtos naturais, tais como extratos de plantas e compostos derivados destes e peçonhas de animais. Estes compostos moleculares quando isolados apresentam atividades antiinflamatórias, antibacterianas e leishmanicidas (NUNES et al., 2013).

### **3. Peçonha de Serpente**

Dentre as espécies de serpente, o Brasil compreende cerca de 321, aproximadamente 10% do número total, e destas, apenas 36 são peçonhentas. Estes animais podem estar presentes em vários dos biomas neste país, demonstrando adaptabilidade aos mais variados climas. As serpentes brasileiras peçonhentas mais estudadas são divididas em duas grandes famílias, as Viperidae e Elapidae (BON et al., 1994; OFFOR et al., 2022).

A família Viperidae é composta por diversas serpentes, as quais apresentam em semelhança a presença de dentição solenóglifa, ou seja, possuem presas retráteis no maxilar superior, além da presença da glândula de veneno. Estas serpentes estão divididas em alguns gêneros, porém alguns dos mais estudados são os gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*, sendo que estas serpentes estão amplamente presentes nos acidentes ofídicos (SARKAR et al., 2021).

Os acidentes com serpentes representam a maioria dos acidentes com animais peçonhentos que ocorre no país. Os acidentes ofídicos são classificados como doença tropicalmente negligenciada desde 2009 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), dada a gravidade que essas picadas podem gerar nos indivíduos afetados, podendo levar até a morte (BRASIL, 2017).

O envenenamento por peçonha de serpentes é caracterizado por eventos locais e sistêmicos, sendo que os locais são caracterizados por inflamação, hemorragia e necrose tecidual. Já os sintomas sistêmicos estão relacionados a coagulopatias, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico e alterações renais (WARREL, et al. 2019). Os efeitos tóxicos do envenenamento por serpentes são atribuídos à ação sinérgica dos diferentes compostos, orgânicos e inorgânicos, presentes na peçonha, como citotoxinas, cardiotoxinas,

hemotoxinas, L- amino oxidases (LAAO), lectinas, desintegrinas, serinoproteases, hialuronidasas, metaloproteases, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e outros (WARREL, et al. 2019).

### 3.1. PLA<sub>2</sub> de serpentes

Dentre estes constituintes, as fosfolipases A<sub>2</sub>, são proteínas capazes de hidrolisar fosfolípídeos de membrana, liberando lisofosfolípídios e ácidos graxos, como o ácido araquidônico, que está presente nas cascatas de cicloxigenase e 5-lipoxigenase, que liberam como resultado as prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos. Estes compostos estão relacionados a efeitos inflamatórios e agregação plaquetária (TEIXEIRA, et al. 2020).

As PLA<sub>2</sub> estão presentes em grande parte na peçonha de diversas espécies de serpentes e no acidente ofídico, essas PLA<sub>2</sub> são responsáveis por efeitos como mionecrose, paralisia neuromuscular, edema, uma resposta inflamatória exacerbada, inibição da agregação plaquetária e consequente hemorragia. (2018). Demonstrando assim que esta proteína, quando associada aos outros componentes presentes na toxina, é responsável por uma gama de acontecimentos durante o processo de intoxicação (ARNI, et al. 1996; KINI, et al. 2003; JIMÉNEZ, et al. 2019; TEITEIXA, et al. 2020).

As PLA<sub>2</sub> de peçonha de serpente podem ser classificadas em Asp 49 e Lys 49, de acordo com o aminoácido presente na posição 49, assim as Asp49, que possui um aspartato na posição 49, são cataliticamente ativas, enquanto a Lys49, que possui uma lisina na posição 49, são cataliticamente inativas. A substituição do aminoácido Asp por uma Lys interfere no sítio de ligação do Ca<sup>2+</sup>, sendo esse íon um importante cofator para a atividade catalítica dessas enzimas. Porém, apesar da diferença de atividade catalítica, ambas isoformas apresentam atividade citotóxica (BUSTILLO, et al. 2019; TEIXEIRA, et al. 2020).

As PLA<sub>2</sub> lys 49 podem ser chamadas de PLA<sub>2</sub> homologas devido a essa variação de aminoácidos na posição 49 da enzima, porém, estas enzimas apresentam a região C-terminal, constituída de uma região hidrofóbica e uma região catiônica, é capaz de interagir com fosfolípídios aniônicos presentes nas membranas plasmáticas, causando a desestabilização desta membrana (DINIZ, et al. 2018). Essas toxinas também podem interagir com a membrana plasmática através de integrinas e outros receptores, como por exemplo o fator de

crescimento endotelial vascular (VEGFR-2). Analogamente, as fosfolipases A<sub>2</sub> quando isoladas podem apresentar efeitos farmacológicos singulares, tais como atividade antiangiogênica, antiviral, antileishmania e antimicrobiana (AZEVEDO et al., 2016; BASSETTI et al., 2017; DA SILVA, et al. 2015; NUNES, et al. 2013; BORGES, et al. 2016).

A serpente *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como caiçara ou jararacão está vastamente presente no cerrado brasileiro e possui poucos estudos relacionados aos constituintes de sua peçonha.

Neste cenário, diversos estudos reportam o potencial anti-leishmania de PLA<sub>2</sub> de serpente. Como observado no estudo de Barros e colaboradores (2015), foi analisado que a PLA<sub>2</sub> advinda de serpente *Crotalus durissus terrificus* foi capaz de inibir a proliferação de promastigotas do parasita em 50% a 83%. O mecanismo de ação proposto é que possivelmente as PLA<sub>2</sub> atuem gerando edemas mitocontriais e a desregulação no cinetoplasto, atuando também na vacuolização do citoplasma e no alargamento da bolsa flagelar. Além disso, as PLA<sub>2</sub> podem afetar a cadeia respiratória através do vazamento de ATP, incapacitando a mitocôndria e gerando conseqüente morte celular. Contribuindo para a teoria de que as PLA<sub>2</sub> são efetivas contra parasitas, Grabner e colaboradores (2017) descrevem que a fosfolipase A<sub>2</sub> advinda de *B. marajoensis* foi capaz de inibir o crescimento de parasitas de *leishmania* e *T. cruzi*.

A MJTX-I é uma proteína presente no veneno de serpentes, e seu peso molecular pode variar dependendo da espécie da serpente que a produz, mas geralmente está na faixa de 10 a 15 kDa. Esse valor reflete a soma das massas de todos os aminoácidos que compõem a proteína (SALVADOR, et al. 2013).

A estrutura proteica da MJTX-I é notável por sua conformação tridimensional única. Embora seja classificada como uma fosfolipase A<sub>2</sub>, a MJTX-I difere das PLA<sub>2</sub> convencionais devido à presença de um resíduo de lisina na posição 49, em oposição ao resíduo de aspartato encontrado nas PLA<sub>2</sub> catalíticas. Essa diferença estrutural resulta em uma mudança fundamental em sua atividade biológica. Em vez de atuar como uma enzima catalítica, a MJTX-I Lys-49 se liga às membranas celulares e interage com fosfolipídios, desestabilizando as bicamadas lipídicas. Isso leva à ruptura das membranas e à liberação de

mediadores pró-inflamatórios e neurotóxicos, contribuindo para os sintomas do envenenamento por picada de cobra (SALVADOR, et al. 2013; BENATI, et al. 2018).

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos antiparasitários da PLA<sub>2</sub> Lys49 MjTX-I sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e em macrófagos murinos infectados.

### **4.2 Objetivos específicos**

#### **4.2.1. Ensaios em *Leishmania (L.) amazonensis***

- Avaliar a viabilidade e proliferação celular dos parasitas tratados com a MjTX-I;
- Avaliar as alterações ultraestruturais e morfológicas dos parasitas tratados com a MjTX-I;
- Verificar os danos mitocondriais e a susceptibilidade dos parasitas à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) após tratamento com a MjTX-I.

#### **4.2.2. Ensaios em macrófagos**

- Avaliar o efeito da MjTX-I sobre a invasão e proliferação dos parasitas em macrófagos.

