



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

ALEXANDRE SILVA SANTIAGO

AVALIAÇÃO in silico E in vitro DE COMPOSTOS CATECÓLICOS CONTRA
Leishmania amazonensis

Salvador
2022

ALEXANDRE SILVA SANTIAGO

**AVALIAÇÃO *in silico* E *in vitro* DE COMPOSTOS CATECÓLICOS CONTRA
*Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Silva da Rocha Pita

Co-orientadora: Profa. Dr^a Elisalva Teixeira Guimarães

Linha de Pesquisa: Linha 1 -
Prospecção de Fármacos e
Recursos Naturais

Salvador

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema de Bibliotecas da

UNEB

S235a

Santiago, Alexandre Silva

Avaliação in silico e in vitro de compostos catecólicos contra
Leishmania amazonensis / Alexandre Silva Santiago. -Salvador, 2022.
104 fls : il.

Orientador(a): Prof^o Dr^o Samuel Silva da Rocha Pita.

Coorientador(a): Prof^a Dr^a Elisalva Teixeira Guimarães. Inclui

Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia.
Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2022.

1. *Leishmania amazonensis* - Doença. 2. Tripanotoma Redutase.
3. Modelagem Comparativa. 4. Triagem Virtual. 5. Atividade
antileishmania.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE COMPOSTOS CATECÓLICOS CONTRA *Leishmania amazonensis*"

ALEXANDRE SILVA SANTIAGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 29 de setembro de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Professor(a) Dr.(a) SAMUEL SILVA DA ROCHA PITA
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Documento assinado digitalmente
gov.br SAMUEL SILVA DA ROCHA PITA
Data: 26/10/2022 11:02:26-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA

Documento assinado digitalmente
gov.br ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Data: 08/11/2022 19:56:42-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professor(a) Dr.(a) ACÁSSIA BENJAMIM LEAL PIRES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual de Campinas

Documento assinado digitalmente
gov.br ACASSIA BENJAMIM LEAL PIRES
Data: 04/11/2022 22:25:03-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professor(a) Dr.(a) MAGALY GIRÃO ALBUQUERQUE
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Doutorado em Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Documento assinado digitalmente
gov.br MAGALY GIRA O ALBUQUERQUE
Data: 03/11/2022 14:23:30-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo suporte e apoio, em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram no crescimento intelectual e profissional e a minha esposa Thalita Galeão, que desde a graduação sempre foi uma super parceira, sem sombra de dúvidas, sem o seu apoio eu não teria chegado até aqui. Hoje posso falar com orgulho que sou o primeiro mestre da família, graças a vocês!

Em segundo lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Samuel Silva da Rocha Pita, um exemplo de acadêmico, sempre presente, prestativo, atencioso e exigente. A caminhada foi difícil, às vezes sentia que eu era o Daniel San ele o Miyagi (risos), brincadeiras à parte, foram muitos dias inteiros, às vezes até tarde da noite e ele sempre esteve ao meu lado, me auxiliando nas análises e pacientemente explicando cada etapa da nossa jornada. Por muitas vezes durante a pandemia fomos só eu, ele, o porteiro, o segurança e os cachorros da UFBA ocupando aquele prédio todo de Farmácia, muito obrigado Dr! Agradeço também à minha co-orientadora, Elisalva Teixeira Guimarães, que por mais de uma vez me acolheu, e mesmo com toda a dificuldade de acesso e restrições pandêmicas, conseguiu me conceder a oportunidade de estar no Instituto Gonçalo Muniz – Fiocruz Bahia. Oportunidade única que eu agradeço muito. Lá, aprendi muita coisa e pude pôr em prática tudo que anteriormente eu só tinha visto na teoria, muito obrigado por todos os ensinamentos e toda a paciência.

Agradeço também aos colegas da jornada, na Fiocruz. Preciso agradecer imensamente a Francisnaira Santos. “Naira”, você foi uma grande companheira sem a qual eu não teria conseguido terminar meus testes *in vitro* em tempo hábil devido a minha entrada tardia no LETI. Uma pessoa extremamente competente, trabalhadora, proativa e capaz. Você vai longe! Agradeço também a Msc. Dahara Keyse, companheira desde a graduação, que sempre me auxiliou desde a época do pré-projeto até a bancada. Não posso esquecer de Msc. Tatiana Barbosa, também sempre super atenciosa e prestativa. Obrigado por tudo “Tatibasa”. Do LETI não posso esquecer também de Laísia, Luciano e Val.

Do LaBiMM, agradeço a Isabela Estrela, que me acolheu assim que cheguei ao grupo e me ensinou muito do que sei hoje, assim como ao Pedro Lacerda, grande programador que por vezes facilitou muito a minha vida. Agradeço também ao professor Dr. Humberto Fonseca de Freitas, que sempre se mostrou disponível para colaborações e sugestões e aos ICs que de alguma forma fizeram parte dessa jornada: Angne, Jordan, Olívia e Taíse. Da UNEB, agradeço aos farmacêuticos que me fizeram ser quem sou hoje. Ângelo, Maurício, Leonardo, Rafael e Islam do grupo pipocas, um grupo único, no qual a amizade já perdura há uma década.

Agradeço de todo o coração a Léia Omena secretária do PPGFARMA, uma pessoa extremamente solícita, ágil, e acima de tudo extremamente competente e humana, que sempre facilitou a minha vida em todas as questões relacionadas a secretaria do programa. Agradeço ao professor Dr. Aníbal Freitas Jr. por toda a atenção, cuidado e carinho todas as vezes que eu precisei. Aos professores que contribuíram imensamente nessa jornada, em especial ao Dr. André Lacerda Braga Teles que me acompanha desde a graduação, tendo me iniciado no mundo científico e vindo a se tornar um grande amigo. Agradeço também a Djalma e Manoela Carrera com os quais desenvolvi meu tirocínio. Vocês contribuíram de forma muito significativa para meu crescimento profissional e pessoal. Aos colegas da turma IV, os P&G (Dan, Lu, Phydell e Lai), mesmo que virtualmente, vocês tornaram essa caminhada muito mais leve.

Por fim, mas de forma alguma menos importante, agradeço a FAPESB pela bolsa concedida durante todo o período do mestrado.

RESUMO

SANTIAGO, A. S. **AVALIAÇÃO *in silico* E *in vitro* DE COMPOSTOS CATECÓLICOS CONTRA *Leishmania amazonensis*** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2022; 87p.

Introdução: As leishmanioses representam um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Suas manifestações clínicas compreendem a leishmaniose visceral e a tegumentar (cutânea e mucosa), sendo a leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada pelo *Leishmania amazonensis* (La), uma das formas mais graves. Os tratamentos disponíveis apresentam efeitos adversos graves e favorecem o surgimento de cepas resistentes, evidenciando a necessidade de novas alternativas terapêuticas. **Objetivos:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar *in silico* com posterior avaliação *n vitro* compostos catecólicos contra a *Leishmania amazonensis*. **Materiais e Métodos:** A estrutura tridimensional da Tripanotiona Redutase de *Leishmania amazonensis* (LaTR) foi determinada por Modelagem Comparativa. As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos catecóis foram avaliados previamente a sua Triagem Virtual por Acoplamento Molecular (VS). Em seguida, estudos de Dinâmica Molecular foram realizados nos melhores complexos selecionados pela VS. Por fim, foi realizada a avaliação da citotoxicidade destes catecóis frente a macrófagos e sua atividade frente as formas promastigotas de La pelo método do AlamarBlue. **Resultados e Discussão:** Nesse trabalho foram empregados métodos *in silico* que selecionaram um composto não citotóxico e altamente promissor contra *Leishmania sp.*: a rutina. **Considerações Finais:** Nossos resultados apontam que a rutina não é tóxica às células humanas é ativa contra as espécies causadoras da forma visceral e inativa frente as espécies causadoras da forma tegumentar.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, Tripanotiona Redutase, Modelagem Comparativa, Triagem Virtual, Atividade antileishmania.

ABSTRACT

SANTIAGO, A. S. *In silico* AND *in vitro* EVALUATION OF CATECHOLIC COMPOUNDS AGAINST *Leishmania amazonensis* (dissertation). Salvador: Department of Life Sciences (DCV), State University of Bahia, 2022; 87p.

Introduction: Leishmaniasis represents many diseases caused by protozoa in the *Leishmania* genus. *Leishmania amazonensis* (La) causes clinical manifestations like visceral and tegumentary leishmaniasis (cutaneous and mucosal) with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in its most severe form. Available treatments have serious adverse effects and favor the resistant strains development which highlights the need of new therapeutic alternatives. **Objectives:** The present work aims to evaluate *in silico* and *in vitro* approaches of catechol compounds against *Leishmania amazonensis*. **Materials and Methods:** The three-dimensional structure of *Leishmania amazonensis* Trypanothione Reductase (LaTR) was determined by Comparative Modeling. The catechol's pharmacokinetic and toxicological properties were evaluated prior to their Virtual Screening (VS). Then, Molecular Dynamics studies were performed on the best complexes selected by VS. Finally, the catechol's cytotoxicity evaluation against macrophages and their activity against the *La* promastigotes forms were done by the AlamarBlue assay. **Results and Discussion:** *In silico* results selected a non-cytotoxic and highly promising compound against *Leishmania sp.*: rutin. **Concluding Remarks:** Our *in vitro* results indicate that rutin is not toxic to human cells, it is active against the species that cause the visceral form and inactive against the species that cause the tegumentary form.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, Trypanothione Reductase, Comparative Modeling, Virtual screening, Antileishmanial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O ciclo de vida do parasito <i>L. amazonensis</i>	22
Figura 2 - Reação de redução catalisada pela Tripanotiona Redutase (TR) em tripanossomatídeos.....	30
Figura 3 - Avaliação da seletividade e especificidade do Autodock 4.2 (MORRIS, <i>et al.</i> , 2009) para os inibidores competitivos da LaTR (n= 27) em detrimento aos decoys gerados pelo DUD-E (http://dude.docking.org/ , MYSINGER <i>et al.</i> , 2012).....	48
Figura 4 – Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos da proteína, exceto hidrogênio, durante DM de 200ns na LaTR empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, <i>et al.</i> , 2005). A área destacada em vermelho refere-se a fase produtiva utilizada para a aquisição de dados.....	52
Figura 5 - Resultante do raio de giro durante a fase produtiva (60ns) dos complexos da LaTR (“branco”, holo e rutina) empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, <i>et al.</i> , 2005).....	53
Figura 6 – Análise da estrutura secundária dos complexos da LaTR durante a fase produtiva (60ns) empregando o DSSP (ZACHARIAS; KNAPP, 2014) embutido no GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, <i>et al.</i> , 2005). Da esquerda para a direita, temos: “branco”, holo e rutina.....	54
Figura 7 - Dados do fator-B de temperatura calculados durante a DM a partir do RMSF complexo LaTR-rutina durante a fase produtiva (60ns) empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, <i>et al.</i> , 2005). . As regiões de menor fator-B/flutuação possuem coloração azul e regiões de maior movimentação, vermelha. A figura foi gerada pelo programa Pymol 2.2.2 (DELANO, 2002)	55
Figura 8- Dados do fator-B de temperatura calculados durante a DM a partir do RMSF complexo LaTR-rutina durante a fase produtiva (60ns) empregando o	

GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005). . n os principais subsítios da TR. Em (a) os resíduos estão representados em bastões (magenta) e a proteína (*cartoon* colorido pelo fator-B de temperatura- idem fig. 7. Em (b) a estrutura da LaTR está representada em *cartoon* (cinza escuro) e os resíduos de interesse estão destacados: o sítio γ -glutâmico (verde), o sítio Z (amarelo), o sítio Y (laranja), a sítio hidrofóbico (roxo). A figura foi gerada pelo programa Pymol 2.2.2 (DELANO, 2002).....56

Figura9 - Número de interações por ligação hidrogênio durante a fase produtiva da DM ($\Delta t= 60$ ns) nos complexos LaTR holo e rutina. Esta análise empregou o módulo *H-bond* (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2006) no GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005).....58

Figura 10 - Número de interações por ligação hidrogênio durante a fase produtiva da DM ($\Delta t= 60$ ns) nos complexos LaTR holo e rutina. Esta análise empregou o módulo *H-bond* (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2006) no GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005).....59

Figura 11 - Número de interações por ligação hidrogênio durante a fase produtiva da DM ($\Delta t= 60$ ns) nos complexos LaTR holo e rutina. Esta análise empregou o módulo *H-bond* (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2006) no GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises comparativa dos modelos 10 melhores modelos da LaTR gerados pelo Modeller9.4 (ESWAR, <i>et al.</i> , 2007) frente ao molde (código PDB: 4ADW, BAIOTTO <i>et al.</i> , 2013): PROCHECK (LASKOWSKI, 1993), Verify3D (EISENBERG, <i>et al.</i> , 1997), ERRAT v.2.0 (COLOVOS; YEATES, 1993), ProSAIL (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e QMEAN4 (BENKERT <i>et al.</i> , 2011).	46
Tabela 2 - Resultados da Triagem Virtual (VS) empregando os catecóis frente a LaTR.	48
Tabela 3 - Citotoxicidade e atividade anti- <i>L. amazonensis</i> da rotina.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção
AmpB	Anfotericina B (do inglês, <i>Amphotericin B</i>)
ATB	Construtor Automático de Topologias (do inglês, <i>Automated Topology Builder</i>)
BEI	Índice de eficiência de ligação (do inglês, <i>Bind Efficiency Index</i>)
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
DCs	Células dendríticas
DCV	Departamento de Ciências da Vida
DM	Dinâmica Molecular
DNDi	Iniciativa de medicamentos para Doenças Negligenciadas (do inglês, <i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>)
DOPE	do inglês, <i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
DSSP	Dicionário de Estrutura Secundária de Proteínas (do inglês, <i>Dictionary of Secondary Structure of Proteins</i>)
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona
GR	Glutathiona redutase
GROMOS	do inglês, <i>GRoningen Molecular Simulation</i>
GSSG	Glutathiona oxidada