## **5. Materiais e Métodos**

### **5.1. Obtenção da MjTX-I**

Peçonhas de serpentes *Bothrops moojeni* foram gentilmente cedidas pela Dr.<sup>a</sup> Patrícia Bianca Clissa do Instituto Butantan, com cadastro de acesso ao Patrimônio Genético nº A2C2534A. A MjTX-I foi purificada conforme descrito por Soares e colaboradores, 2004, com modificações. Brevemente, 50mg da peçonha bruta e liofilizada foi diluída em 2,5mL de solução tampão de

Bicarbonato de Amônio 0,05M, pH 7,8 (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> – AMBIC) e centrifugada a 14000g por 5min. O sobrenadante foi aplicado em coluna Mono Q™ 5/50 GL trocadora de ânions a um fluxo de 0,75mL/min no sistema AKTA (GE). O sistema foi equilibrado com passagem do tampão A (AMBIC 0,05M) por 15min a 0,5mL/min, seguido do tampão B (AMBIC 0,5M) por 15min a 0,5mL/min e novamente o tampão A durante o mesmo período de tempo e fluxo. Para a fase eluente foi utilizado um gradiente de 0 a 100% de AMBIC 0,5M, a um fluxo constante de 1mL/min e coleta de frações de 1mL, sendo a absorvância das mesmas detectadas a 280nm em leitura de dosagem de proteínas através do Nanovue Plus™ Spectrophotometer (GE). As cinco primeiras frações coletadas na cromatografia em coluna Mono Q foram recromatografadas em uma nova coluna (HiTrap CM FF) trocadora de cátion, onde 2mL de cada amostra foram aplicados a um fluxo de 1mL/min em sistema AKTA (GE). Para equilíbrio do sistema foi realizada uma passagem em 15 min do tampão A (AMBIC 0,05M) a 1mL/min, seguido do tampão B (AMBIC 0,5M) e novamente o A seguindo o mesmo período de tempo e fluxo. Para a fase eluente foi utilizado um gradiente de 0 a 100% de AMBIC 0,5M, sendo a cromatografia realizada a um fluxo constante de 2mL/min. Foram coletadas frações de 1mL e a absorvância monitorada a 280nm conforme descrito anteriormente. Ao final deste processo as amostras foram separadas em quatro pools referentes a cada pico. Ao final das duas cromatografias foi realizada a eletroforese em condições desnaturantes (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli, 1970 para verificar a homogeneidade das amostras contendo a PLA<sub>2</sub> MjTX-I (Dados não mostrados).

## **5.2. Animais e manutenção de cepas de *Leishmania (L.) amazonensis***

Os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira (Protocolo nº 082/2020). Foram utilizados camundongos Fêmeas da linhagem Balb-c (20-30g) de aproximadamente 4 meses de idade. Os animais foram mantidos sob condições padrão com dieta específica. Todos os experimentos foram realizados de acordo



com as diretrizes e regulamentos do Comitê para o Uso Ético dos Animais.

O uso dos camundongos BALB/c foi necessário para manutenção da cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* que foram usados nos experimentos. Com o auxílio de seringas, foram inoculados  $1 \times 10^6$  parasitos de *Leishmania (L.) amazonensis* em cada uma das orelhas dos animais previamente anestesiados. Estes ficaram infectados durante 8 semanas e após esse período, foram eutanasiados por deslocamento de cervical. Posteriormente, as orelhas infectadas e o linfonodo regional foram retirados e homogeneizados em 1ml de meio Brain Heart Infusion (BHI), pH 7,2, suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina (100UI/mL) e 1% de estreptomicina (100mg/mL), glicose a 2%. Em seguida, foram realizadas sucessivas centrifugações, sendo que na última, o Pellet foi ressuspendido em PBS estéril e passado por 6 vezes em seringa de 1 ml para dissociar os parasitos. Por fim, os amastigotas obtidos foram mantidos em garrafas de cultura em meio BHI completo.

### **5.3. Cultura de células**

#### **5.3.1. Cultura de Macrófagos**

Os macrófagos linhagem RAW 264.7 utilizados nos experimentos foram concedidos pelo Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, responsável pelo laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As células foram mantidas a 37°C em incubadora umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As linhagens celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1mM de aminoácidos não essenciais, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina.

#### **5.3.2. Cultura de Leishmania**

Parasitos *Leishmania (L.) amazonensis* foram cultivados em meio Brain Heart Infusion (BHI), pH 7,2, suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina (100UI/L) e 1% de estreptomicina (100mg/mL), glicose a 2% - BHI completo - a  $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Passados 6 dias de cultura, momento no qual os promastigotas de *Leishmania* atingiram a fase estacionária, os parasitas foram centrifugados a

1800rpm por 10 minutos, ressuspensos e utilizados nos experimentos seguintes.

#### **5.4. Ensaio de Viabilidade dos parasitas**

A viabilidade celular dos parasitos cultivados em presença da toxina nas concentrações de 80-0,078  $\mu\text{g/ml}$  foram avaliadas pelo método colorimétrico baseado na oxidação mitocondrial do reagente MTT (Sigma). Promastigotas da fase log de crescimento foram adicionados em meio BHI completo. A suspensão de parasitos foi disposta em placas de cultura de 96 poços ( $1 \times 10^6$  parasitos/poço) e incubada a  $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$  com concentrações crescentes da toxina, por até 72 horas. Culturas tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura  $20\mu\text{L}$  de uma solução a  $5\text{mg/mL}$  de MTT e a cultura mantida a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. Após este período, foram adicionados  $100\mu\text{L}$  da solução de SDS contendo 10% de HCl  $0,01\text{M}$ . A intensidade da reação foi determinada pela leitura da densidade óptica a  $570\text{nm}$  em um leitor de ELISA (BioTeK – Elx50).

#### **5.5. Ensaio antiproliferativo**

Para avaliar os efeitos do MjTX-I na proliferação de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, os parasitas ( $5 \times 10^6$  células/mL) foram cultivados em cultura de 24 poços contendo meio BHI na ausência (controle) ou presença de MjTX-I (10 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ). Para visualização de células viáveis foi adicionado azul de tripan. As concentrações de promastigotas foram monitoradas em 24, 48 e 72 horas em Câmara de Neubauer.

#### **5.6. Análise de ultraestrutura e morfologia**

Com o objetivo de avaliar alterações ultraestruturais, os parasitas foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para isso, promastigotas ( $5 \times 10^6$  células/mL, fase log) foram incubados por 72h na presença ou ausência (controle negativo) da MjTX-I nas concentrações de 10 e 40  $\mu\text{g/mL}$ . Após o tratamento, os parasitas foram fixados com glutaraldeído a 2,5% diluído em PBS  $0,1\text{ M}$ , pH 7,2, por 24 horas a  $4^\circ\text{C}$ , lavados em PBS e pós-fixados por

1h em solução contendo tetróxido de ósmio a 1%. (OsO<sub>4</sub>) e 0,8% de ferrocianeto de potássio em PBS. As células foram lavadas em PBS, desidratadas em série graduada de acetona e embebidas em resina. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e então observados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### **5.7. Ensaio de susceptibilidade dos promastigotas a Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)**

Para avaliar o efeito da MjTX-I sobre a formação e susceptibilidade de espécies reativas de oxigênio intracelular, foi realizado o ensaio ROS conforme Teixeira e colaboradores, 2020 com modificações. Brevemente, parasitas a (número de células) foram semeados e tratados com a MjTX-I (concentrações) ou meio (controle negativo) por 24h. Posteriormente, ocorreu-se a marcação dos parasitas com sonda ROS e PI, e os resultados analisados através da citometria de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter, Estados Unidos) com mensuração da intensidade de fluorescência DCF pelo software FlowJo (versão 7.6.3). Os dados foram apresentados como mediana da intensidade de fluorescência.

### **5.8. Avaliação de dano mitocondrial**

O corante fluorescente Rodamina 123 foi utilizado para avaliar o potencial transmembranar mitocondrial de promastigotas. Inicialmente, os parasitas (5x10<sup>6</sup> células/mL) foram tratados ou não (controle negativo) com a MjTX-I nas concentrações de 10 e 40 ug/ml por 24, 48 e 72h. Alíquotas foram incubadas com rodamina 123 (15 ug/mL) por 15 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Posteriormente, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS, fixados em paraformaldeído 1% em tampão cacodilato e lavados duas vezes com PBS novamente. A análise da população celular foi realizada através do citômetro de fluxo (BD Accuri C6 - Biosciences, CA, EUA) e um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida como correspondente aos parasitas. Três experimentos independentes foram realizados.

### **5.9. Ensaio de Invasão em macrófagos**

Os macrófagos RAW 264.7 ( $1,0 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados numa placa de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm em cada poço. Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (10 parasitas por/célula) foram pré-tratados ou não com 10 e 40  $\mu\text{g/mL}$  de MjTX-I por 1 h, e em seguida incubados com as células por 3 horas a 23 °C. Posteriormente, as células foram fixadas com solução de Bouin (HT10132 Sigma Aldrich) e coradas com Giemsa (1:20 – P3288 Sigma Aldrich). Por fim, as lamínulas foram analisadas ao microscópio óptico para avaliar os seguintes parâmetros: número de células com parasitas invadidos (taxa de invasão) e número total de parasitas invadidos nessas células em um total de 200 células examinadas aleatoriamente.

### **5.10. Ensaio de Proliferação em macrófagos infectados**

Macrófagos RAW 264.7 ( $1,0 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados em placa de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm em cada poço e infectados 10 parasitas por/célula por 3 h. a 23°C. As células foram cuidadosamente enxaguadas várias vezes com 1x PBS para remover o excesso de parasitas extracelulares. Em seguida, as células foram incubadas com MjTX-I (10  $\mu\text{g/mL}$ ) ou meio de cultura por 24 e 72 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Além disso, o presente estudo utilizou a anfotericina B (1  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sigma #1397-89-3) como medicamento padrão ouro contra a leishmaniose. Finalmente, as células foram fixadas e coradas como mencionado acima (5.9), e o número total de amastigotas intracelulares foi contado em um total de 100 células infectadas examinadas aleatoriamente em microscópio óptico.

### **5.11. Análises estatísticas**

Todos os ensaios foram realizados em uma média de 3 experimentos, sendo os dados verificados primeiramente para distribuição normal através dos testes de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Sminov. As diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA, two-way ANOVA e o teste t de Student, de acordo com o projeto experimental (GraphPad

Prism Software version 6.01).

## REFERÊNCIAS

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas dermo-sifiliograficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 233, p. 80-86, 2021.

AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALVAR, J. et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, p. B244-B249, 2013.

ANTONIA, A. L.; KO, D. C. Leishmaniasis: A spectrum of diseases shaped by evolutionary pressures across diverse life cycle. **Evolution, medicine, and public health**, v. 2020, n. 1, p. 139-140, 2020.

ARANSAY, A. M. et al. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. **Insect molecular biology**, v. 9, n. 2, p. 157-168, 2000.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101-117, 2019.

ASATO, Y. et al. Phylogenetic analysis of the genus Leishmania by cytochrome b gene sequencing. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 352-361, 2009.

ASSIS, L. H. C. et al. Cell cycle, telomeres, and telomerase in Leishmania spp.: What do we know so far? **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 3195, 2021.

BAKER, N. et al. Systematic functional analysis of Leishmania protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. **Nature communications**, v. 12, n. 1, 2021.

BASSETTI, M. et al. Characteristics of staphylococcus aureus bacteraemia and predictors of early and late mortality. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0170236, 2017.

BENATI, R. B. et al. Cytotoxic and pro-apoptotic action of MjTX-I, a phospholipase A2 isolated from Bothrops moojeni snake venom, towards leukemic cells. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 24, n. 1, 2018.

BERNARDES FILHO, F.; QUEIROZ, R. M.; NERY, B. American tegumentary

leishmaniasis. **The Journal of emergency medicine**, v. 54, n. 5, p. 692-693, 2018.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.

BON, C. et al. Different evolution of phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins ( $\beta$ -neurotoxins) from *elapidae* and *viperidae* snakes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 710, n. 1, p. 142-148, 1994.

BORGES, I. P. et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 119, p. 84-91, 2016.

BUSTILLO, S. et al. Isolation of two basic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 168, p. 113-121, 2019.

CARVALHO, G. **Mecanismos de ativação de neutrófilos infectados por Leishmania infantum: papel do heme e do lipofosfoglicano (LPG)**. 2019. Tese de Doutorado. [s.l: s.n.].

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Leishmania spp-host interaction: There is always an onset, but is there an end? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, 2019.

COSTA, T. R. et al. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645-1656, 2008.

COURA, F. M. et al. Serological, molecular, and microscopic detection of Leishmania in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária [Brazilian journal of veterinary parasitology]**, v. 27, n. 4, p. 570-574, 2018.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CUNHA, C. R. DA et al. Tipificação Epidemiológica dos casos de Leishmaniose Visceral Humana no Brasil, no período de 2013 A 2017. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 41, p. e2578, 2020.

DA ROCHA, G. et al. LEISHMANIOSE VISCERAL E TEGUMENTAR AMERICANA VISCERAL AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **Revista Saúde UniToledo**, n. 2, 2017.

DAMIANOU, A. et al. Essential roles for deubiquitination in Leishmania life cycle progression. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 6, p. e1008455, 2020.

- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.
- DE MORAIS, C. G. V. et al. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmaniaspp.* And *Trypanosoma cruzi* infection. **BioMed research international**, v. 2015, p. 1-19, 2015.
- DINIZ-SOUSA, R. et al. Identification of the molecular determinants of the antibacterial activity of LmutTX, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from *Lachesis muta muta* snake venom (Linnaeus, 1766). **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 122, n. 4, p. 413-423, 2018.
- EFSTATHIOU, A.; SMIRLIS, D. Leishmania protein kinases: Important regulators of the parasite life cycle and molecular targets for treating leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 691, 2021.
- ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M.; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 139, n. 111671, p. 111671, 2021.
- FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) and pregnancy. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 12, n. 1, p. 31-40, 2004.
- GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 25-40, 2017.
- GONÇALVES, A. A. M. et al. An overview of immunotherapeutic approaches against canine visceral leishmaniasis: What has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, 2019.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- GRABNER, A. N. et al. BmajPLA 2 -II, a basic Lys49-phospholipase A 2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasitocidal potential. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 571-581, 2017.
- HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world Leishmania infections. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.
- KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

KUMARI, S. et al. Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 235, n. 106661, p. 106661, 2022.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista pan-amazonica de saude**, v. 1, n. 2, 2010.

LAZAR, L.; TARIQ YOUASH; ABASS, K. Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of genus Leishmania: a review. **Plant Archives**, v. 20, p. 4057-4060, 2020.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 3, p. 307-312, 2003.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520-530, 2012.

LUPI, O. et al. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 6, p. 897-925, 2009.

MACHADO, P. DE A. et al. Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. **Life sciences**, v. 219, p. 163-181, 2019.

MANN, S. et al. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MARLOW, M. A. et al. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: New endemic areas in the southern frontier. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e56177, 2013.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2010.

MOREIRA, D. et al. Leishmania infantum modulates host macrophage mitochondrial metabolism by hijacking the SIRT1-AMPK axis. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004684, 2015.

MOSIMANN, V. et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta tropica**, v. 182, p. 246-250, 2018.

MOURA, A. A. DE et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

NUNES, D. C. O. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops*



*pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, n. 7, p. 844-854, 2013.

NUNES, E. et al. Antibiofilm activity of acidic phospholipase isoform isolated from *Bothrops erythromelas* snake venom. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 606, 2020.

OFFOR, B. C.; MULLER, B.; PIATER, L. A. A review of the proteomic profiling of African Viperidae and Elapidae snake venoms and their antivenom neutralisation. **Toxins**, v. 14, n. 11, p. 723, 2022.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

PELLISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

READY, P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**, p. 147, 2014.

RISPAIL, P.; LÉGER, N. Numerical taxonomy of old world phlebotominae (Diptera: Psychodidae): 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 787-793, 1998.

ROCHA, M. A. N. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 609-614, 2018.

SALVADOR, G. H. M. et al. Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin - a novel feature in Lys49-PLA2s protein class. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60610, 2013.

SARKAR, S. et al. Snake bite associated with acute kidney injury. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 36, n. 12, p. 3829-3840, 2021.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology research**, v. 120, n. 5, p. 1541-1554, 2021.

SERAFIM, T. D. et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021.

SOARES, A. M. et al. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 2, p. 258-270, 2004.

TASLIMI, Y., ZAHEDIFARD, F., & RAFATI, S. (2018). Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145(4), 497-507. doi:10.1017/S003118201600216X. [s.l: s.n.].

TEIXEIRA, S. C. et al. Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. *International journal of biological macromolecules*, v. 164, p. 616-625, 2020.

TELES, G. DA C.; FONSECA, F. R.; GONÇALVES, M. J. F. American tegumentary leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 61, 2019.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in veterinary science*, v. 130, p. 19-25, 2020.