HTS	Triagem em larga escala
ICS-UFBA	Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
ITT	Intenção de tratar
La	<i>Leishmania amazonensis</i>
LaBiMM	Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular
LaTR	Tripanotiona Redutase de <i>Leishmania amazonensis</i>
LBVS	Triagem Virtual Baseada na Estrutura do Ligante (do inglês, <i>Ligand-Based Virtual Screening</i>)
LiTR	Tripanotiona Redutase de <i>Leishmania infantum</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose disseminada
LE	Eficiência do ligante (do inglês, <i>Ligand Efficiency</i>)
LLE	Eficiência lipofílica do ligante (do inglês, <i>Lipophilic Ligand Efficiency</i>)
LELP	Índice de lipofilicidade dependente da eficiência do ligante (do inglês, <i>ligand efficiency-dependent lipophilicity index</i>)
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO	Óxido Nítrico
PAINS	Falsos positivos (do inglês, <i>Pan Assay INterference compoundS</i>)
PDB	do inglês, <i>Protein Data Bank</i>
PME	do inglês, <i>particle-mesh Ewald</i>
PPGFARMA	Programa de Pós-graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências Farmacêuticas
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa (do inglês, <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
RMSF	Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Médio (do inglês, <i>Root-Mean-Square Fluctuation</i>)
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (do inglês, <i>Root Mean Square Deviation</i>)
SB^{III}	Antimônio trivalente
SB^V	Antimônio pentavalente
SBDD	do inglês, <i>Structure-based Drug Design</i>
SBVS	do inglês, <i>Structure-based Virtual Screening</i>
SILE	Eficiência Do Ligante Independente Do Tamanho (do inglês, <i>Size Independent Ligand Efficiency</i>)
TR	Tripanotiona Redutase
TS₂	Dissulfeto de tripanotiona
T(SH)₂	N1,N8-bis(glutationil)espermidina
VS	Triagem Virtual (do inglês, <i>Virtual Screening</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas	17
3.2 A leishmaniose	17
3.3 O ciclo de vida do parasito <i>L. amazonensis</i> (La).....	18
3.4 A terapia atual para as leishmanioses.....	19
3.4.1 Os Antimoniais pentavalentes	20
3.4.2 Anfotericina B	21
3.4.3 Miltefosina	22
3.4.4 Paromomicina	22
3.4.5 Pentamidina	23
3.5 Novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses.....	24
3.6 Outros alvos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose	25
3.7 Métodos computacionais aplicados ao desenvolvimento de fármacos.....	27
3.8 Modelagem Comparativa	29
3.9 Triagem Virtual por Acoplamento Molecular	31
3.10 Dinâmica Molecular (DM).....	32

4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Modelagem Comparativa da Tripanotona Redutase de <i>L. amazonensis</i> (LaTR)	34
4.2 Preparo das estruturas para o acoplamento molecular.....	34
4.3 Autogrid e Autodock do ligante cristalográfico	35
4.4 Seleção das moléculas e cálculo das propriedades farmacocinéticas e físico-químicas	35
4.5 Dinâmica Molecular (DM).....	36
4.6 Avaliação da citotoxicidade	36
4.7 Ensaio de viabilidade celular	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Modelagem comparativa da Tripanotona Redutase de <i>L. amazonensis</i> (LaTR)	38
5.1.1 Seleção do molde.....	38
5.1.2 Alinhamento	39
5.1.3 Construção e validação do modelo	39
5.2 Acoplamento molecular.....	43
5.2.1 Definição das estruturas dos ligantes e da proteína.....	43
5.2.2 Definição do <i>grid</i>	43
5.2.3 Avaliação do programa de acoplamento para a Triagem Virtual.....	43
5.2.4 Avaliação do acoplamento para a Triagem Virtual	44
5.2.5 Análises da Triagem Virtual por Acoplamento Molecular (VS) na quimioteca de catecóis	45

5.2.6 Análises de eficiência dos catecóis via Triagem Virtual por Acoplamento Molecular (VS).....	45
5.3 Dinâmica Molecular dos complexos da LaTR.....	47
5.4 Escolha do composto para testes <i>in vitro</i>	57
5.5 Citotoxicidade e atividade frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>.....	58
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS E APÊNDICES	80

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* cujo ciclo de vida pode se iniciar quando as formas promastigotas metacíclicas (infectantes) são transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do mosquito flebótomo fêmea. Uma vez fagocitadas, estas se diferenciam em amastigotas, a forma replicativa que estabelece a infecção (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020; KAYE, *et al.*, 2011; VASCONCELOS, *et al.*, 2018). De acordo com a espécie do parasito envolvido na infecção e com o perfil genético e imunológico do hospedeiro (FERREIRA, *et al.*, 2021; SILVEIRA, *et al.*, 2004), as leishmanioses podem se manifestar nas principais formas: a leishmaniose visceral (ou calazar), que afeta órgãos internos e a tegumentar (cutânea e mucosa), que pode causar deformações irreversíveis e desfiguração na pele e mucosas do paciente (VASCONCELOS, *et al.*, 2018; GALLUZZI, *et al.*, 2018).

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de transmissão vetorial considerada um problema de saúde pública no Brasil em virtude da sua magnitude, letalidade e expansão geográfica (REIS, *et al.*, 2014). Esta pode evoluir para a forma crônica cuja letalidade em humanos pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (GONJITO; MELO, 2004). A leishmaniose tegumentar (LT) pode ser classificada em cutânea localizada, mucocutânea, cutânea disseminada e cutânea difusa (SANTANA, *et al.*, 2021; BERNARDES FILHO, *et al.*, 2018; SILVEIRA, *et al.*, 2009). No Brasil, uma das formas mais graves da leishmaniose tegumentar é a cutânea difusa, causada pela *Leishmania amazonensis* (La) que, devido a imunossupressão celular específica induzida pelo parasito, apresenta caráter evolutivo crônico e tratamento dificultado (KASSARDJIAN, *et al.*, 2021; SAMPAIO, *et al.*, 2021; SILVEIRA, 2009). Por este motivo, a espécie *L. amazonensis* foi utilizada neste trabalho.

Atualmente, a terapêutica contra a leishmaniose se baseia na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes; a anfotericina B e a sua formulação lipossômica; a miltefosina; a paromomicina e a pentamidina. Estes apresentam toxicidade, uma necessidade de administração prolongada e a seleção de cepas resistentes por parte do parasito (TIWARI, *et al.*, 2018; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Além disso, os antimoniais pentavalentes (Glucantime®) e a anfotericina B são injetáveis, o que tornam a sua administração mais difícil.

Diante do exposto evidencia-se a necessidade de novos fármacos para o tratamento dessa enfermidade (PRADHAN, *et al.*, 2022; OLIVEIRA, *et al.*, 2013; TAKARADA, 2018; AKBARI, *et al.*, 2021). Neste contexto, é importante que alvos distintos do hospedeiro sejam selecionados favorecendo a seletividade de possíveis compostos moduladores (ALTAMURA, *et al.*, 2022; SANTANA, *et al.*, 2021; MELOS; ECHEVARRIA, 2012). Para se conseguir tal objetivo, pode-se explorar uma via bioquímica essencial ao parasito. Das diversas enzimas deste protozoário, a Tripanotiona Redutase (TR) tem recebido grande destaque pois está relacionada com o mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo e a regulação dos níveis celulares de tiol (BATTISTA, *et al.*, 2020; ANDREA, *et al.*, 2017; KRAUTH-SIEGEL; SCHIRMER, 2005), dentre outras funções (FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

Durante as fases iniciais de descoberta de novos fármacos a Triagem Virtual (VS) por Acoplamento Molecular pode ser utilizada para selecionar compostos de interesses a partir de uma base de dados. Por se tratar de uma estratégia de desenvolvimento de fármacos baseadas na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *Structure-based Drug Design*), o VS se fundamenta no conhecimento topológico do alvo biológico (proteína em estudo) obtido no Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) (BURLEY, *et al.*, 2021).

Uma problemática comum em projetos de SBDD é a ausência de estruturas proteicas disponíveis nos bancos de dados. Diante disso, é necessário o emprego de métodos que construam o modelo 3D do alvo terapêutico. Dessa forma, empregamos a Modelagem Comparativa para a definição estrutural da enzima Tripanotiona Redutase de *L. amazonensis* (LaTR). De posse do modelo da LaTR, empregou-se a Triagem Virtual por Acoplamento Molecular visando a busca de compostos que interajam com esta enzima. A partir desta triagem, um composto promissor foi selecionado e estudado por Dinâmica Molecular (DM) para análise de seu comportamento frente a LaTR. A partir dos melhores resultados *in silico*, os métodos *in vitro* foram empregados para a avaliação da citotoxicidade e atividade dos compostos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar compostos da classe dos catecóis que interajam com a Tripanotiona Redutase de *Leishmania amazonensis* (LaTR) *in silico* e avaliar sua atividade antileishmania *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir a estrutura 3D da Tripanotiona Redutase de *Leishmania amazonensis* e avaliar seus melhores modelos.
- Analisar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas de uma base de dados (quimioteca) de compostos de baixo peso molecular (ligantes) visando seu emprego frente a Tripanotiona Redutase de *Leishmania amazonensis*.
- Analisar o modo de interação dos ligantes frente a Tripanotiona Redutase de *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a atividade citotóxica e antileishmania *in vitro* do melhor composto selecionado pelos ensaios *in silico*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) constituem um amplo grupo de doenças transmissíveis que foram eliminadas das sociedades mais desenvolvidas. Contudo, elas proliferam em climas tropicais e subtropicais prevalecendo quando os serviços de saúde e saneamento são inadequados e onde há o contato constante com os vetores (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2020). Muitas delas são antigas e assolam a humanidade há séculos (ANDRADE, 2015) e embora atinjam mundialmente cerca de um bilhão de pessoas, as DTN não recebem a devida atenção midiática e/ou de recursos para pesquisa por se concentrarem em favelas urbanas ou em áreas rurais remotas (OMS, 2017). Na América Latina, o Brasil se destaca pela prevalência de uma série de DTN como a leishmaniose, esquistossomose, outras helmintoses e a doença de Chagas (MARTINS-MELO, 2016).

3.2 A leishmaniose

A Organização Pan-americana de Saúde informa que entre 2001-2020 foram registrados no continente americano 67.922 novos casos de leishmaniose visceral e 1.067.759 casos de leishmaniose tegumentar (cutânea e mucosa) (OPAS, 2021). Em 2020, os países com maior número de casos notificados de leishmaniose cutânea e mucosa foram: Brasil (16.432), Colômbia (6.161), Peru (4.178), Nicarágua (3.443) e Bolívia (2.059), que juntos representaram 81% dos casos da região, sendo que o total de casos do Brasil equivale a soma do total de casos dos outros 4 países (OPAS, 2021).

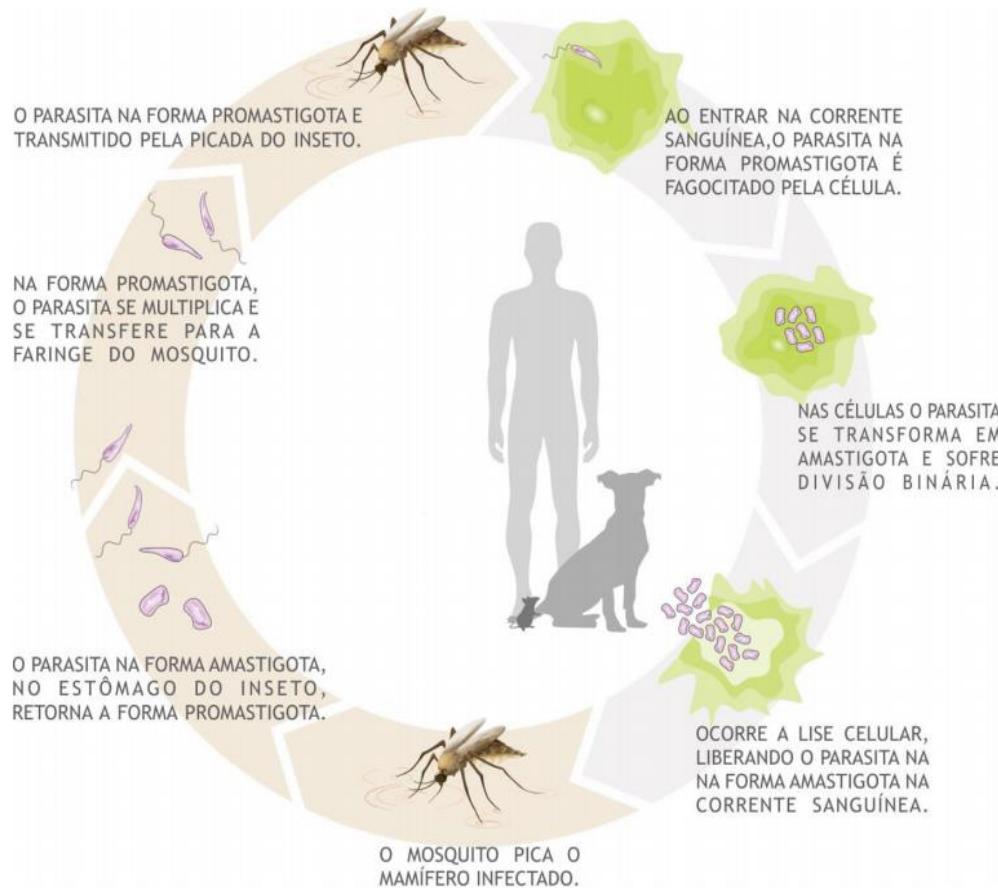
Dados da Secretaria de Saúde do estado da Bahia informam que a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) possui focos em 25 das 29 Regiões de Saúde (86,2%) (SESAB, 2020). Em 2021, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro, foram registrados 1.370 novos casos confirmados de LT, dispersos em 161 municípios (161/417; 38,6%), o que corresponde a um coeficiente de incidência de 9,2 casos por 100 mil habitantes, um incremento de 13,6% no número de casos confirmados quando comparado ao mesmo período de 2020 (SESAB, 2021).

No Brasil, existem diversas espécies de leishmania envolvidas na LTA: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, sendo essas 4 últimas preferencialmente encontradas nos estados do Pará e/ou Amazonas (SILVEIRA, *et al.*, 2004; CAMARGO; BARCINSKI, 2003). A LTA pode se apresentar nas seguintes formas clínicas: cutânea (LC) caracterizada por uma pápula eritematosa que pode evoluir para uma úlcera, geralmente indolor e que aparece no local da picada do vetor; disseminada (LD), que é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme acometendo vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco; mucosa (LM), que acomete principalmente a orofaringe, podendo causar comprometimento do septo cartilaginoso e demais áreas associadas; cutânea difusa (LCD), a qual se inicia de forma insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento. Esta forma tem como característica a evolução lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (LIMA, 2017).