TSAI, J.-C. et al. In vitro/in vivo correlations between transdermal delivery of 5-aminolaevulinic acid and cutaneous protoporphyrin IX accumulation and effect of formulation. *The British journal of dermatology*, v. 146, n. 5, p. 853-862, 2002.

TUON, F. F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *International journal of dermatology*, v. 47, n. 2, p. 109-124, 2008.

URSINE, R. L. et al. American Tegumentary Leishmaniasis in an endemic municipality in the North of Minas Gerais State: spatial analysis and socio-environmental factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 63, 2021.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. *Infectious disease clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019.

VARIZA, P. Caracterização da fauna de flebotomíneos (diptera: psychodidae) no sul de Santa Catarina, Brasil. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde. [s.l: s.n.].

VOLPEDO, G. et al. Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. *Frontiers in immunology*, v. 12, 2021.

WARRELL, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. *Infectious disease clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 17-38, 2019.

YASMIN, H. et al. Host-pathogen interaction in leishmaniasis: Immune response and vaccination strategies. *Immuno*, v. 2, n. 1, p. 218-254, 2022.

# CAPÍTULO I

**Antileishmanial activity of PLA<sub>2</sub> Lys49 MjTX-I, isolated from *Bothrops moojeni* snake venom**

Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade<sup>1#</sup>, Samuel Cota Teixeira<sup>2\*#</sup>, Bruna Cristina Borges<sup>2</sup>, Guilherme de Souza<sup>2</sup>, Iasmin Aparecida Cunha Araújo<sup>2</sup>, Luísa Carregosa Santos<sup>1</sup>, Vinícius Queiroz Oliveira<sup>1</sup>, Vitor L. da Silva<sup>3</sup>, Thiago Macedo Lopes Correia<sup>1</sup>, Lucas Miranda Marques<sup>1</sup>, Patrícia Bianca Clissa<sup>4</sup>, Cristiani Baldo da Rocha<sup>5</sup>, Marcelo José Barbosa Silva<sup>2</sup>, Marcelo S. da Silva<sup>6</sup>, Eloisa Amália Vieira Ferro<sup>2</sup>, Bellisa Freitas Barbosa<sup>2</sup>, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila<sup>7</sup>, Daiana Silva Lopes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute Multidisciplinary in Health, Federal University of Bahia (UFBA), Vitória da Conquista, BA, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil;

<sup>3</sup>Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil;

<sup>4</sup>Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil;

<sup>5</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil;

<sup>6</sup>Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil;

<sup>7</sup>Laboratory of Biochemistry and Animal Toxins, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, (UFU), Uberlândia, MG, Brazil;

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors: Dr. Samuel Cota Teixeira and Prof. Dr. Daiana Silva Lopes

E-mail addresses: samuctx@gmail.com and lsdaiana@yahoo.com.br

Phone: +55 (77) 3429-2700

Laboratory address: Hormindo Barros, 58 - Candeias, Vitória da Conquista - BA, 45029-094

## Abstract

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The currently available treatment presents high toxicity, high cost, parasite resistance and difficulties in cure. In this sense, snake venoms are a promising source of study, since they have a series of bioactive compounds with therapeutic potential, among these, phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) stand out. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of PLA<sub>2</sub> MjTX -I, isolated from *Bothrops moojeni venom* on the growth and viability of promastigote forms of *Leishmania Leishmania amazonensis*. In addition, were evaluated, changes in the parasite's ultrastructure and action of the toxin in the process of infectivity in macrophages. MjTX-I showed activity against the promastigote forms of the parasite at 24 and 72 hours, with an IC<sub>50</sub>= 36.54 ug / mL 72 hours after treatment. Furthermore, the results of the growth curve demonstrate a total inhibition of parasite proliferation at a concentration of 40µg/ mL of the toxin after 72 hours of treatment. Ultrastructural studies by scanning electron microscopy in promastigotes treated with MjTX-I revealed the presence of a double flagellum and rounding of the parasite tip. It was also observed that the toxin increased the production of ROS and decreased the membrane potential in the assay (10 and 40 µg / mL) using the rhodamine 123 probe. MjTX-I interfered with the invasion capacity of the pre-treated promastigotes (10 and 40 µg / mL), decreasing the number of infected cells and the number of parasites per infected cell. Finally, the treatment of infected macrophages reduced the proliferation of parasites (10 µg / mL) at 72 hours. Our results suggest that PLA<sub>2</sub> MjTX-I is an important tool for the discovery of new targets in the parasite that can be exploited for the development of new drugs for the treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, phospholipases A<sub>2</sub>, snake venom, *Bothrops moojeni*.

## 1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is a chronic multisymptomatic disease whose etiological agents are parasites of the genus *Leishmania*, belonging to the Trypanosomatidae family (Mukunya et al, 2019; Akhoundi et al, 2016; Alvar et al., 2013) and is transmitted between animals and humans through the bite of female sandfly mosquitoes of different genders (Coura et al., 2018). Leishmaniasis effects a large number of people with high mortality rates are considered by the World Health Organization (WHO) to be a neglected tropical disease. In 2017, 49,959 cases were reported to the Pan-American Health Organization (SisLeish – PAHO/WHO) by 17 endemic countries. In general, there was a decrease in the number of cases in 9 endemic countries, nevertheless, the total number of cases in the region has maintained stable compared to 2016 due to the increase in Brazil (38%), Costa Rica (94%), Mexico (88%) and Ecuador (36%). From the total of the 2017 cases, 72.6% were reported by Brazil (17,526). The most usual forms of the disease are cutaneous leishmaniasis (CL), visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), respectively. CL is the most common form and usually produces ulcers on the exposed parts of the body, such as the face, arms and legs. In addition, there may be many lesions which can cause serious disability. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* affects skin causing ulcers characteristic of cutaneous leishmaniasis (Grevelink and Lerner, 1996; Basano and Camargo, 2004; García-Almargo, 2005).

Leishmaniasis are a health problem since of their cost, the absence of satisfactory treatments, the adverse effects of treatments, their mode of administration limiting their use and the emergence of drug-resistant strains. First-line treatment for leishmaniasis is based on pentavalent antimonials whereas amphotericin B, pentamidine, and paromomycin are second options for resistant cases (Croft, et al., 2006; Ouellette, et al., 2004, Pelissari, et al., 2011). During the last decades, the treatment of leishmaniasis remains a challenge (Akbari et al., 2021). In this sense, there is an urgency to study new compounds

with antiparasitic activities, specifically for leishmaniasis and Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) from snake venoms are promising targets in this research.

PLA<sub>2</sub>s are able to hydrolyze the 2-acyl ester bond of phospholipids by releasing fatty acids and lysophosphatides (Arni and Ward, 1996; Kini, 2003). However, the replacement of the amino acid aspartate by a lysine in position 49 provokes loss of enzymatic activity of these PLA<sub>2</sub> (Lomonte et al., 2003). Interestingly, these catalytically inactive Lys49-PLA<sub>2</sub>s still provoking many pharmacological effects by disrupting the integrity of membranes (Lomonte et al., 2003, 2012).

Several PLA<sub>2</sub>s have been characterized from different venoms for its antileishmanial potential, such as *Bothrops pauloensis* (Nunes et al., 2013), *B. moojeni* (Stabeli et al., 2006), *B. mattogrossensis* (Moura et al., 2014), and *B. brazili* (Costa et al., 2008). BnSP-7, a Lys49-PLA<sub>2</sub> from *B. pauloensis* snake venom inhibited growth of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes and induced a delay in amastigote-promastigote differentiation and ultrastructural changes in promastigote morphology. Given these aspects, this work aimed to gain insights into the underlying anti-*Leishmania* mechanisms mediated by PLA<sub>2</sub>s. Therefore, we used a distinct Lys49-MjTX-I, isolated from crude venom of *B. moojeni*, to assess its direct action on *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes, as well as on murine macrophages by using *in vitro* approaches.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 MjTX-I purification**

MjTX-I was purified from *Bothrops moojeni* snake venom as previously described by Soares and collaborators [25] in collaboration with the Butantan Institute (Co-author PBC).

### **2.2 Cell culture**

Murine macrophages cell line (RAW 264.7) was maintained in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, 2mM sodium pyruvate, 1mM non-essential amino acids, 100U/mL

penicillin and 100mg / mL of streptomycin at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.3 Parasite**

*Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes (IFLA/BR/67/PH8) were cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) medium, pH 7.2, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin (100UI/L) and 1% streptomycin (100mg/ mL), 2% glucose - complete BHI - at 23 ± 0.5°C. After 6 days of culture, when the promastigotes reached the stationary phase, the parasites were centrifuged at 1800 RPM for 10 minutes, resuspended and used in the following experiments.