3.3 O ciclo de vida do parasito *L. amazonensis* (La)

O ciclo de vida de *La* se inicia quando as formas promastigotas metacíclicas, a forma flagelada do parasito, são inoculadas durante repasto sanguíneo do inseto hematófago flebótomo fêmea da ordem *Diptera*- o *Lutzomyia longipalpis*, em hospedeiros vertebrados (SALOMON, 2020; REIS, *et al.*, 2014). Uma vez na pele, os parasitos são fagocitados por diferentes tipos de células, incluindo monócitos inflamatórios e células dendríticas (DCs) que são recrutadas para o local da infecção (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Em seguida, elas são fagocitadas e se multiplicam, por divisão binária, nos fagolisossomos de macrófagos localizados na pele ou em mucosas. Ali se diferenciam em amastigotas, forma replicativa que estabelece a infecção. Caso as condições sejam apropriadas para a sua sobrevivência, esses proliferam até causar lise celular. Quando liberados na circulação sanguínea, as formas amastigotas podem infectar outros macrófagos ou outro inseto (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida do parasito *L. amazonensis*.



Fonte: BLANCO; NASCIMENTO-JUNIOR, 2017.

As formas amastigotas no trato gastrointestinal do inseto vetor se diferenciam em promastigotas procíclicas. Em seguida, estas formas sofrem processo de metaciclogênese e se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) (KAYE, *et al.*, 2011; COBO, 2014; YOUNG; KIMA, 2019), reiniciando o ciclo.

3.4 A terapia atual para as leishmanioses

A terapia medicamentosa para todas as formas de leishmanioses visa a garantia da adesão ao tratamento, o alívio dos sintomas e do desconforto causado pela doença, o controle e/ou a minimização da ocorrência de efeitos adversos (BRASIL, 2018). Seu protocolo terapêutico varia de acordo com a forma clínica. Para

o tratamento sistêmico da forma cutânea recomenda-se como primeira escolha o antimoniato de meglumina, Glucantime® (intravenoso ou intramuscular) com dose entre 10 mg e 20 mg $\text{Sb}^{+5}/\text{kg}/\text{dia}$, sugerindo-se 15 mg $\text{Sb}^{+5}/\text{kg}/\text{dia}$ durante 20 dias seguidos onde podem se manifestar os efeitos adversos: dor no local da injeção e cardiotoxicidade (FRÉZARD, 2009). Caso não haja cicatrização completa em até 12 semanas após o término do tratamento, o paciente deverá ser reavaliado (BRASIL, 2017). Nestes recomenda-se a realização de exames clínicos antes e depois do tratamento como controle dos efeitos adversos e acompanhamento regular do paciente (SUV/DIVE/GEZOO-SC, 2018).

3.4.1 Os Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais trivalentes (Sb^{III}) já eram usados no Brasil em 1912 como o primeiro tratamento eficaz para leishmaniose (VIANNA, 1912; HENDRICKX, *et al.*, 2019), sendo posteriormente substituídos pelos pentavalentes (Sb^{V}) na tentativa de reduzir seus efeitos secundários graves. Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose (KATO, *et al.*, 2014), os quais são administrados por via intramuscular (IM) ou intravenoso (IV) (KIP, *et al.*, 2018). O antimônio pentavalente (Sb^{V}) é considerado um pró-fármaco, que é convertido na forma ativa trivalente (Sb^{III}) sob condições de pH baixo nos fagócitos hospedeiros (SINGH, *et al.*, 2012). Este mecanismo de ação dentro do organismo gera toxicidade tanto contra o hospedeiro quanto o parasito (KATO, *et al.*, 2014). Atualmente dois complexos de antimoniais pentavalentes estão disponíveis comercialmente: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (TIWARI, *et al.*, 2018). No Brasil, o fármaco de escolha é o Glucantime® (SERENO, *et al.*, 2000).

O Sb^{III} induz a apoptose nos parasitos através da inibição da TR (TIWARI, *et al.*, 2018). A TR é uma enzima essencial e exclusiva dos parasitos da família *Trypanosomatidae* (BEIG, *et al.*, 2015), agindo como um antioxidante parasitário de defesa ao estresse oxidativo do hospedeiro (DUKHYL, 2019).

O Sb^{V} também apresenta atividade antiparasitária através da inibição da topoisomerase (NO, 2016). As topoisomerasas são um grupo de enzimas responsáveis por controlar a síntese de DNA durante os processos de replicação, transcrição e condensação da cromatina, estando envolvidas em diversos processos

celulares incluindo o ciclo celular, a proliferação e a diferenciação celular (SUN, *et al.*, 2020). Na leishmaniasis, a enzima se encontra presente no núcleo e na única mitocôndria existente.

O uso dos antimoniais pode ocasionar dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade. Além disso é necessária a internação hospitalar para a sua aplicação por via IM ou IV (HENDRICKX, *et al.*, 2019).

3.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B (AmpB) é um metabólito antifúngico de polieno, pouco solúvel em água e com alta afinidade por membranas contendo esterol. O ergosterol é o principal esteroide presente nas membranas plasmáticas dos parasitos do gênero *Leishmania* e a anfotericina interage com ele, causando: alteração da permeabilidade da membrana com extravasamento de líquidos; formação de poros aquosos; desequilíbrio iônico e morte do parasito (SAMPAIO, 2003; KIP, *et al.*, 2018; TIWARI, *et al.*, 2018).

A AmpB possui baixa biodisponibilidade oral devido ao seu elevado peso molecular e a presença de muitos grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (BARRATT; BRETAGNE, 2007; FANGUEIRO, *et al.*, 2012), sendo obrigatoriamente administrada por via intravenosa (IV), demandando hospitalização do paciente, o que limita seu uso em países pobres e em desenvolvimento (CROFT; COOMBS, 2003; BASTOS, *et al.*, 2016), o que resulta em menor adesão do paciente ao tratamento (HENDRICKX, *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que a AmpB também tem a capacidade de se ligar ao colesterol das membranas humanas, mecanismo responsável pela fração de seus efeitos tóxicos (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Os outros efeitos são: febre alta, calafrios e insuficiência renal (FREITAS-JUNIOR, 2012), além de hipocalcemia e nefrotoxicidade com limitação de dose, o que dificulta seu uso na clínica (KIP, *et al.*, 2018). A nefrotoxicidade é descrita como o principal efeito adverso associado ao uso da AmpB (HENDRICKX, *et al.*, 2019).

Seus efeitos adversos foram minimizados pela formulação lipossomal (AmBisome®), eficaz na cura de todas as formas de infecções por leishmaniasis (KIP, *et al.*, 2018; TIWARI, *et al.*, 2018). Essa formulação consiste em incorporar a AmpB

numa bicamada de lipídeos, o que resulta numa redução significativa da toxicidade renal relacionada à infusão. Algumas reações leves (nefrotoxicidade transitória e trombocitopenia) podem ser observadas após o seu uso. Um grande inconveniente dessa formulação é seu alto custo, o que impossibilita seu uso por populações de baixa renda, justamente os mais afetados por essas doenças (NAGLE, 2014).

3.4.3 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), um análogo alquilfosfocolina, originalmente desenvolvido como agente antitumoral, atualmente é o único fármaco de uso oral disponível para o tratamento da leishmaniose (TIWARI, *et al.*, 2018). A sua atividade antitumoral tem como alvo as vias de sinalização do fosoinositol 3-cinase-Akt/PKB para inibir o crescimento metastático das células. Em relação a sua atividade antiparasitária, nenhum modo de ação foi ainda elucidado, porém surgiram várias hipóteses como a indução de apoptose, distúrbio das vias de sinalização celular dependente de lipídios, alteração da composição da membrana e efeitos imunomoduladores (DORLO, *et al.*, 2012; PARIS, *et al.*, 2014). Além disso, a miltefosina tem a capacidade de despolarizar o potencial da membrana mitocondrial e inibir a citocromo-c oxidase, o que pode estar relacionado a morte dos parasitos por apoptose (MARINHO, *et al.*, 2011).

A miltefosina também produz efeitos colaterais graves (SINGH, *et al.*, 2014): nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade gastrointestinal grave dificultando seu emprego em mulheres grávidas e crianças (DORLO, *et al.*, 2012; HENDRICKX, *et al.*, 2019). Aliado aos efeitos adversos, sua aplicação está comprometida devido ao crescente aumento das taxas de falha terapêutica e ao lento surgimento de resistência do parasito ao fármaco (COJEAN, *et al.*, 2012; RIJAL, *et al.*, 2013; HENDRICKX, *et al.*, 2019).

3.4.4 Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico que possui atividade antileishmania e antibacteriana. No entanto, este fármaco não é uma boa opção para o tratamento de pacientes com leishmaniose por conta de sua baixa absorção, parcialmente resolvido pela administração intramuscular, porém essa forma de

administração limita o seu uso no Brasil. (TIWARI, *et al.*, 2018; HENDRICKX, *et al.*, 2019). Estudos informam que o mecanismo de ação da paromomicina envolve a inibição da síntese de proteínas do protozoário ligando-se a subunidade ribossômica 30S, resultando no acúmulo de complexos ribossômicos anormais 30S-50S e, finalmente, causando a morte celular (KIP, *et al.*, 2018). Outros estudos relacionam a inibição da síntese de proteínas e a alteração no potencial da membrana mitocondrial com a morte parasitária (CHAWLA, *et al.*, 2011).

A paromomicina apresenta como efeitos adversos mais comuns a nefrotoxicidade, a ototoxicidade e a hepatotoxicidade (HENDRICKX, *et al.*, 2019).

3.4.5 Pentamidina

A pentamidina é um derivado sintético da amidina usado como terapia de segunda linha contra a leishmaniose, uso este limitado devido à baixa eficácia e a sua administração por via IM ou, preferencialmente, por administração IV (KIP, *et al.*, 2018; HENDRICKX, *et al.*, 2019). O mecanismo de ação da pentamidina não é claro, mas a mitocôndria foi considerada um importante alvo (COELHO, *et al.*, 2007). Sugere-se que o composto penetra nos parasitos através de transportadores de arginina e poliamina e inibe a topoisomerase mitocondrial II (SINGH, *et al.*, 2016). Estudos bioquímicos indicaram que clones de promastigotas de *L. donovani* e *La* apresentaram resistência devido a diminuição da captação seguido pelo aumento do seu efluxo (SINGH, *et al.*, 2012). Seus efeitos adversos incluem a indução de diabetes mellitus insulino dependente, hipotensão, efeitos gastrointestinais, hipoglicemia grave, choque, miocardite, cardiotoxicidade e toxicidade renal (KIP, *et al.*, 2018; HENDRICKX, *et al.*, 2019).

Assim é possível notar que as principais opções para o tratamento das leishmanioses apresentam efeitos adversos graves, são insatisfatórios em termos de eficácia, custo, facilidade de administração e/ou segurança (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; MURRAY, 2010; HENDRICKX, *et al.*, 2019). E, por serem utilizadas há tantos anos, têm favorecido o surgimento de parasitos mais resistentes (SOARES-BEZERRA, *et al.*, 2004).

3.5 Novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses

O tratamento farmacológico em monoterapia levou ao surgimento de cepas resistentes de *Leishmania sp.* Dessa forma, as combinações medicamentosas mostraram-se boas alternativas e têm apresentado diversas vantagens em relação à monoterapia, incluindo a minimização dos efeitos tóxicos através da redução do tempo de tratamento; maior adesão ao tratamento; redução dos custos diretos e indiretos para o sistema de saúde e a atenuação do desenvolvimento de resistência por parte do parasito (ALVAR, *et al.*, 2006; BASTOS, *et al.*, 2016). Dentre as combinações terapêuticas temos: estibogluconato de sódio e paromomicina; antimoniato de meglumina e paromomicina; anfotericina B e miltefosina; anfotericina B e paromomicina e miltefosina e paromomicina (ALVAR, *et al.*, 2006; SUNDAR; OLLIARO, 2007; BASTOS, *et al.*, 2016).

A terapia fotodinâmica surgiu como alternativa ao permitir o tratamento tópico da leishmaniose cutânea com menos efeitos colaterais (PINTO, *et al.*, 2016). O emprego dos ésteres metílico e butírico do fotossensibilizador Rosa Bengala mostraram-se eficazes contra *La* no tratamento da LT (NAVASCONI, *et al.*, 2017). Em 2018, um estudo utilizando laser de dióxido de carbono fraccionado seguido de aplicação tópica de estibogluconato de sódio demonstrou segurança para o tratamento da infecção por leishmaniose cutânea em crianças (HILEROWICZ, *et al.*, 2018).

Em 2019 a Iniciativa de medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) finalizou um ensaio de fase II iniciando a fase III, combinando termoterapia e miltefosina para o tratamento da LC não complicada no Peru e na Colômbia. Os resultados preliminares na análise por intenção de tratar (ITT) mostraram evidências a favor da combinação (BONI, 2019). Outros exemplos de terapias são a crioterapia e a eletroterapia (ZULFIQAR, *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, no Brasil, foram licenciadas duas vacinas para administração em cães (MARTIN, *et al.*, 2014; REGUERA, *et al.*, 2016; BEUGNET, *et al.*, 2018; COTRINA, *et al.*, 2018) mas não há opção para humanos. Tal fato torna o tratamento farmacológico a única opção já que o controle do vetor não tem se mostrado uma medida efetiva de prevenção (LUNA; CAMPOS, 2020; BASTOS, *et al.*, 2006).

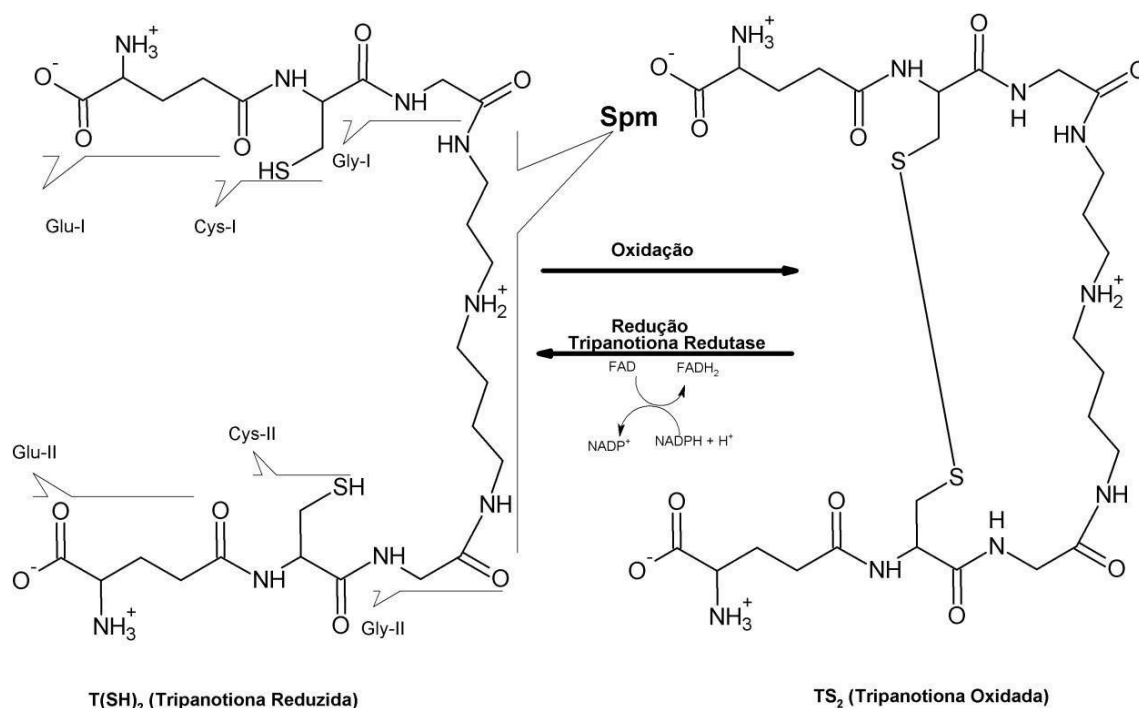
3.6 Outros alvos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose

O planejamento eficaz de compostos com atividade antiparasitária para o tratamento das DTN, deve considerar a seleção de vias metabólicas específicas e essenciais ao parasito. Diversos alvos potenciais vêm sendo discutidos na literatura e há certo consenso em relação a algumas enzimas, como as envolvidas na síntese de DNA, na via glicolítica, na proteção contra o estresse oxidativo, dentre outras (FIGUEIREDO, *et al.*, 2018).

Quase todos os organismos vivos expressam níveis citosólicos de glutathione (GSH) para manutenção da homeostase dos níveis de tiol (BERNDT; LILLIG, 2017). O GSH é responsável por um dos mecanismos de redução-oxidação (redox) no qual espécies reativas e componentes celulares oxidados incorretamente podem ser reduzidos. Neste processo a glutathione é oxidada (GSSG) podendo ser regenerada pela glutathione redutase (GR) numa reação dependente de NADPH (BOCEDI, *et al.*, 2010). Essas reações enfatizam a importância desse sistema para a remoção de peróxidos tóxicos as células.

A Tripanotona Redutase (TR)- um ditiol sintetizado a partir da conjugação de duas moléculas de glutathione e uma de espermidina (FAIRLAMB *et al.*, 2005; FONSECA, 2017), é uma molécula responsável pelo metabolismo do tiol nos protozoários e essencial para sua viabilidade, conforme estudos de Biologia Molecular e Genética (TOVAR, *et al.*, 1998), inclusive no gênero *Leishmania* (BEIG *et al.*, 2015). A TR é um alvo terapêutico validado (PITA; PASCUTTI, 2011) e devido à ausência no hospedeiro humano tem sido empregada no desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas. Ela é uma flavoenzima dependente de NADPH capaz de catalisar a redução do dissulfeto de tripanotona (TS₂) em diidrotripanotona (N1,N8-bis(glutathionil) espermidina, T(SH)₂) (Figura 2) (BATTISTA, *et al.*, 2020; ANDREA, *et al.*, 2017; FLOHÉ, 2011; KRAUTH-SIEGEL; SCHIRMER, 2005). Deste modo a tripanotona é mantida reduzida (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008) condição essencial para o ambiente redutor nestes parasitos protegendo-os contra o estresse oxidativo (PITA; PASCUTTI, 2011).

Figura 2 - Reação de redução catalisada pela Tripanotona Redutase (TR) em tripanossomatídeos.



Fonte: Reproduzido com permissão dos autores (PITA; PASCUTTI, 2011).

A TR é homodimérica, constituída por 966 aminoácidos (BAIOCCO *et al.*, 2009) onde cada monômero é composto por três domínios: i) domínio de ligação ao FAD (resíduos 1-160 e 289-360); ii) domínio de ligação ao NADPH (resíduos 161-289); iii) domínio de interface (resíduos 361-488). O sítio de ligação à tripanotona é amplo e sua maior área é coberta por resíduos não-polares (BAIOCCO *et al.*, 2009).

A TR e a GR diferem em tamanho, carga, distribuição dos sítios hidrofílicos/hidrofóbicos, além das hélices nos domínios de ligação ao FAD na TR e da GR (HUNTER, *et al.*, 1992; ZHANG, *et al.*, 1996; TIWARI, *et al.*, 2018). Tais diferenças conferem ao sítio ativo da TR, em comparação com o da GR, a capacidade de acomodar facilmente substratos com grupos mais volumosos (GIRAULT *et al.*, 2001; NUNES, 2011). A TR possui em seu sítio ativo resíduos carregados negativamente e regiões hidrofóbicas e a GR apresenta resíduos de arginina (carregados positivamente), ambas interagem de forma específica e eletrostática com seu substrato (BOND *et al.*, 1999; NUNES, 2011).

O GSSG possui um menor tamanho e carga -2 não permitindo que ele se encaixe de maneira ideal na TR. Em comparação, a TS₂ é uma molécula maior e possui uma carga líquida de +1 em pH fisiológico (TIWARI, *et al.*, 2018). Resíduos de aminoácidos como Glu18, Trp21, Ser109, Met113 e Ala343 no sítio ativo TR formam um sítio hidrofóbico importante para a ligação do substrato (TIWARI, *et al.*, 2018). Essa característica hidrofóbica acrescida de cargas negativas favorecem a atração da tripanotiona, carregada positivamente e mais hidrofóbica (LANTWIN, *et al.*, 1996; LIÑARES, *et al.*, 2006).

A TR tem sido considerada um alvo promissor desde a sua descoberta por ser essencial para a viabilidade nos parasitos (TOVAR, *et al.*, 1998) e *druggable* (BATTISTA, *et al* 2020). Além disso, a TR é validada como um alvo tanto para *Leishmania sp.* quanto em tripanossomatídeos em geral (TOVAR, *et al.*, 1998; KRIEGER, *et al.*, 2000).

Estudos demonstraram que os antimoniais- medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose- interferem no metabolismo da tripanotiona e inibem a TR (CUNNINGHAM; FAIRLAM, 1995; BAIOTTO, *et al.*, 2009), reforçando a importância dessa proteína como um alvo para o tratamento destas doenças. Além disso, a alta homologia entre as sequências de TRs de diferentes fontes (80-100%) a torna um alvo valioso para o desenvolvimento de um único fármaco de amplo espectro ativo contra todos os tripanossomatídeos (SOARES-BEZERRA, *et al.*, 2004).

Por fim, diversas classes de inibidores competitivos foram identificadas mas, até o presente momento, nenhuma delas avançou para os estudos clínicos. Algumas razões para isso são: potência abaixo do ideal, baixa seletividade (levando à toxicidade) e baixa biodisponibilidade ou biodistribuição (causando inatividade em modelos animais) (BATTISTA, *et al* 2020).

3.7 Métodos computacionais aplicados ao desenvolvimento de fármacos

A Química Medicinal é um ramo da ciência que versa sobre a descoberta e o desenvolvimento de fármacos (TRIGGLE; TAYLOR, 2006) e uma de suas vertentes são os métodos *in silico* (computacionais). A aplicação destes reduziu drasticamente o tempo e o custo da descoberta de fármacos beneficiando todo o processo (LIN, *et*

al., 2020). Suas vantagens em relação aos métodos experimentais envolvem a economia em termos de insumos, matérias-primas e reagentes, evitando assim gastos e a geração de compostos indesejados (SATYAJIT, *et al.*, 2020) e o fato de que os compostos estudados não precisam, necessariamente, existir fisicamente (PICCIRILLO; AMARAL, 2018).

Os métodos *in silico* possibilitam a identificação de distintas propriedades moleculares (*drug-like*)- capacidade de agregação, presença de falsos positivos (PAINS) e toxicidade (PAIXÃO; PITA, 2019)- e estruturais, a análise da similaridade 2D e a presença de grupos farmacofóricos (PICCIRILLO; AMARAL, 2018),. Ademais, os métodos *in silico* são muito úteis na impossibilidade de acesso a dependências físicas, possibilitando a realização de pesquisas científicas até mesmo no ambiente domiciliar do pesquisador especialmente em momentos de emergência sanitária.

Como exemplo de métodos computacionais para a identificação de novos candidatos a fármacos temos a Triagem Virtual por Acoplamento Molecular (VS) que surgiu como alternativa à triagem em larga escala (HTS). Nesse método, bibliotecas virtuais (quimiotecas) contendo diversos compostos (> 500) são avaliadas através de diferentes ferramentas, resultando num conjunto menor de compostos priorizados para os ensaios secundários. O VS também pode identificar subconjuntos de um banco de dados ou biblioteca de um tamanho mais gerenciável para um HTS experimental subsequente através da análise dos choques estéricos entre os compostos e o receptor e/ou avaliar as características eletrostáticas de ambos (KIRK, *et al.*, 2018).

Adicionalmente, as simulações biomoleculares com modelos multiescala permitem as investigações de características estruturais e termodinâmicas de proteínas-alvo em diferentes níveis (AYRTON, *et al.*, 2007), sendo muito úteis para elucidar os mecanismos de ação de fármacos. Além das simulações biomoleculares, podemos citar os métodos *de novo* de desenvolvimento de fármacos (SCHNEIDER; CLARK, 2019), que geram pequenas moléculas sintetizáveis com alta afinidade de ligação. A inteligência artificial, a exemplo do *machine learning* e do *deep learning*, vêm desempenhando papéis cada vez mais importantes nos métodos computacionais mencionados e, portanto, no estudo de compostos bioativos (LIN, *et al.*, 2020; POPOVA, *et al.*, 2018; BALLESTER, *et al.*, 2019; RYDZEWSKI; NOWAK, 2016).

3.8 Modelagem Comparativa

Na ausência de modelos experimentais, há a necessidade de se buscar alternativas para o emprego das técnicas de SBDD. Neste contexto, os primeiros métodos desenvolvidos para a predição da estrutura de proteínas eram organizados em 3 principais grupos: métodos de modelagem comparativa, de predição de enovelamento (ou *threading*) e predição por primeiros princípios (ou *ab initio*) (VERLI, 2014; MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019). Dentre estes, se destaca a Modelagem Comparativa, como a técnica que apresenta maior sucesso na obtenção de modelos a serem empregados na realização de triagens virtuais baseadas na estrutura do alvo biológico (CAPRILES, 2007; BHADRA; HELMS, 2021; PATEL; KUKOL, 2021).

A Modelagem Comparativa, ou por homologia, é uma técnica de predição da estrutura tridimensional de proteínas onde a estrutura da sequência alvo é construída empregando uma proteína resolvida experimentalmente cuja estrutura 3D é conhecida (estrutura molde). Esta metodologia é composta por quatro etapas principais: i) identificação da semelhança sequencial entre a proteína alvo e as estruturas molde; ii) alinhamento entre as sequências; iii) geração dos modelos e iv) avaliação da qualidade dos modelos (validação) (VERLI, 2014; BITAR, *et al.*, 2014; MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

Uma das principais preocupações na modelagem de uma nova estrutura de proteína é a identidade de sequência entre o molde (estrutura experimental) e a proteína a ser modelada (BITENCOURT-FERREIRA; AZEVEDO JR, 2019). Se estas sequências apresentarem alta identidade (> 30%), sua construção por homologia se torna mais simples, sendo normalmente realizada pelo alinhamento da sequência. A principal ferramenta computacional para o alinhamento de sequência é o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) que realiza a busca em bancos de dados de sequência para a obtenção dos melhores alinhamentos (MORGAT, 2019).

A construção por homologia pode ser realizada através de duas principais abordagens: a técnica de corpos rígidos e a construção por satisfação de restrições espaciais. Vários programas e/ou servidores são empregados nesta etapa dentre os quais destacam-se o SWISSMODEL (BIASINI, *et al.*, 2014) e o MODELLER (ESWAR, *et al.*, 2007). Na primeira técnica se constrói um modelo em etapas baseadas na conservação de estruturas entre proteínas homólogas ou com grau significativo de

identidade (regiões conservadas no alinhamento). Através da média das posições dos carbonos alfa das sequências de aminoácidos das regiões estruturalmente conservadas constrói-se a cadeia principal do modelo utilizando as mesmas coordenadas atômicas dos resíduos correspondentes no molde (VERLI, 2014; MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019). Para a definição das posições espaciais das regiões não conservadas, são realizadas curtas minimizações por mecânica molecular através de um campo de força e os hidrogênios são inseridos nas posições que garantam o maior número de interações do tipo ligação hidrogênio (BIASINI, *et al.*, 2014). Para as regiões variáveis (cadeias laterais), a cadeia principal dessas regiões pode ser obtida em bancos de dados estruturais (bibliotecas de confôrmeros com regiões similares à de outras proteínas), que apresentam conjuntos de alças classificados pelo número de aminoácidos e pelo tipo de estruturas secundárias que conectam (VERLI, 2014; MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

O MODELLER (ESWAR, *et al.*, 2007) emprega o segundo método, baseado na definição estatística de uma zona de restrições geométricas espaciais, que leva em conta várias características estruturais obtidas de bancos de dados contendo informações sobre os alinhamentos entre estruturas proteicas de alta resolução. Esta abordagem se inicia pelo alinhamento entre as sequências alvo e molde, extraíndo-se deste molde suas restrições espaciais (distâncias e ângulos) e transferindo-as para o modelo, limitando assim o número de possíveis conformações que o modelo pode assumir (VERLI, 2014; MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

No método de satisfação das restrições espaciais, as informações contidas no alinhamento de entrada são usadas para gerar uma série de restrições espaciais derivadas da homologia que auxiliarão na construção do modelo 3D da proteína. Os valores σ de restrições de distância derivadas da homologia determinam a quantidade de liberdade conformacional que o molde pode ter em relação aos seus modelos. Para isso, é utilizada uma estratégia estatística “baseada em histograma” para estimar valores σ (SALI; BLUNDELL, 1993; JANSON, *et al.*, 2019). Um algoritmo de otimização baseado numa combinação de gradiente conjugado e Dinâmica Molecular com *Simulated Annealing* é então usado para identificar uma conformação no modelo que satisfaça tanto quanto possível as restrições espaciais derivadas da homologia, mantendo sua estereoquímica (JANSON, *et al.*, 2019).