### **2.4 Cellular viability in promastigote**

Cell viability of the parasites was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Promastigotes (1.0 × 10<sup>6</sup> parasites/well) were placed in 96-well culture plates and incubated in two-fold serial dilution of PLA<sub>2</sub> (from 0.781 to 80 µg/mL) or Amphotericin B (from 0001 to 1 µg/mL) for 72 h at 23°C. Control parasites were incubated with medium only. After 24, 72 h, promastigotes were incubated with 5 mg/mL MTT for 3 h at 37 °C. Next, were dissolved by adding 100µL of PBS containing 10% SDS and 0.01 M HCl. After 18 h, intensity of the reaction was measured in a multi-well scanning spectrophotometer (MultiskanGO, Thermo Scientific) at 570 nm. Finally, results were expressed as the percentages of viable cells in relation to untreated control (100% viability) Cell viability was reported in percentages (viability %), with the absorbance of cells incubated only with culture medium considered as 100% viable. The selectivity index (SI) was determined as the ratio between the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) against *Leishmania (L.) amazonensis*.

### **2.5 Antiproliferative assay**

In order to evaluate the effects of MjTX-I on the proliferation of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes, parasites (5×10<sup>6</sup> cells/mL) were cultured in 24-well culture containing BHI medium in the absence (control) or presence of MjTX-



I (10 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The promastigote concentrations were monitored at times of 24, 48 and 72 h blind counts in a Neubauer Chamber.

## **2.6 Analysis of ultrastructure of promastigotes**

In order to evaluate ultrastructural changes, the parasites were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Promastigotes ( $5 \times 10^6$  cells/mL, log phase) were incubated for 72h in the presence or absence (negative control) of MjTX-I (10 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). After treatment, the parasites were fixed with 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M PBS, pH 7.2, for 24 hours at 4°C, washed in PBS and post-fixed for 1 h in a solution containing tetroxide. 1% osmium. ( $\text{OsO}_4$ ) and 0.8% potassium ferrocyanide in PBS. Cells were washed in PBS, dehydrated in a graded series of acetone and embedded in resin. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and then viewed in a Zeiss EM 109 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## **2.7 Reactive oxygen species (ROS)**

To evaluate the effect of MjTX-I on the formation and susceptibility of intracellular reactive oxygen species, the ROS assay was performed according to Teixeira et al., 2020 with modifications. Briefly, parasites ( $5 \times 10^6$  cells/mL) were cultured in 24-well culture containing BHI medium in the absence (control) or presence of MjTX-I (10 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 72 h. Subsequently, the parasites were marked with a ROS and PI probe, and the results were analyzed using Cytoflex flow cytometry (Beckman Coulter, United States) with measurement of DCF fluorescence intensity by FlowJo software (version 7.6.3). Data were presented as median fluorescence intensity.

## **2.8 Assessment of mitochondrial damage**

Rhodamine 123 fluorescent dye was used to evaluate the mitochondrial transmembrane potential of promastigotes. Initially, the parasites ( $5 \times 10^6$  cells/mL) were treated with MjTX-I (10 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 72h. Samples were incubated

with rhodamine 123 (15 µg/mL) for 15 minutes at room temperature protected from light. Subsequently, the parasites were washed twice with PBS, fixed in 1% paraformaldehyde in cacodylate buffer and washed twice with PBS again. Cell population analysis was performed using a flow cytometer (BD Accuri C6 - Biosciences, CA, USA) and a total of 10,000 events were acquired in the region previously established as corresponding to the parasites. Three independent experiments were performed.

## **2.9 Invasion assay**

Macrophages RAW 264.7 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) were cultured in a 24-well plate containing 13-mm coverslips in each well. After adhesion, *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes, with a multiplicity of infection (MOI) of 10 parasites per 1 cell, were pre-treated or not with 10 and 40 µg/mL of MjTX-I for 1 h, and then allowed to interact with cells for 3 h at 23 °C. Afterwards, cells were fixed with Bouin's solution (HT10132 Sigma Aldrich) and stained with Giemsa (1:20 – P3288 Sigma Aldrich). Finally, the coverslips were analyzed under a light microscope to assess the following parameters: number of cells with invaded parasites (invasion rate) and total number of parasites invaded to these cells in a total of 200 cells examined randomly.

## **2.10 Proliferation assay**

Macrophages RAW 264.7 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) were cultured in a 24-well plate containing 13-mm coverslips in each well and infected with a MOI of 10:1 of promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* for 3 h at 23°C. Cells were carefully rinsed several times with 1x PBS to remove the excess of extracellular parasites. Next, cells were incubated with MjTX-I (10 µg/mL) or culture medium for 24 and 72 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Also, the present study used the amphotericin B (1 µg/mL) (Sigma #1397-89-3) as a gold standard drug against leishmaniasis. Finally, the cells were fixed and stained as mentioned above, and the total number of intracellular amastigotes were counted in a total of 100 infected cells examined randomly an optical microscope.

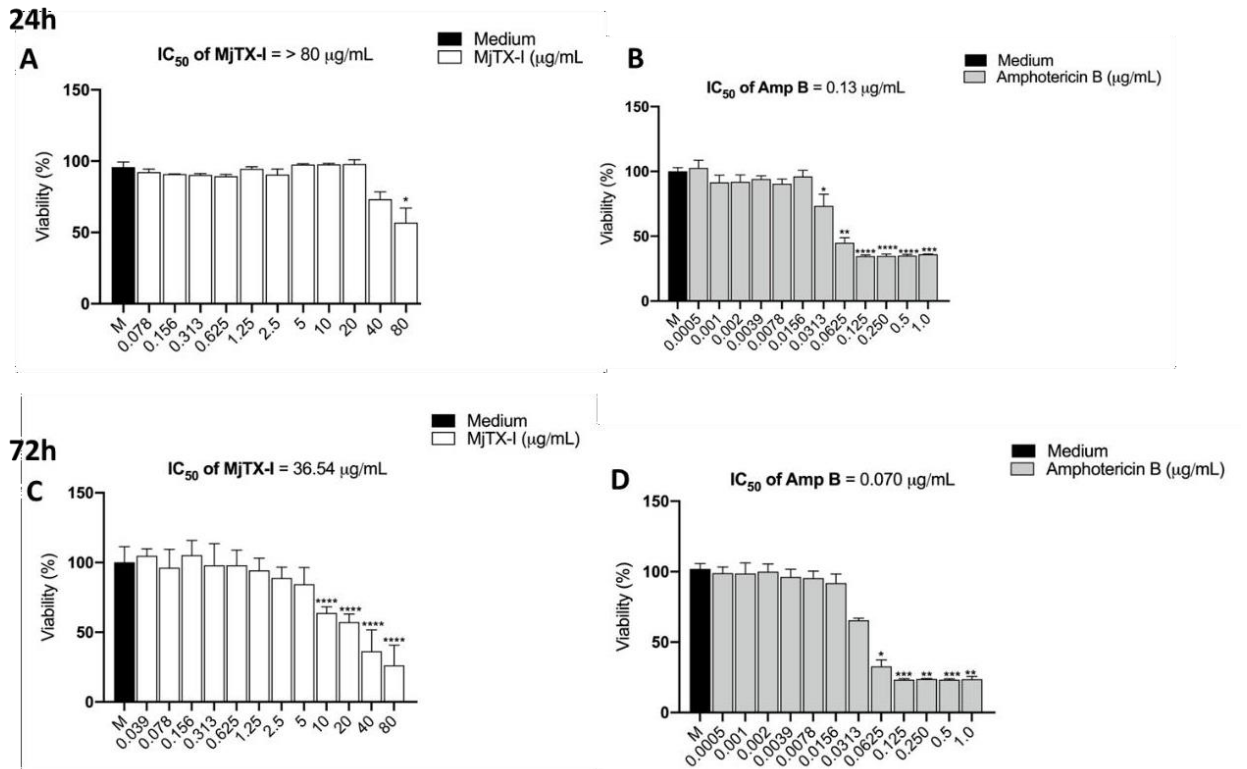
## 2.11 Statistical analysis

All assays were performed in an average of 3 experiments, with the data first checked for normal distribution using the D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Sminov tests. Statistical differences were determined by one-way ANOVA, two-way ANOVA and Student 's t-test, according to the experimental design (GraphPad Prism Software version 6.01).