3.9 Triagem Virtual por Acoplamento Molecular

Os métodos *in silico* representam uma ferramenta útil para o planejamento de fármacos. A Triagem Virtual (VS) consiste em pré-selecionar compostos a partir de bancos de dados virtuais com o auxílio do computador (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Em geral, o VS se classifica em duas categorias: Triagem Virtual baseada na estrutura do ligante (LBVS) e na estrutura do receptor (SBVS). O LBVS usa os dados de estrutura-atividade de um conjunto de compostos ativos conhecidos para identificar compostos para uma avaliação experimental (LAVECHIA; DI GIOVANNI, 2013), onde se incluem os métodos de similaridade estrutural, estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR), dentre outros (GEPPERT, *et al.*, 2010; LAVECHIA; DI GIOVANNI, 2013; QINGLIANG; SHAH, 2017).

A abordagem baseada na estrutura do receptor (SBVS, do inglês *Structure-based Virtual Screening*) emprega o Acoplamento Molecular e favorece a seleção de compostos para posteriores testes bioquímicos e/ou biológicos (BALLANTE, *et al.*, 2020; MAIA, *et al.*, 2020; PICCIRILLO; AMARAL 2018). O Acoplamento Molecular (*Docking*), técnica central do SBVS, prevê o modo de ligação e os detalhes do reconhecimento molecular proteína-proteína e receptor-ligante (VERLI, 2014). Seus métodos são geralmente uma combinação de dois componentes complementares: um algoritmo de busca e uma função de pontuação (MONTANARI, 2011). O algoritmo de busca, a exemplo do algoritmo genético e o de Monte Carlo, é empregado para explorar a superfície de energia livre com a finalidade de encontrar as melhores conformações dos ligantes; enquanto a função de pontuação, como as funções baseadas em campos de força, empíricas e baseadas em conhecimento, envolvem a avaliação de cada um dos modos de ligação do complexo proteína-ligante (PINZI; RASTELLI, 2019; SAIKIA; BORDOLOI, 2019; HAUNG, *et al.*, 2010; QINGLIANG; SHAH, 2017).

Este método de acoplamento simula a interação dos compostos (ligantes) com a *LaTR*, através das coordenadas espaciais do local de interação, definido pelo *grid*, com a consequente aplicação de uma função de pontuação (MONTANARI, 2011). O empregando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), um híbrido de algoritmo genético e algoritmo de busca local disponível no AutoDock 4.2 (MORRIS, 2009), cria uma população aleatória de diferentes conformações que é tratada como um gene. A população é submetida a uma simulação evolutiva com processos como mapeamento

fenotípico, mutação e cruzamentos ocorrendo a cada geração. A simulação é seguida pelo algoritmo de busca local que realiza uma minimização de energia sobre a população de indivíduos onde as conformações com energias mais baixas são transferidas para a próxima geração (VENKATESAN, 2011). Ao final, tem-se a seleção das melhores poses de acoplamento para cada composto avaliado.

3.10 Dinâmica Molecular (DM)

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica computacional que consiste na simulação da evolução do comportamento molecular em função do tempo, através da análise dos movimentos dos átomos, resultando em modelos mais próximos à realidade biológica (VERLI, 2014; SONKAR, *et al.*, 2019; SINGH; SINGH, 2020). Ela difere do VS pois não realiza uma avaliação estática. Essa evolução atômica (trajetória) é obtida por meio das leis do movimento de Newton e permitem estimar numerosos fenômenos dependentes do tempo, como: a superfície molecular de um alvo, a interação entre uma pequena molécula e uma macromolécula ou a presença e desaparecimento de um determinado canal ou cavidade (PAQUET; VIKTOR, 2015; SALMASO; MORO 2018; SINGH; SINGH, 2020).

Estas análises são obtidas através da definição do valor da energia potencial oriundas dos campos de força atuantes no sistema, resultando no cálculo da força que atua sobre cada átomo do sistema (VANOMMESLAEGHE; GUVENCH, 2014; NAMBA, *et al.*, 2008). Por meio da segunda Lei de Newton, obtém-se os valores de aceleração de cada átomo e, por métodos de integração numérica, calcula-se o valor das velocidades, cuja integral resulta na posição atômica (NAMBA, *et al.*, 2008).

O cálculo da energia do campo de força em função da estrutura 3D compreende toda a superfície de energia potencial de uma molécula para todas as conformações 3D possíveis (SMITH, *et al.*, 2017). Diversos campos de força são amplamente utilizados na simulação por DM: AMBER (KLAMT, 2005), CHARMM (KARPLUS, 2006), OPLS (WATTS, *et al.*, 2014) e GROMOS (POL-FACHIN, *et al.*, 2012). Estes variam principalmente na maneira como são parametrizados, mas geralmente apresentam resultados semelhantes (SINGH; SINGH, 2020). O campo de força GROMOS (GRONingen Molecular Simulation), utilizado nesse trabalho, inclui uma parametrização das interações não ligadas com o objetivo de reproduzir as propriedades termodinâmicas de pequenas moléculas. Além disso, utiliza “blocos de

construção” para modelar sistemas mais complexos e altera as cargas atômicas parciais para a reprodução das propriedades termodinâmicas (SINGH; SINGH, 2020).

A realização da simulação por DM requer a montagem e preparação do sistema a ser estudado. Para isso, é delimitado um espaço chamado caixa de simulação, onde a molécula de interesse é inserida, solvatada e estabilizada eletrostaticamente quanto a sua carga e força iônica. É necessário também definir a forma geométrica dessa caixa, o que permite o estabelecimento das condições periódicas de contorno a partir da replicação da caixa original em todas as direções do espaço (NAMBA, *et al.*, 2008; VERLI, 2014; KHAN, *et al.*, 2016). Estas condições de contorno são úteis para que o sistema não encontre o vácuo e não perca as suas partículas constituintes.

Após a montagem, o sistema passa por passos sucessivos de minimização de energia para alcançar a menor energia potencial, onde sua conformação é mais estável (NAMBA, *et al.*, 2008; VERLI, 2014). Por fim, o sistema é submetido às dinâmicas de equilibração e de produção de dados, possibilitando as avaliações de diversos dados, como RMSD, raio de giro, análise das estruturas secundárias, flutuação média dos resíduos, fator-B de temperatura, análise das interações de hidrogênio, dentre outras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelagem Comparativa da Tripanotona Redutase de *L. amazonensis* (LaTR)

Uma vez que não há estrutura experimental determinada para a LaTR, construiu-se seu modelo por Modelagem Comparativa através do Modeller 9.14 (ESWAR, *et al.*, 2007). Os dados da sequência-alvo (LaTR) foram obtidos no banco de dados de estruturas UniProt (<https://www.uniprot.org/>, MORGAT, 2019) sob o código A5JV95. A partir desta sequência buscou-se em diversas bases de dados moldes da LaTR com: i) maior identidade sequencial ($E < 0$ e cobertura $> 50\%$); ii) estrutura 3D disponível; iii) valores baixos de resolução (Å) e iv) maior similaridade sequencial ($> 80\%$).

Empregou-se o servidor BLAST (<https://www.uniprot.org/blast/>, MORGAT, 2019) para o alinhamento local e o programa Clustal Omega (SIEVERS, *et al.*, 2014) para o alinhamento global entre as sequências do molde e do alvo. A partir deste resultado, construiu-se o modelo 3D da LaTR por satisfação de restrições espaciais no programa Modeller 9.14 (ESWAR, 2007).

A validação do modelo final da LaTR foi realizada verificando-se diversos parâmetros: i) sua estereoquímica no programa PROCHECK (LASKOWSKI, 1993); ii) seu perfil energético, ProSAIL (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e QMEAN4 (BENKERT, *et al.*, 2011) e iii) o ambiente dos resíduos de aminoácidos pelo Verify3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997), PROVE (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROVE/>) e SAVES (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Ao final as estatísticas das interações não-ligadas foram realizadas pelo ERRAT v.2.0 (COLOVOS; YEATES, 1993). O modelo resultante foi avaliado e analisado visualmente no Pymol 2.2.2 (DELANO, 2002) para identificação dos principais sítios.

4.2 Preparo das estruturas para o acoplamento molecular

A partir da estrutura da LaTR obtida no item anterior, foram adicionados todos os átomos de hidrogênio (método *noBondOrder*) e calculadas as cargas atômicas -

método de Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980), através das ferramentas do AutoDock 4.2 (MORRIS, 2009). Posteriormente, os hidrogênios não polares foram unidos aos carbonos (*merge*) e, por fim, assinalados os tipos de átomos (MORRIS, 2009). O estado de protonação da LaTR foi definido de acordo com o pKa dos resíduos calculados pelo programa PROPKA 3.1. (OLSON *et al.*, 2011).

4.3 Autogrid e Autodock do ligante cristalográfico

O AutoDock 4.2 (MORRIS, 2009) requer mapas de grade (do inglês, *grid*) de afinidade pré-calculados para a realização do *docking* (GOODFORD, 1985). Os parâmetros do *grid* foram: i) número de pontos nas dimensões x, y e z: 70, 92 e 80, respectivamente; ii) coordenadas do centro da rede x, y e z: 22,276; 42,88; -17,242, respectivamente (valores em Å) e iii) espaçamento da rede= 0,375 Å. Em seguida foi executado o módulo *Autogrid* (GOODFORD, 1985).

O *docking* dos compostos na LaTR foi realizado no Autodock 4.2 (MORRIS, 2009) empregando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS, *et al.*, 1998) onde os parâmetros foram: i) População: 150; ii) Número de soluções: 50; iii) Gerações: 27.000; iv) Avaliações de energia: 2.500.000; v) taxa de mutação: 2%; vi) taxa de cruzamento: 80% e vii) Taxa de elitismo: 1,0.

Em seguida o programa *Raccoon Virtual Screening* (FORLI, 2016) foi empregado para a realização da triagem no Autodock 4.2 (MORRIS, 2009). O *Raccoon* organiza todos os arquivos necessários aos cálculos de acoplamento e fornece um *script* de execução destes que, uma vez executado dispara a rotina de acoplamento para cada composto presente no banco de dados (FORLI, 2016).

4.4 Seleção das moléculas e cálculo das propriedades farmacocinéticas e físico-químicas

Para a realização do acoplamento molecular, foi empregada uma quimioteca de catecóis contendo 579 estruturas que foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Ramon El-Bachá (ICS - UFBA). Após a avaliação prévia de suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, realizadas pelos alunos de Iniciação Científica Jordan Freitas Duarte e Angne Lea de Oliveira Bonfim, a quimioteca compôs-se de 383 ligantes que foram minimizados e disponibilizados para o acoplamento.

4.5 Dinâmica Molecular (DM)

O software GROMACS 2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005) foi utilizado para as simulações de DM onde foram empregados os seguintes parâmetros: tempo = 200 ns, P= 1 atm, T= 303 K, pH= 7,5, campo de força GROMOS-54A7 (OLIVEIRA, *et al.*, 2020), tratamento eletrostático (PME) (DARDEN, *et al.*, 1993) com raio de corte = 1,0 nm para interações não covalentes, condições de contorno periódicas (PBC), taxa de escrita de 2 ps, modelo de água SPC/E (BERENDSEN, *et al.*, 1987; BRYK, *et al.*, 2004), caixa de simulação dodecaédrica. Para garantir a isotonicidade do sistema Na⁺ e Cl⁻ foram adicionados ao sistema numa concentração de 40nM (TURCANO, *et al.*, 2020). Em todos os cálculos visando mimetizar a condição biológica, as histidinas 461 (cadeia A e B) foram consideradas protonadas, enquanto todas as outras foram mantidas desprotonadas.

Uma vez concluídas essas etapas, o sistema foi minimizado (*steepest descent*/ gradiente conjugado) até que as forças fossem menores que 10 kJ/mol nm. Em seguida, foi realizada uma simulação de 1 ns com restrição a posição dos átomos “pesados” (etapa de pré-equilíbrio) no *ensemble* NPT. As simulações foram realizadas de forma independente na LaTR apo, holo e no complexo LaTR-Rutina. As topologias dos ligantes para as simulações dos complexos foram definidas pelo servidor ATB (*Automated Topology Builder*, <http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>, STROET, *et al.*, 2018) e as coordenadas iniciais da rutina no complexo LaTR foram obtidas a partir do *docking* (item 4.3).

As análises de flutuações médias (RMSF) se deu no módulo RMSF do GROMACS 2021-3 (BERENDSEN, *et al.*, 1995; VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005; ABRAHAM, *et al.*, 2015). A análise de ligações hidrogênio, no módulo H-bond (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005) e no programa HbMap2Grace, (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/hbmap2grace/index.html>). A análise da área de superfície molecular foi feita no SurfinMD (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/surfinmd/>).

4.6 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade da rutina foi determinada frente a macrófagos murinos imortalizados da linhagem J774, bem como frente a macrófagos humanos de linhagem tumoral (THP-1). Os macrófagos foram incubados em placas de 96 poços

(1×10^4 células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; GIBCO) e 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA), mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A rotina foi testada em série de sete concentrações, diluídas na proporção de 1:2 (1,6-100 µM), em quadruplicata e incubada por 72 horas. A anfotericina B foi usada como controle positivo, testada em série de sete concentrações e diluída na proporção 1:2 (0,05-5 µM), em quadruplicata. Posteriormente, 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados por 6 h a 37°C e 5% de CO₂. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 570 e 600 nm tendo violeta genciana como controle positivo (Synth, São Paulo, SP, Brasil) (MEIRA, *et al.*, 2017).

O valor da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), foi calculado com base no percentual de inibição do crescimento das células comparado aos controles negativos. Esse cálculo foi realizado através dos valores do logaritmo da concentração, seguidos pelo ajuste da curva de regressão não linear. Os valores obtidos correspondem a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes para cada linhagem celular.

4.7 Ensaio de viabilidade celular

Promastigotas de *La* (1×10^6 por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços em meio *Schneider* (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; GIBCO) e 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA). Os parasitos foram tratados com a rotina em série de oito concentrações, diluídos na proporção de 1:2 (0,390625- 50 µM), em quadruplicata e incubados por 72 h a 26°C. A anfotericina B foi usada como controle positivo, em série de oito concentrações, diluída na proporção de 1:2 (0,0390625- 5 µM), em quadruplicata. Posteriormente, foi adicionado 20 µL/poço de *AlamarBlue* (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 horas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

O percentual de inibição da cultura axênica foi determinado baseado no controle não tratado (GUEDES, *et al.*, 2018). O valor de CI₅₀ foi calculado com base no percentual de inibição do crescimento das células comparado aos controles negativos. O cálculo foi obtido através dos valores do logaritmo da concentração, seguidos pelo ajuste da curva de regressão não linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Modelagem comparativa da Tripanotiona Redutase de *L. amazonensis* (LaTR)

5.1.1 Seleção do molde

A seleção do molde ocorreu através de uma busca utilizando os termos “*leishmania amazonensis trypanothione reductase*” na base de dados do UniProt (<https://www.uniprot.org/>, MORGAT, et al., 2019). Obtivemos duas sequências (códigos UniProt: A5JV95 e Q0GU43), que se diferenciavam basicamente pelo comprimento da sequência canônica, 491 e 476- respectivamente, refletindo nas diferenças em suas massas (Da) e na posição de seus sítios de ligação.

Estas sequências (A5JV95 e Q0GU43) foram avaliadas quanto a predição de regiões transmembranares no servidor TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e quanto a presença de peptídeo sinal no SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Como resultado, verificou-se a inexistência de regiões transmembranares e de peptídeo sinal em ambas sequências (Anexo 1).

Posteriormente, ambas foram submetidas ao BLAST (<https://www.uniprot.org/blast/>, MORGAT, 2019) para uma busca da estrutura molde. Este programa compara sequências de aminoácidos (ou nucleotídeos) a bancos de dados de sequências e calcula sua significância estatística (MORGAT, et al., 2019). O alinhamento de ambas apontou 250 proteínas com identidade superior a 41% em diferentes gêneros e espécies, além da Glutathione Redutase (GR). Para uma melhor comparação dos alinhamentos construiu-se um dendrograma para as proteínas que apresentaram mais de 80% de identidade sequencial obtendo-se 95,3% de identidade sequencial entre a LaTR (código UniProt: A5JV95) e a TR de *Leishmania infantum* (LiTR) (código UniProt: A4HSF7) e ambas possuíram o mesmo comprimento de sequência canônica (491 aminoácidos) (Anexo 2).

Assim, a estrutura de referência (molde) empregada na Modelagem Comparativa foi a LiTR, a qual atende aos critérios de maior identidade (95,3%) e similaridade sequencial (> 80%), resolução 3,61Å (R-Value: 0.252; R-Free: 0.304),

além de possuir estrutura 3D disponível no *Protein Data Bank* (código PDB: 4ADW BAIocco *et al.*, 2013).

5.1.2 Alinhamento

A busca de moldes realizada no BLAST permite encontrar regiões de alta similaridade entre as sequências (alinhamento local), porém desconsidera o melhor alinhamento em toda a extensão das sequências em estudo (ALTSCHUL, *et al.*, 1990). Em outras palavras, o alinhamento local visa somente o alinhamento das regiões de alta similaridade, não importando as sequências adjacentes a estas regiões. Para a realização das etapas posteriores é importante que as sequências primárias do molde escolhido sejam alinhadas de modo global, onde serão identificadas as regiões conservadas (VERLI, 2014). Diversos algoritmos realizam este tipo de alinhamento. Um exemplo é o Clustal Omega (SIEVERS, *et al.*, 2014) que a partir do alinhamento global entre as sequências alvo e o molde, emprega algoritmos específicos para a predição de estruturas de proteínas via Modelagem Comparativa transferindo as informações da estrutura 3D da proteína molde para o modelo.

5.1.3 Construção e validação do modelo

A construção dos modelos tridimensionais pode ser realizada através de diversas metodologias. Neste trabalho, empregou-se o método de satisfação das restrições espaciais, inserido no programa MODELLER (SALI; BLUNDELL, 1993). Esta técnica se baseia no alinhamento sequencial entre o molde e o alvo para a definição estatística de uma série de restrições espaciais (distâncias interatômicas e ângulos diedrais). Por levar em conta estas características estruturais, essa metodologia permite que o modelo construído tenha mais liberdade conformacional em relação ao molde (ESWAR *et al.*, 2007; JASON *et al.*, 2019).

No total foram gerados 100 modelos que foram classificados com base no menor valor de DOPE (do inglês, *Discrete Optimized Protein Energy*)- um potencial estatístico que estima energeticamente a proximidade dos modelos gerados no estado nativo da proteína. Apesar de relevante, por não permitir uma investigação estrutural

e energética detalhada, apenas a pontuação DOPE não é o suficiente para a escolha do melhor modelo gerado (ESWAR *et al.*, 2007; JASON *et al.*, 2019).

Assim uma análise complementar avaliou a qualidade do enovelamento protéico (*folding*) pelo QMEAN4, (<https://swissmodel.expasy.org/qmean>, BENKERT *et al.*, 2011). Este possui uma função de pontuação (QMEAN4 *Value*) composta pela combinação linear de quatro termos estatísticos, a qual é capaz de derivar estimativas de qualidade absoluta globais (para a estrutura) e locais (por resíduo) com base num único modelo (BENKERT *et al.*, 2011). Desta forma, as estruturas que apresentaram os menores valores de QMEAN4 foram submetidas a diversas análises posteriores visando a seleção das melhores estruturas da LaTR.

A análise da qualidade estereoquímica dos modelos foi realizada pelos gráficos de Ramachandran (RAMACHANDRAN, *et al.*, 1963) gerado pelo PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>, LASKOWSKI, *et al.*, 1993). Este servidor gera um gráfico que mostra as combinações possíveis entre os ângulos de torção Φ (*phi*) e Ψ (*psi*) das cadeias principais dos aminoácidos (RAMACHANDRAN, *et al.*, 1963). Baseando-se nestes ângulos, é possível extrair informações relativas ao tipo de estrutura secundária e os efeitos estéricos entre os resíduos. Portanto, esta análise informa a porcentagem dos resíduos do modelo localizados em regiões permitidas e não permitidas, além de analisar os ângulos torcionais dos resíduos (LASKOWSKI, *et al.*, 1993). Como resultado (Tabela 1), os 10 melhores modelos obtiveram uma pontuação superior ao molde, o que indica que os modelos gerados apresentam uma maior porcentagem de aminoácidos localizados em regiões com pouco impedimento estérico (permitidas) (CHOUDHURI, 2014).

Outra análise se baseou no valor do Verify-3D (EISENBERG *et al.*, 1997), que considera a qualidade do modelo comparando a compatibilidade entre a estrutura tridimensional (3D) e a estrutura primária (1D) (EISENBERG *et al.*, 1997). Essa análise resulta numa percentagem geral de resíduos que obtiveram a média 3D-1D maior ou igual a 0,2 (EISENBERG; *et al.*, 1997). Além disso, é possível avaliar se o enovelamento é aquele esperado para resíduos com as características físico-químicas e estéricas semelhantes aos apresentados pela proteína em análise (BOWIE *et al.*, 1991, LUETHY *et al.*, 1992). Em nossos resultados 5 modelos tiveram uma pontuação superior ao molde, ou seja, apresentaram mais que 91,39% dos seus resíduos com média 3D-1D $\geq 0,2$ (Tabela 1).

A avaliação seguinte foi baseada no valor do "Overall Quality Factor" do ERRAT, ou, "fator de qualidade geral" para interações atômicas não ligadas (MESSAOUDI *et al.*, 2013; JIA, *et al.*, 2020). Neste termo, pontuações mais altas indicam maior qualidade, sendo que o intervalo geralmente aceito é > 50 para modelos de alta qualidade (MESSAOUDI *et al.*, 2013). Segundo esta métrica, 4 estruturas obtiveram pontuação superior ao molde (Tabela 1).

A análise subsequente dessa etapa foi realizada através do Z-score do PROSA-II, que indica a qualidade geral do modelo (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Seu valor exibe num gráfico os valores de classificação de todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente no PDB (BURLEY, *et al.*, 2021). Ele pode ser usado para verificar se a pontuação Z da estrutura é compatível com as pontuações normalmente encontradas para as proteínas nativas de tamanho semelhante a proteína de estudo (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). O resultado demonstra que as 10 estruturas e o molde (código PDB: 4ADW, BAIOTTO *et al.*, 2013) estão dentro da faixa de pontuações normalmente encontrada para proteínas de 500 kDa determinadas experimentalmente (Tabela 1).

Todos estes resultados apresentados na Tabela 1 permitiram a seleção das melhores estruturas da LaTR construídas pelo Modeller9 .14 (ESWAR *et al.*, 2007) ($n = 100$). A partir dos 10 melhores modelos comparados com o molde, foram selecionados os 5 melhores que foram submetidos a uma análise consensual levando em consideração os valores de DOPE Score normalizado e moldpdf, os valores de QMEAN4 e os valores de RMSD (Tabela 1). Entre os 5 melhores, apenas 3 pontuaram em duas avaliações, dentre os 3, apenas 1 deles foi unânime na avaliação entre os 10 melhores, tendo como resultado dessa análise o melhor modelo "05" (Tabela 1).

Tabela 1 - Análises comparativa dos modelos 10 melhores modelos da LaTR gerados pelo Modeller9.4 (ESWAR, *et al.*, 2007) frente ao molde (código PDB: 4ADW, BAIocco *et al.*, 2013): PROCHECK (LASKOWSKI, 1993), Verify3D (EISENBERG, *et al.*, 1997), ERRAT v.2.0 (COLOVOS; YEATES, 1993), ProSAIL (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e QMEAN4 (BENKERT *et al.*, 2011).

10 modelos	4ADW	05	09	17	27	28	33	50	69	85	92
PROCHECK (Ramachandran)	83,7% aa centrais 16,1% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,5% aa centrais 6,3% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	92,7% aa centrais 7,0% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,2% aa centrais 6,5% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,0% aa centrais 6,8% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,2% aa centrais 6,5% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,7% aa centrais 6,1% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,0% aa centrais 6,8% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,2% aa centrais 6,5% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,2% aa centrais 6,5% reg. permitidas 0,2% reg. gen. permitidas	93,0% aa centrais 6,5% reg. permitidas 0,5% reg. gen. permitidas
Verify-3D	91,39%	92,62%	90,16%	92,21%	93,24%	94,67%	92,62%	90,78%	89,14%	85,04%	88,32%
ERRAT	90,56	92,13	91,83	91,22	92,31	91,63	89,85	92,50	89,63	91,85	91,86
ProSa-WEB (Z-score)	-11,15	-10,95	-10,78	-10,92	-10,86	-10,79	-10,79	-10,68	-10,80	-10,85	-10,75
MODELLER (DOPEScore norm.)		-1,02	-1,02	-1,05	-1,01	-0,99					
MODELLER (molpdf)		274,14	269,09	266,02	262,14	293,49					
QMEAN4	-2,00	-1,67	-1,72	-1,72	-1,74	-1,66					
RMSD (nm)	n.a.	0,16	0,13	0,16	0,16	0,23					

Fonte: Autoria própria

5.2 Acoplamento molecular

5.2.1 Definição das estruturas dos ligantes e da proteína

A estrutura da LaTR empregada foi o modelo "05" obtido anteriormente via Modelagem Comparativa (item 5.1). Os valores de pKa para seus aminoácidos foram determinados pelo programa PROPKA 3.1 (SØNDERGAARD, *et al.*, 2011; OLSON *et al.*, 2011) e seguiram a distribuição de pH= 7,5 (BAIOCCO *et al.*, 2013). Segundo o PROPKA 3.1 (SØNDERGAARD, *et al.*, 2011; OLSON *et al.*, 2011), todos aspartatos e glutamatos estariam desprotonados (COO⁻); as histidinas, as lisinas e argininas, protonadas (NH₃⁺).

5.2.2 Definição do *grid*

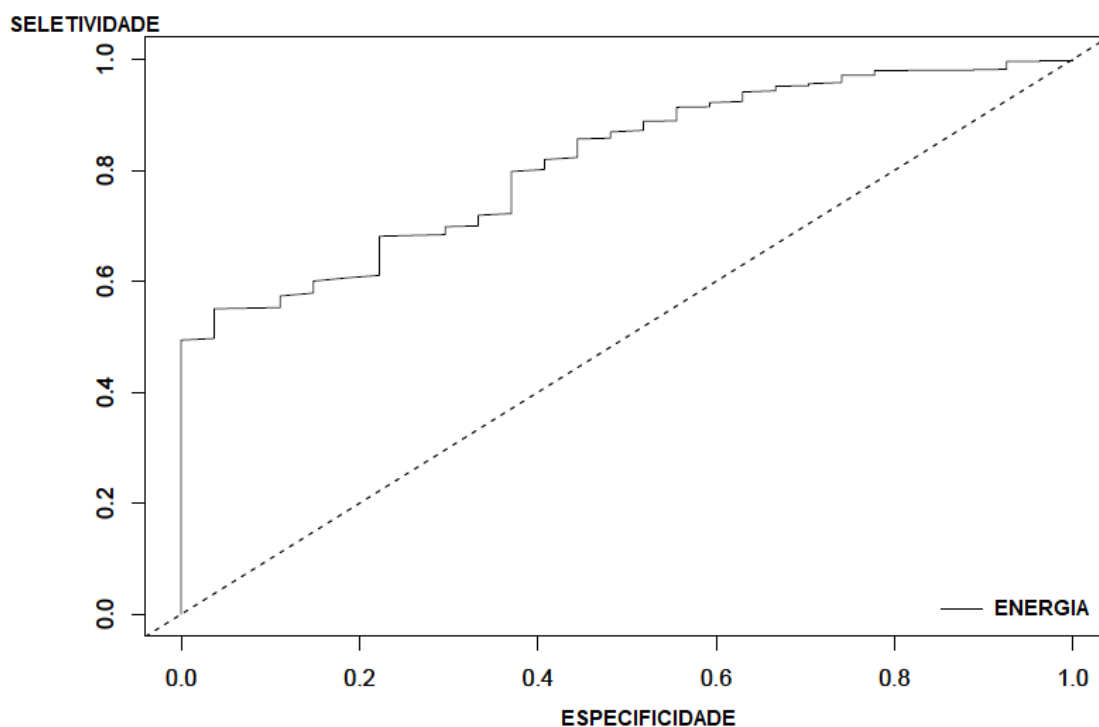
O *grid*, conforme descrito no item 4.3, foi definido de acordo com os principais aminoácidos que interagem com o substrato natural da TR (TS₂) em outros homólogos, destacando-se: as cisteínas catalíticas Cys52 e Cys57, His461', Glu466' e 467' e Lys240 (BAIOCCO, *et al.*, 2013). Seguiu-se os cálculos destes parâmetros através do módulo *AutoGrid*, um executável dentro do programa AutoDock v.4.2 (MORRIS, *et al.*, 2009).