## 3. RESULTS

### 3.1 Cell viability assay of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes

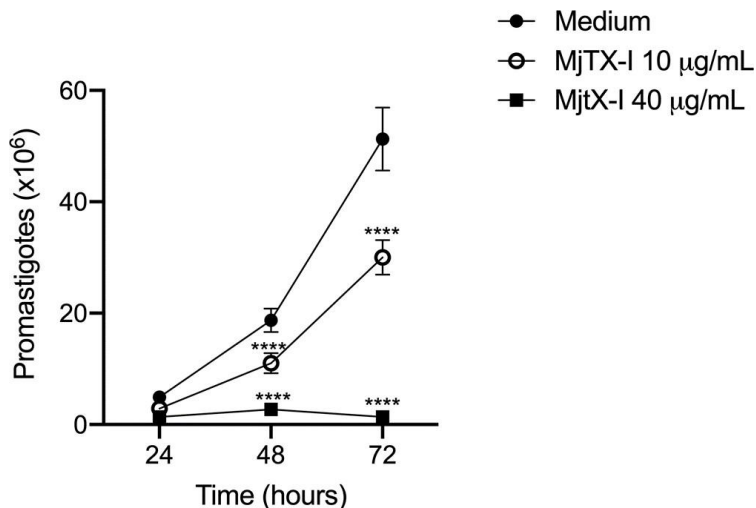
To verify cytotoxicity induces by MjTX-I in promastigotes, a MTT assay was performed. As shown in Fig. 1A, a significant reduction in the viability of promastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis* was observed only at the highest concentration tested (80 $\mu$ g/ mL) after 24 hours of treatment with half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}>80$  ug / mL). Furthermore, the PLA<sub>2</sub> inhibited growth of in a concentration-dependent manner with  $IC_{50}$  value of  $IC_{50} = 36.54\mu$ g/ mL (Figure 1C). In contrast, Amphotericin B (AmpB) significantly reduced the viability of the parasites with  $IC_{50} = 0,13$   $\mu$ g/ mL (Figure 1B) and  $IC_{50} = 0.070$  ug / ml (Figure 1D) at 24 and 72 hours respectively.



**Figure 1:** Viability of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes treated with MjTX-I (0.781 to 80  $\mu$ g/mL) or Amphotericin B (0.005 to 1  $\mu$ g/mL) for 24 hours (Figure A and B) and 72 hours (Figure C and D). \*Statistically significant difference when compared with the control group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.2 Proliferation of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes

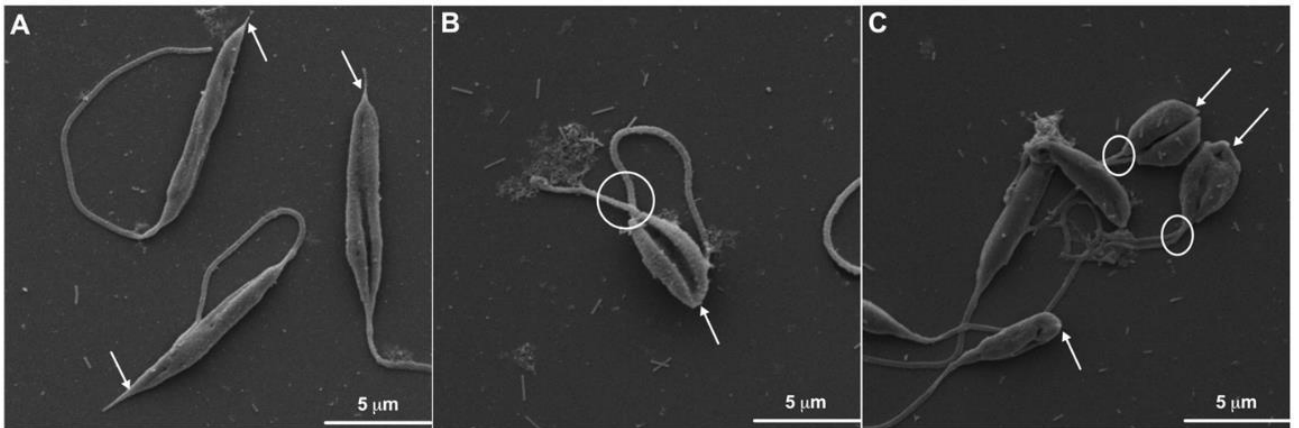
Promastigotes forms were incubated with MjTX-I (10 and 40  $\mu$ g/ mL) or medium (negative control) for 24, 48 and 72h and the results of the growth curve demonstrate a total inhibition of parasite proliferation at 40 $\mu$ g/ mL of the toxin after 24 and 72 hours of treatment and significant inhibition at 10  $\mu$ g/ mL of MjTX-I, when compared with the control (Figure 2).



**Figure 2:** Proliferation of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. The growth of promastigotes was monitored in parasites cultivated in medium at 23 °C in the absence (control) or presence of MjTX-I (10 and 40 µg/ml) up to 72 h. The toxin was added to the culture at hour 0. The parasite concentration was determined daily. \*Statistically significant difference when compared with the control group \*\*\*p < 0.001.

### 3.3 Analysis of promastigote ultrastructure

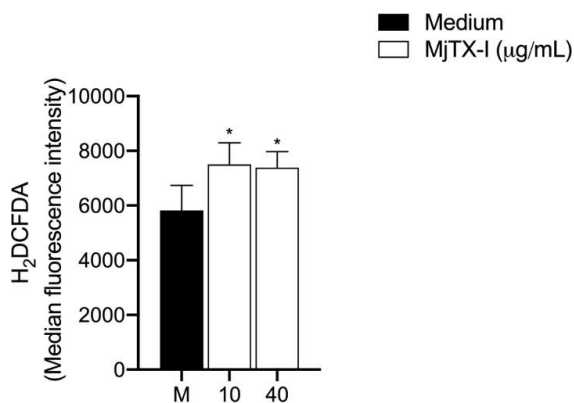
Based on cytotoxic and antiproliferative effects induced by MjTX-I on *Leishmania (L.) amazonensis*, the next step was to investigate the effect of toxin on parasite morphology. The observation of untreated promastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis* by Scanning electron microscopy (SEM) showed all the typical ultrastructural characteristics of the parasite (Figure 3A), presenting single flagellum. Parasites treated with MjTX-I revealing the presence of a double flagellum and rounding of the extremity of the parasite, in both tested concentrations (10 and 40µg/ mL), as shown in figure 3B and 3C. In addition, also were observed body multi-septated, and the flagellum shortened.



**Figure 3:** Ultrastructural and morphological alterations of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. The parasites were treated with medium (negative control) (A) and MjTX-I at 10µg/ mL (B) and 40µg/ml(C). Arrows indicate the presence of a single flagellum (A) and double flagellum (B and C). Scale bar: 5 µm.

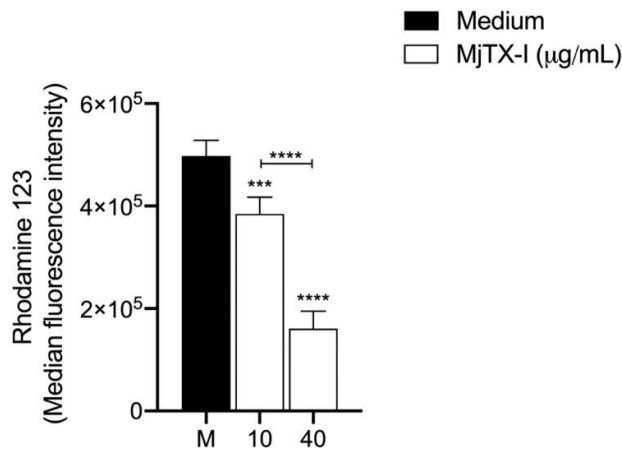
### 3.4 Mitochondrial damage

Parasite mitochondrial function was evaluated by ROS production (Figure 4) and by mitochondrial transmembrane potential through the quantification of rhodamine123 (Figure 5). MjTX-I (10 and 40µg/ mL) significantly increased ROS production, considering the median fluorescence intensity (H<sub>2</sub> DCFDA) when compared to control 72 hours after treatment. In parallel the spectrofluorometric data presented in Figure 5 indicate a decrease median fluorescence intensity in rhodamine 123 assay after toxin treatment.