5.2.3 Avaliação do programa de acoplamento para a Triagem Virtual

Um total de 27 inibidores competitivos (JACOMINI, *et al.*, 2016; RODRIGUES, *et al.*, 2015; BRAGA, *et al.*, 2014) foram empregados para a avaliação do AutoDock 4.2 (MORRIS, 2009). Para cada composto ativo, 50 falsos positivos (*decoys*) foram também gerados. A taxa de recuperação foi determinada pela curva ROC obtida a partir das energias de acoplamento do conjunto ativos x *decoys* e apresentou uma área sob a curva (AUC) de 0,81 (Figura 3). A AUC vai de 0 a 1, sendo que uma AUC de 0,5 indicaria que o programa tem baixo poder discriminatório entre verdadeiros e falsos positivos. A AUC obtida de 0,81 indica que o Autodock 4.2 (MORRIS, 2009) atribui maiores energias de acoplamento para os compostos que são inibidores, em

detrimento dos *decoys*. Tais resultados sugerem que o programa é adequado para a Triagem Virtual no sistema em estudo.

Figura 3 - Avaliação da seletividade e especificidade do Autodock 4.2 (MORRIS, *et al.*, 2009) para os inibidores competitivos da LaTR (n= 27) em detrimento aos *decoys* gerados pelo DUD-E (<http://dude.docking.org/>, MYSINGER *et al.*, 2012).



Fonte: Autoria própria.

5.2.4 Avaliação do acoplamento para a Triagem Virtual

O *docking* simula a interação dos compostos (ligantes) com a LaTR no local de interação, definido pelo *grid*, com a consequente aplicação de uma função de pontuação (MONTANARI, 2011). Das 383 moléculas acopladas no sítio da LaTR selecionamos os 30 melhores complexos de acordo com a energia de interação proteína-ligante (ΔG_{bind}), na qual o AutoDock 4.2 (MORRIS, *et al.*, 2009) emprega o campo de força AMBER (LOSCHWITZ, *et al.*, 2021) da Mecânica Molecular (VENKATESAN, *et al.*, 2011).

5.2.5 Análises da Triagem Virtual por Acoplamento Molecular (VS) na quimioteca de catecóis

O *docking* foi realizado em triplicata na quimioteca de catecóis (n=383). Para os catecóis melhores classificados em relação ao ΔG_{bind} , 3 compostos se mantiveram entre os 5 melhores (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da Triagem Virtual (VS) empregando os catecóis frente a LaTR.

VS 1		VS 2		VS 3	
Nome	ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Nome	ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Nome	ΔG_{bind} (Kcal/mol)
CARMINATE AMMONIUM	-13,16	MAYBRIDGE NBR 00332	-13.51	MFCD00017496	-13.89
MFCD00075939	-12,78	CARMINATE AMMONIUM	-13.38	CARMINATE AMMONIUM	-13.38
MAYBRIDGE NBR 00332	-12,67	MFCD00017433	-12.95	MAYBRIDGE NBR 00332	-13.27
MFCD00016946	-12,58	Rutina	-12.82	MFCD00017654	-12.59
Rutina	-12,55	MFCD00017735	-12,52	Rutina	-12.49

Fonte: Autoria própria

Dentre estes, destaca-se a rutina, que por motivos que ulteriormente citados no item 6.5, foi priorizada para a realização de ensaios *in vitro*.

5.2.6 Análises de eficiência dos catecóis via Triagem Virtual por Acoplamento Molecular (VS)

Apenas a análise da energia de interação não fornece informações suficientes para a priorização de um ligante no processo de desenvolvimento de fármacos, pois o maior problema é o fato de que funções empíricas de pontuação tendem a favorecer moléculas maiores com maiores pontuações porque estas fazem mais interações com a proteína (OPREA *et al.*, 2001; TEAGUE *et al.*, 1999). Para resolver isso, é importante normalizar a pontuação de energia de ligação em relação ao tamanho do ligante acoplado (TRIGGLE; TAYLOR, 2006). Assim a medida de eficiência do ligante (LE, $LE = \text{afinidade} / N$, onde N é o número de átomos pesados, HOPKINS *et al.*, 2004) deve ser empregada na análise dos dados de energia pois permite que as moléculas

de tamanhos variados sejam comparadas mais facilmente (TRIGGLE; TAYLOR, 2006). Esta métrica tem sido amplamente empregada pelos químicos medicinais a fim de reduzir a massa molecular de compostos líderes (*leads*) e candidatos em fase clínica e priorizar compostos após estudos de HTS ou outras estratégias de triagem (TRIGGLE; TAYLOR, 2006).

Hopkins e colaboradores (2004) sugeriram que um limite inferior de LE pode ser estimado assumindo uma constante de ligação de 10 nM numa molécula com um peso molecular de 500 (consistente com a “regra de Lipinski”- LIPINSKI, 2004) resultando num $LE \approx 0,29$ kcal/mol/átomo pesado (HOPKINS *et al.*, 2004; TRIGGLE; TAYLOR, 2006). Assim, os compostos com as maiores medidas de eficiência do ligante são os melhores a serem considerados para otimização, desde que todos os outros fatores, como a acessibilidade sintética, sejam iguais (TRIGGLE; TAYLOR, 2006).

Adicionalmente, a LE é interpretada como uma medida da qualidade da interação entre um determinado composto e sua proteína alvo (ORITA *et al.*, 2011) para quantificar o potencial de fragmentos ou moléculas em se tornarem compostos líderes (*lead compounds*) (TRIGGLE; TAYLOR, 2006). Compostos menores e com boa interação no sítio são preferíveis a compostos maiores com a mesma atividade uma vez que aqueles podem ser estendidos visando a melhora da interação (TRIGGLE; TAYLOR, 2006). Nossos dados de LE (Anexo 3) variam em torno do ideal (0,29 kcal/mol/átomo pesado, HOPKINS *et al.*, 2004) indicando que os catecóis podem ser otimizados na busca de moléculas com interação mais efetiva frente a LaTR.

Uma extensão destas ideias permite que outras propriedades sejam levadas em consideração. Nos índices eficiência lipofílica do ligante (LLE) e eficiência lipofílica via logP do ligante (LELP), a lipofilicidade é diretamente introduzida para avaliar a qualidade dos compostos (ORITA *et al.*, 2011). Assim, para obter compostos com um logP não muito alto, embora ainda restando a potência, a diferença entre a potência (pKi) e o logP pode ser utilizada, sendo essa a definição de LLE (TRIGGLE; TAYLOR, 2006). Burrows e colaboradores (2004) propuseram que este termo sendo maior do que 2 unidades indica um provável composto líder.

Em geral, uma alta potência (alto valor de pKi) é importante nos compostos pois reduz suas ações inespecíficas e fora do alvo (UETRECHT, 2008). Quando associada a um baixo *clearance*, esta alta potência também permite uma dose total baixa, o que

diminui o risco de reação idiossincrática ao fármaco (UETRECHT, 2001; UETRECHT, 2008). Para fármacos orais, um valor de logP entre 2 e 3 é considerado ideal por equilibrar sua permeabilidade e metabolismo de primeira passagem (RODRIGUES, *et al.*, 2021). Desta forma, a eficiência lipofílica do ligante (LLE) captura ambos os valores num único parâmetro e evidências empíricas sugerem que os compostos promissores têm um LLE alto (> 6), correspondendo a um composto com um pKi de 8 e um logP de 2. Os valores de LLE > 8 (valor de referência = 6) revelam que os catecóis apresentam características promissoras para o desenvolvimento de fármacos quanto a sua potência e lipofilicidade (Anexo 3).

Outras métricas foram empregadas como o índice de eficiência de ligação (BEI), onde o peso molecular é usado como índice do tamanho molecular por refletir a contribuição de diferentes tipos de heteroátomos (CAVALLUZI *et al.*, 2017). A eficiência do ligante independentemente do tamanho (SILE), onde $SILE = \text{afinidade} / N^{0,3}$ (NISSINK, 2009) permite comparar ligantes de tamanhos distintos. Assumindo novamente uma constante de ligação de 10 nM numa molécula com um peso molecular de 500, os valores de referência para BEI seriam 0,02 e para SILE 3,35. Nossos dados indicam que os catecóis apresentam valores próximos a estes dois parâmetros, indicando a razoabilidade de serem empregados como potenciais inibidores da LaTR (Anexo 3).

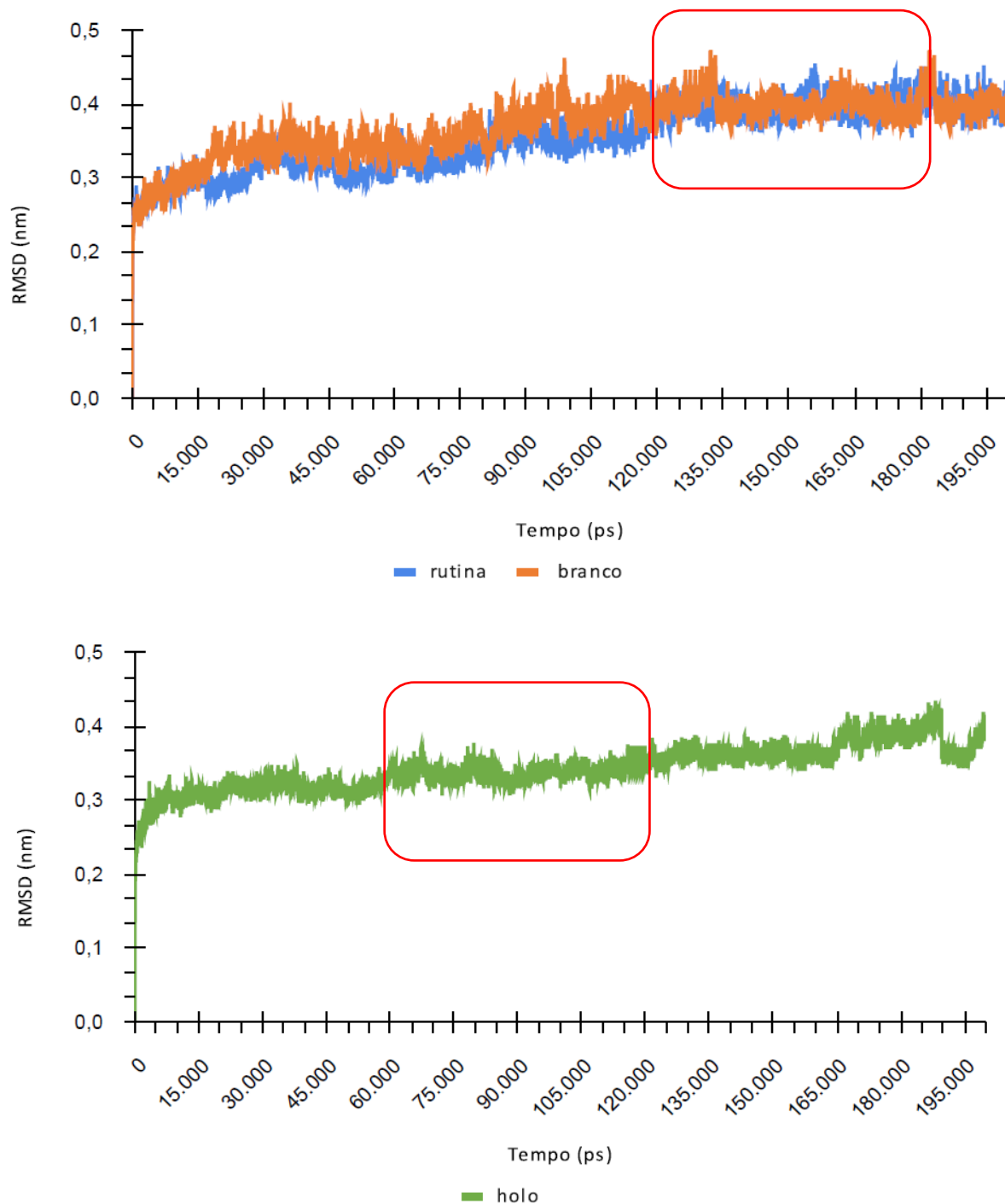
5.3 Dinâmica Molecular dos complexos da LaTR

A partir dos dados anteriores, três complexos ternários LaTR- cofatores (FAD e NADPH)- ligantes foram estudados via Dinâmica Molecular (DM): “branco” (sem a presença do substrato endógeno- GCG), holo (com o substrato) e rutina.

As análises de DM seguiram a metodologia descrita anteriormente (item 4.5). Inicialmente, a estabilidade estrutural da proteína ao longo da simulação foi avaliada. Seu desvio quadrático médio ou RMSD (do inglês: *root mean-square deviation*) das distâncias atômicas na LaTR em relação a estrutura inicial da DM foi avaliado, descontando-se os átomos de hidrogênio. A figura 4 mostra que a estrutura da LaTR nos complexos “branco” e com a rutina se equilibra a partir de 120 ns de simulação mantendo esta estabilidade até 180 ns (RMSD= $0,4 \pm 0,01$ nm e $0,4 \pm 0,02$ nm, respectivamente), enquanto no complexo holo, 60 ns- 120 ns (RMSD = $0,39 \pm 0,01$ nm),

sendo esta a fase produtiva da DM da qual se extraíram todos os dados subsequentes ($\Delta t = 60$ ns).