**Figure 4:** Measurement of reactive oxygen species by median fluorescence intensity. Promastigotes were treated with MjTX -I (10 and 40µg/ mL) or medium

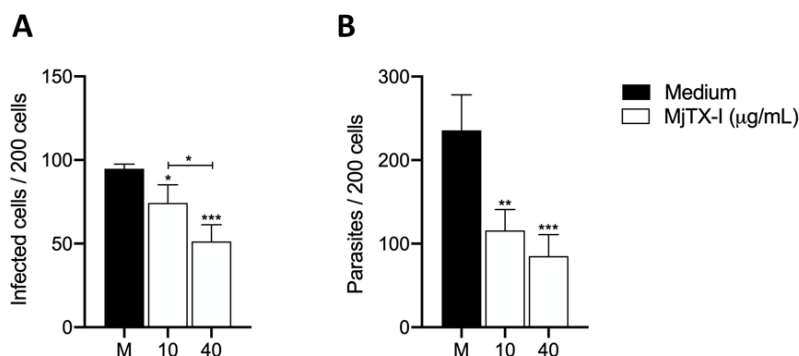
(negative control). Symbol (\*) indicates significant difference when compared with the control group. \* $p < 0.05$ .



**Figure 5:** Membrane potential measured using the rhodamine 123 probe. Promastigotes were treated with MjTX -I (10 and 40µg/ mL) or medium (negative control). Symbol (\*) indicates significant difference when compared with the control. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.5 Invasion assay of *Leishmania (L.) amazonensis* in macrophages

In order to measure the effects of MjTX-I on the invasion of parasites in macrophages, *Leishmania (L.) amazonensis* were pre-treated with MjTX -I for 72h. Our data showed that the pre-treatment of promastigote with MjTX-I PLA<sub>2</sub> (10 and 40 µg/mL) for 1h reduced number of infected cells and the number of intracellular parasites in comparison with the untreated control group ( $p < 0.05$ ; Figure 8A and 8B).

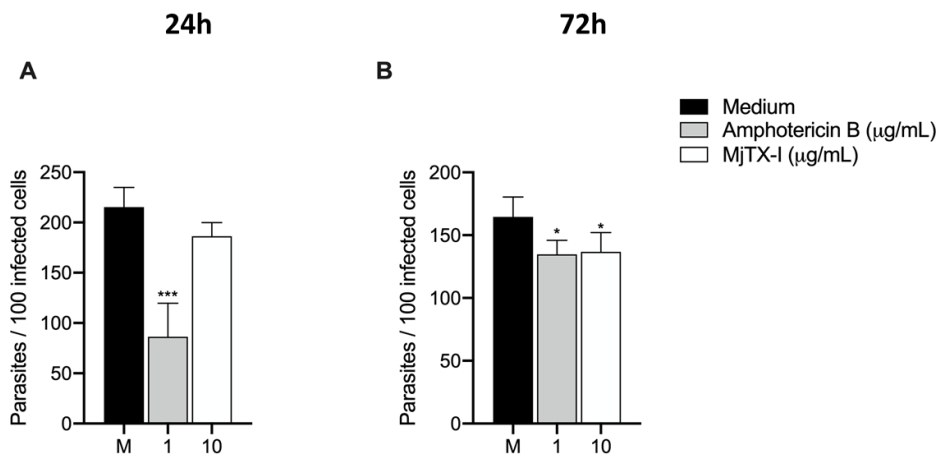


**Figure 8:** Invasion of *Leishmania (L.) amazonensis* in macrophages in two experimental situations. *Leishmania (L.) amazonensis* were pre-treated with MjTX -I (10 and 40µg/ mL) for 72h to verify the number of infected cells (A) and the number of parasites per cell (B). Macrophages were pre-treated with the toxin for 24h to verify the

number of infected cells (C) and the number of parasites per cell (D). Symbol (\*) indicates significant difference when compared with the control group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.6 Proliferation assay in infected macrophages

To verify the effect of MjTX-I on the proliferation *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes forms in infected macrophages, they were treated with the toxin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), medium (negative control) and with Amp B for 24 and 72 hours. For the treatment time corresponding to 24h, no effect of MjTX -I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was observed. on the reduction of parasite proliferation in infected cells, however, treatment with Amp B (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed a significant reduction in the number of parasites per cell (Figure 7A). In relation to the same test, performing the treatments for 72 hours, a considerable decrease in the number of parasites per cell was verified both in the treatment with MjTX -I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and with Amp B (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figure 7B).



**Figure 7:** Number of parasites per infected macrophage. Cells were infected and treated with MjTX -I (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Amphotericin (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or culture medium (negative control) for 24h (A) and (72h) (B). Symbol (\*) indicates significant difference when compared with the control group. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



#### 4. DISCUSSION

Snake venom phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) have been widely explored for their antileishmanial potential (Tempone, et al., 2000; Nunes, et al., 2012; Torres, et al., 2010). In this sense, we showed the antileishmanial effects of MjTX-I, a Lys49-PLA<sub>2</sub>, isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. For this, we first evaluated if the toxin had any leishmanicidal activity on promastigote forms. Our results showed that MjTX-I inhibited the growth and viability of promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* in a time- and dose-dependent manner.

Corroborating with our data, myotoxins I and II (MTX-I and II), isolated from *B. brazili* snake venom, also induced increased leishmanicidal activity against *L. braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* (Costa et al., 2008). In a work carried out by Moura et al., 2014, BmatTX-I and BmatTX-III, PLA<sub>2</sub>s Lys49-like and Asp49, respectively, isolated from *B. mattogrossensis* showed antileishmanial activity at different concentrations, when compared to Pentamidine, used as a positive control.

In the following assay, we demonstrated that MjTX-I inhibits growth of promastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis*, showing reduction in a dose-dependent manner of the parasite's growth. In a study carried out by Nunes, 2011, treatment with BnSP-7, a PLA<sub>2</sub> derived from *B. pauloensis* venom, reduced the proliferation of the same parasite by approximately 70% in the highest concentrations evaluated (50 to 200 µg/ mL) in 96 h of treatment in a dose-dependent manner.

Interestingly, even without showing catalytic activity, PLA<sub>2</sub> from snake venoms have revealed an effect on the viability and growth of the parasites. In this case, studies suggest that such potential is related to an important region for this type of toxin, the C-terminus region, corresponding to amino acid positions between 115 and 129 (Stábeli et al., 2006; Nevalainen et al., 2008)

We further investigated the ultrastructural and morphological alterations in the *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes after MjTX-I treatment. Scanning electronic microscopy (SEM) analyzes demonstrated a reduction and rounding of the body cellular volume, as well as flagellum duplication and body

was frequently multi-septated, and the flagellum shortened. In line with these findings, Nunes, 2011 demonstrated a similar effect of BnSP-7 on promastigotes forms of the same parasite, highlighting rounded shape of the promastigote body, the blebbing effect, mitochondrial swelling and cytoplasm shrinking observed by transmission electronic microscopy. In addition, extensive swelling and vacuolization of the mitochondrion could be observed in *L. major* induced by *B. jararaca* snake venom (Gonçalves, et al., 2002).

To unravel the possible mechanism of action of MjTX-I against *Leishmania (L.) amazonensis*, we measured both ROS production and the mitochondrial membrane potential of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes after treatment. The maintenance of mitochondrial membrane potential is crucial for the functionality of mitochondria since it is involved with oxidative ATP synthesis and control of ROS production levels (Brookes, 2005). Thus, the production of ROS such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may influence mild dysfunctions in the mitochondrial membrane potential and induced signs of the apoptosis-like processes in *Leishmania* (Mehta, et al., 2004). Our data demonstrated that the toxin induced the reduction in ROS (H<sub>2</sub>DCFDA) production probably as consequence of a mitochondrial alteration caused by this PLA<sub>2</sub>. These results support the hypothesis that MjTX-I may be able to cause apoptosis-like death in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. Das, et al., 2021, also showed an increase of intracellular ROS (H<sub>2</sub>DCFDA) and significant mitochondrial damage in *L. donovani* promastigotes, which is an indicative of imbalanced cellular redox homeostasis and programmed cell death (PCD) in parasites treated with curcumin analogue, HO-3867.

Finally, to investigate whether the antileishmanial effect of MjTX-I observed in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes extended to intracellular amastigotes, we promoted the pre-treating of parasites and treated *Leishmania (L.) amazonensis*-infected macrophages, and then analyzed the indexes of invasion and proliferation, respectively. Macrophages are the main phagocytic cells playing a dual role in *Leishmania* infection acting as chief host cells sustaining amastigote multiplication as well as helping in parasite clearance and play an important role in the immune control of parasites, by means of producing cytokines and metabolic oxygen compounds such as nitric oxide (NO)

(Balaraman, et al., 2004; Tomiotto-Pellissier et al., 2018). In our study MjTX-I were able to decrease invasion and proliferation of parasites treated before infection, which reveals that this toxin is able to be targeting directly the parasites, as well as to modulate host cells controlling parasite infection. Similarly, BnSP-7 toxin interfered with the infective capacity of promastigotes in murine peritoneal macrophages, causing statistically significant reductions at all toxin concentrations tested. Furthermore, macrophages infected with BnSP-7-pre-treated promastigotes showed a decreased parasite load. Borges, et al., 2012, also showed a significant reduction in *Toxoplasma gondii* proliferation by BnSP-7.

## 5. CONCLUSION

The present research demonstrated the effects of MjTX -I, a Lys49-PLA<sub>2</sub> isolated from *B. moojeni* snake venom on promastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis*, showing reduced cell viability, proliferation of parasites, induction of morphological alterations, as well as increased production of ROS and reduction of processes related to parasite infection, as invasion and proliferation in macrophages. In this sense, it is emphasized that MjTX-I is an important tool for the discovery of new targets in the parasite that can be exploited for the development of new drugs for the treatment of leishmaniasis.

## 6. DECLARATIONS

### **Funding**

The authors thank the Federal University of Uberlândia (UFU), the Federal University of Bahia (UFBA) and the Brazilian funding agencies, CNPq and FAPEMIG for financial support of this study: FAPEMIG (CBB - APQ-01401-17) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology INCT-TeraNano-CNPq/CAPES/FAPEMIG, Grant numbers CNPq-465669/2014-0). Also, this study was financed in part by the

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - finance code 001.

### **Availability of data and materials**

not applicable

### **Competing interests**

All authors have read the manuscript, agreed with the content, and have approved the submission. The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Credit Author Statement**

**Luísa Carregosa Santos:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization. **Vinícius Queiroz Oliveira:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Samuel Cota Teixeira:** Conceptualization, Investigation, Writing – Review & Editing, Supervision. **Thiago Macedo Lopes Correia:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Lorena Polloni:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Lucas Miranda Marques:** Formal analysis, Resources, Investigation, Writing – Review & Editing. **Patrícia Bianca Clissa:** Formal analysis, Resources, Investigation, Writing – Review & Editing. **Cristiani Baldo da Rocha:** Resources, Writing – Review & Editing. **Eloisa Amália Vieira Ferro:** Resources, Writing – Review & Editing. **Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão:** Formal analysis, Resources, Investigation, Writing - Review & Editing. **Marcelo José Barbosa Silva:** Resources, Writing - Review & Editing. **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila:** Conceptualization, Writing - Review & Editing. **Sabri Saeed Sanabani:** Writing - Review & Editing. **Daiana Silva Lopes:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration.

## REFERENCES

- Akbari, M., Oryan, A., Hatam, G., 2021. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 233, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.03.011>.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *Plos Negl. Trop. Dis.* 10, e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alvar, J., Croft, S.L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S., Reed, S.G., 2013. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine* 31, B244-B249. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.080>
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996b. Phospholipase A2—a structural review. *Toxicon* 34, 827-841. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0)
- B Balaraman, S., Singh, V.K., Tewary, P., Madhubala, R., 2005. *Leishmania* lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139, 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.10.006>
- Balaraman, S., Tewary, P., Singh, V.K., Madhubala, R., 2004. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 639-647. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.097>
- Bañuls, A.-L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* 64, 1-109. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Brookes, Paul S., 2005. Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016>

COSTA, TR., MENALDO, DL, OLIVEIRA, CZ, SANTOS-FILHO, NA, TEIXEIRA, SS, NOMIZO, A., FULY, AL, MONTEIRO, MC BIBIANA, DE SOUZA, M., PALMA, MS, STÁBELI, RG, SAMPAIO SV, SOARES, AM Myotoxic phospholipases A2 isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides* , 2008 v. 29, p.1645-1656.

Coura, F.M., Passos, S.K.P., Pelegriño, M. De O.F., Leme, F. De O.P., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., Costa-Val, A.P. da, 2018. Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 27, 570-574. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180052>

Da Cunha, C., 2017. Epidemiological typification of cases of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil, from 2013 to 2017. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 41, e2578-e2578.

Da Rocha, G., Pereira, Petroni, T., Leishmaniasis Visceral E Tegumentar, A., 2017. LEISHMANIASIS VISCERAL E TEGUMENTAR AMERICANA VISCERAL AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS. *Unitoledo Health Magazine*.

Damianou, A., Burge, R.J., Catta-Preta, C.M.C., Geoghegan, V., Nievas, Y.R., Newling, K., Brown, E., Burchmore, R., Rodenko, B., Mottram, J.C., 2020. Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. *Plos Pathog.* 16, e1008455. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008455>

Das, A., Kamran, M., Ali, N., 2021. HO-3867 induces ROS-dependent stress response and apoptotic cell death in *Leishmania donovani*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.774899>

DE MOURA, KAYANO AM, OLIVEIRA GA, SETÚBAL SS, RIBEIRO JG, BARROS NB, NICOLETE R, MOURA LA, FULY AL, NOMIZO A, DA SILVA SL, FERNANDES CF, ZULIANI JP, STÁBELI RG, SOARES AM, CALDERON LA. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. *Biomed Res Int.* 2014; 195356 .

Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827-840. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>

Lomonte, B., Angulo, Y., Santamaría, C., 2003. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. *Toxicon* 42, 307-312. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00149-1)

Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520-530. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>

Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A.F., Newman, S., Ramanan, P., Suarez, J.A., 2021. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. *Curr. Trop. Med. Rep.* 8, 121-132. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>

Mehta A, Shaha C (2004) Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 279:11798-11813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309341200>

Mukunya, D., 2019. Infections: HIV and related-diseases, anti-microbial resistance and neglected tropical diseases. *Afr. Health Sci.* 19. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i2.2>

Nevalainen, T., 2008. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1781, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.12.001>

Nunes, D., 2011. Effect of a basic phospholipase A 2 isolated from *Bothropoides venom pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) on promastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Dissertation. Uberlândia.

Nunes, D.C.O., Figueira, M.M.N.R., Lopes, D.S., De Souza, D.L.N., Izidoro, L.F.M., Ferro, E.A.V., Souza, M.A., Rodrigues, R.S., Rodrigues, V.M., Yoneyama, K.A.G., 2013. Bnsp-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Parasitology* 140, 844-854. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000012>

Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* 7, 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.07.002>

Pelissari, D.M., Cechinel, M.P., De Sousa-Gomes, M.L., Ferreira De Lima Junior, F.E., 2011. Treatment of visceral leishmaniasis and American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Epidemiol Serv Saúde* 20, 107-110.

Roma, E.H., Macedo, J.P., Goes, G.R., Gonçalves, J.L., Castro, W. De, Cisalpino, D., Vieira, L.Q., 2016. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasit. Vectors* 9, 193. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1472-y>

S.L. Croft, K. Seifert, V. Yardley, Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123 (2006) 399-410.

Sasidharan, S., Saudagar, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitol Res* 120, 1541-1554 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>

Soares, A.M., Sestito, W.P., Marcussi, S., Stábeli, R.G., Andrião-Escarso, S.H., Cunha, O.A.B., Vieira, C.A., Giglio, J.R., 2004. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 258-270. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00237-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00237-1)  
STABELI RG, AMUI SF, SANT'ANA CD, PIRES MG, NOMIZO A, MONTEIRO MC, et al. *Bothrops moojeni* myotoxin -II, a Lys49- phospholipase A2 homologue: an example of versatile function of snake venom proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006;142:371-81 .

Taslimi, Y., Zahedifard, F., Rafati, S., 2018. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology* 145, 497-507. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>

Teixeira, S.C., Borges, B.C., Oliveira, V.Q., Carregosa, L.S., Bastos, L.A., Santos, I.A., Jardim, A.C.G., Melo, F.F., Freitas, L.M., Rodrigues, V.M., Lopes, D.S., 2020. Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 616-625. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178>

Volpedo, G., Pacheco-Fernandez, T., Bhattacharya, P., Oljuskin, T., Dey, R., Gannavaram, S., Satoskar, A.R., Nakhasi, H.L., 2021. Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. *Front. Immunol.* 12, 748325. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748325>