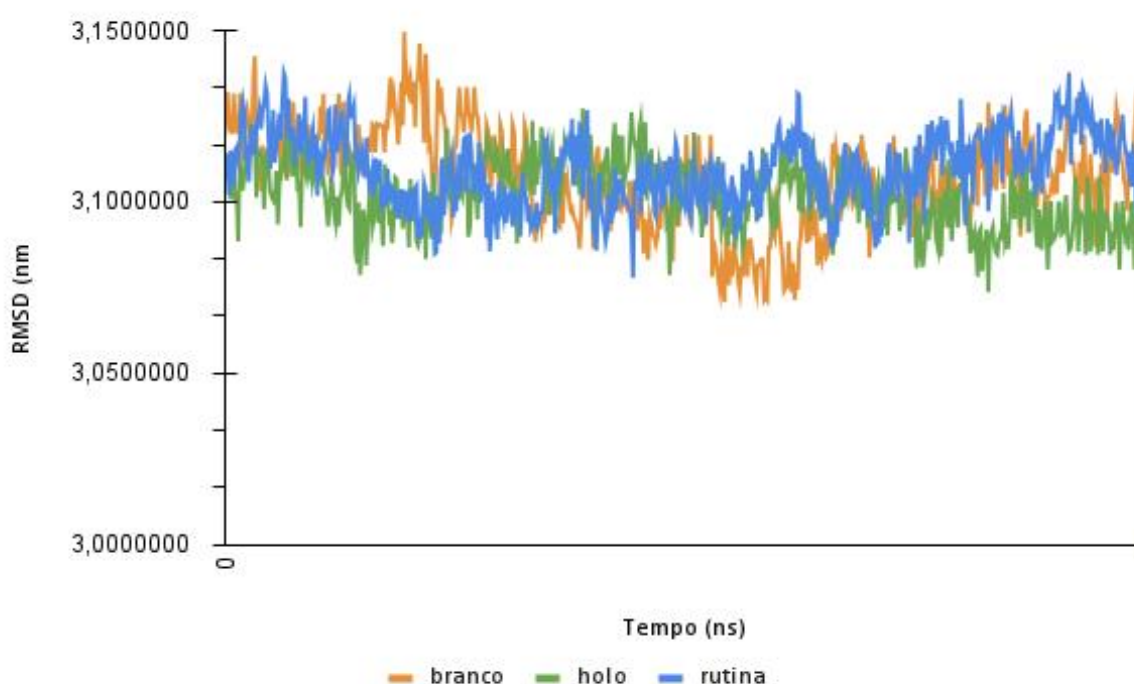
Figura 4 – Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos da proteína, exceto hidrogênio, durante DM de 200 ns na LaTR empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005). A área destacada em vermelho refere-se a fase produtiva utilizada para a aquisição de dados.



Fonte: Autoria Própria.

De forma a avaliar o grau de compactação da proteína durante a simulação faz-se a análise do raio de giro. Esta ferramenta permite avaliar alterações na geometria da proteína durante a DM, as quais podem indicar sua desestruturação (SNEHA, P.; DOSS, 2016). Os raios de giro total para os sistemas “branco”, holo e rutina foram: $3,10 \pm 0,014$ nm; $3,10 \pm 0,009$ nm; $3,10 \pm 0,010$ nm, respectivamente. Tais dados (Figura 5) mostram que a LaTR em todos os complexos manteve a geometria de sua estrutura 3D nas condições da simulação (T= 303 K; P= 1bar; pH= 7,5; [NaCl]= 40mM) e no complexo “branco” seus valores oscilaram entre 3,07 e 3,15, uma variação baixa, tendo em vista que é esperado uma menor estabilidade desse complexo devido à ausência do seu substrato original.

Figura 5 – Resultante do raio de giro durante a fase produtiva (60ns) dos complexos da LaTR (“branco”, holo e rutina) empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005).

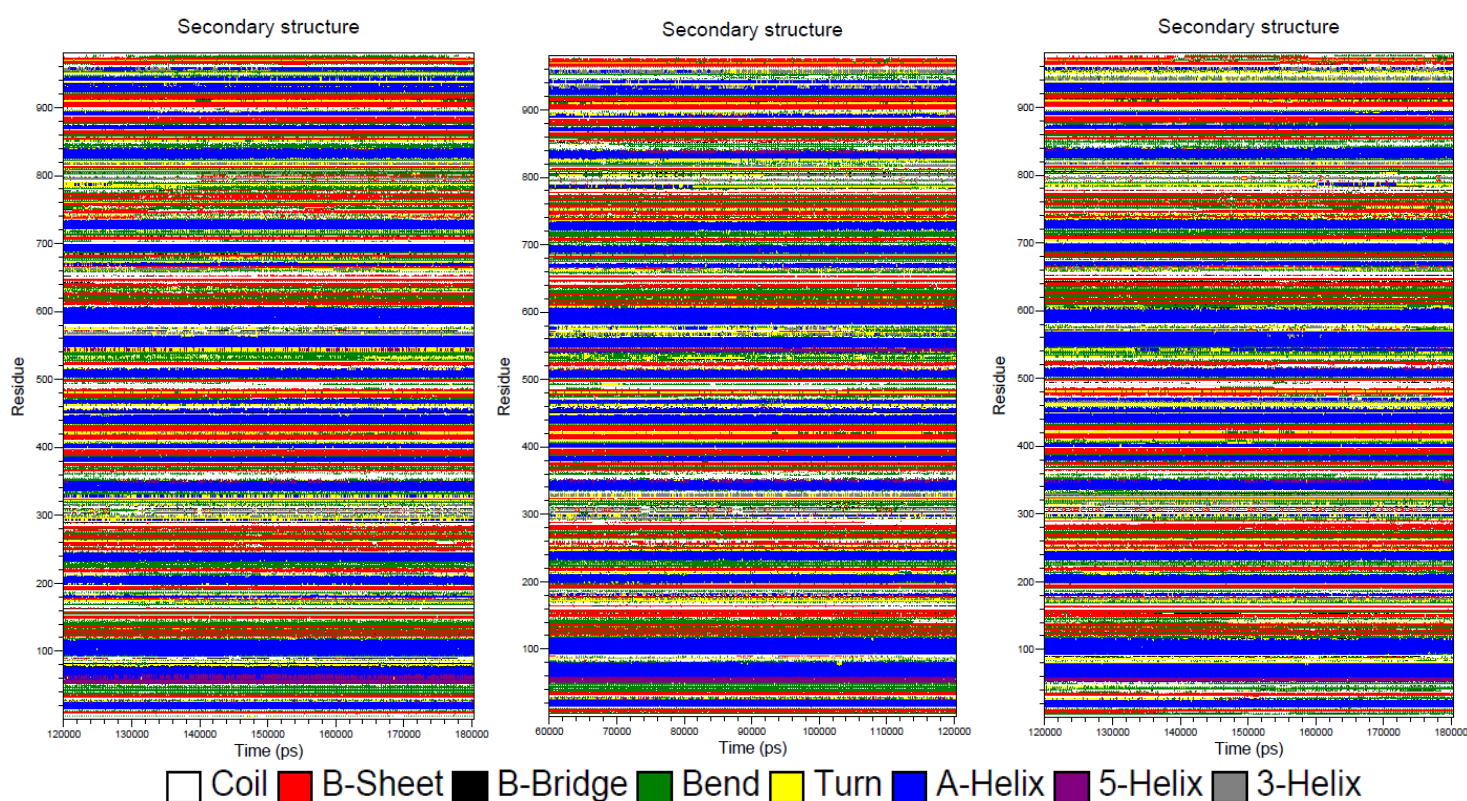


Fonte: Autoria Própria.

Apesar da estrutura 3D de uma proteína ser determinada por sua sequência de aminoácidos, a análise das estruturas secundárias pode auxiliar na avaliação das modificações estruturais ao longo da DM (SNEHA, P.; DOSS, 2016). A partir de informações como posição e propriedades físico-químicas da estrutura primária da

proteína é possível observar, prever e avaliar a evolução das estruturas secundárias ao longo da trajetória e, dessa forma, avaliar sua estabilidade (PIROLI, D. *et al.*, 2014). Assim a análise da estabilidade da estrutura secundária da LaTR durante a DM empregou o DSSP (do inglês, *Dictionary of Secondary Structure of Proteins*). Este algoritmo calcula as estruturas secundárias mais prováveis a serem atribuídas pelos aminoácidos de uma proteína dada as informações de suas coordenadas 3D (ZACHARIAS; KNAPP, 2014). De acordo com esta análise (Figura 6), as estruturas secundárias presentes nos complexos da LaTR (“branco”, holo e rutina) mantiveram-se estáveis durante a fase produtiva da DM, sem nenhuma modificação significativa.

Figura 6 – Análise da estrutura secundária dos complexos da LaTR durante a fase produtiva (60ns) empregando o DSSP (ZACHARIAS; KNAPP, 2014) embutido no GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005). Da esquerda para a direita, temos: “branco”, holo e rutina.



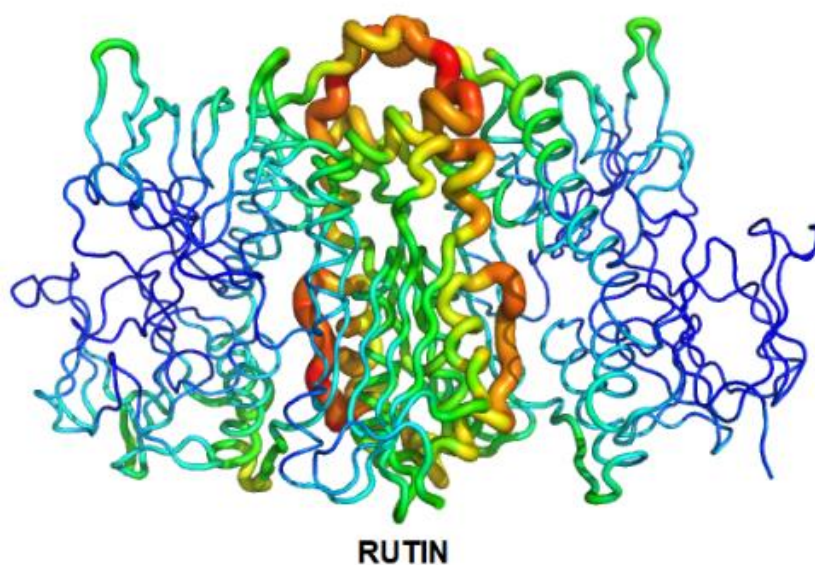
Fonte: Autoria Própria.

Uma vez comprovada a estabilidade estrutural do complexo durante a fase produtiva da DM ($\Delta t = 60\text{ns}$), procedeu-se a análises mais específicas visando o planejamento de fármacos anti-leishmania. O RMSF (do inglês, *root-mean-square fluctuation*), ou flutuação média dos resíduos, fornece uma análise de flexibilidade local em função da movimentação dos resíduos (SNEHA, P.; DOSS, 2016) em relação

à estrutura média. Para uma proteína com 488 aminoácidos por cadeia no complexo com a rutina obtivemos $RMSF = 0,92 \pm 0,42$ nm.

As diferenças nas flutuações médias dos resíduos podem ser melhor visualizadas pelo cálculo do fator de temperatura (*B-factor*) a partir do RMSF. Seus dados indicam: i) que a região de interface na LaTR é uma das regiões de mais alta flutuação na proteína (Figura 7); ii) a região catalítica está localizada numa região com diferentes flexibilidades (Figuras 8).

Figura 7 - Dados do fator-B de temperatura calculados durante a DM a partir do RMSF complexo LaTR-rutina durante a fase produtiva (60ns) empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005). . As regiões de menor fator-B/flutuação possuem coloração azul e regiões de maior movimentação, vermelha. A figura foi gerada pelo programa Pymol 2.2.2 (DELANO, 2002)



+ Gráfico de barras B-factor -



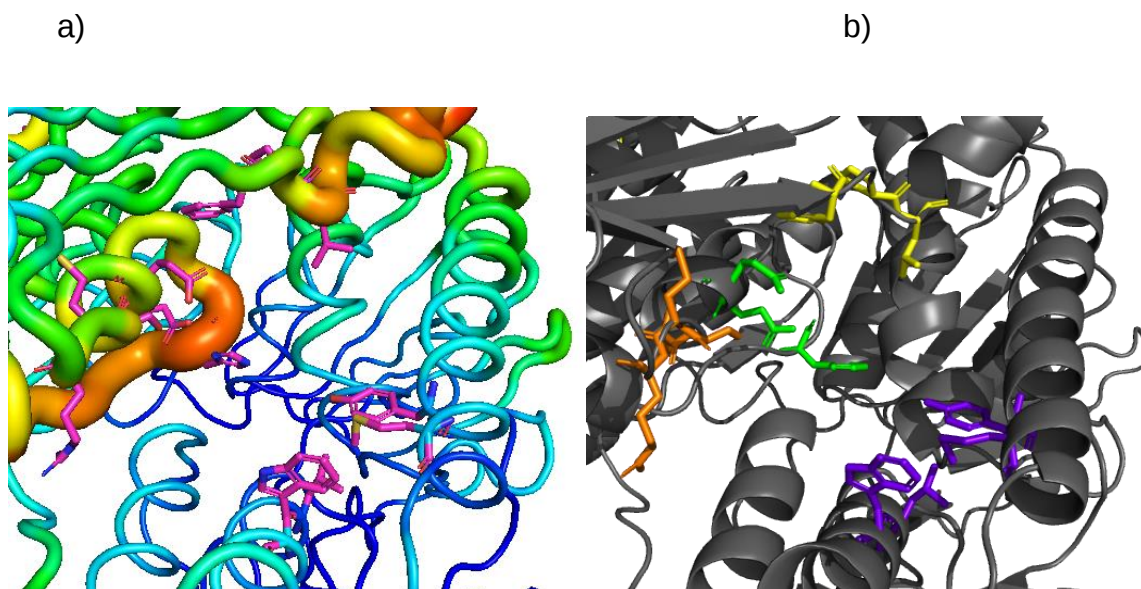
Fonte: Autoria Própria.

Comparando a disposição dos resíduos de aminoácidos dos principais subsítios com o *B-factor*, na mesma posição (Figura 8), podemos perceber que o sítio γ -glutâmico, composto pelos resíduos HIS461, GLU466 e GLU467, que inicialmente foi descrito para justificar o contato entre inibidores de carga positiva (CHAN, *et al.*, 1998; KHAN, *et al.*, 2000) e o sítio Y, composto pelos resíduos CYS469, SER470,

MET471 e ARG472, descrito previamente por Pita e colaboradores (2012), se encontram na região onde houve a maior movimentação (Fig. 8).

O sítio hidrofóbico, o qual não é acessado pelo substrato natural da enzima (CHAN, *et al.*, 1998), composto pelos resíduos LEU18, TRP22, TYR111 e MET114, apresentou estabilidade (região de coloração azul). Um segundo bolsão hidrofóbico, descrito por Chan e colaboradores (1998), denominado sítio Z, formado pelos resíduos PHE396, PRO398 e LEU399, se localizou numa região de flutuação média (Fig. 8).

Figura 8 - Dados do fator-B de temperatura calculados durante a DM a partir do RMSF complexo LaTR-rutina durante a fase produtiva (60ns) empregando o GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005). . n os principais subsítios da TR. Em (a) os resíduos estão representados em bastões (magenta) e a proteína (*cartoon* colorido pelo fator-B de temperatura- idem fig. 7. Em (b) a estrutura da LaTR está representada em *cartoon* (cinza escuro) e os resíduos de interesse estão destacados: o sítio γ -glutâmico (verde), o sítio Z (amarelo), o sítio Y (laranja), a sítio hidrofóbico (roxo). A figura foi gerada pelo programa Pymol 2.2.2 (DELANO, 2002).



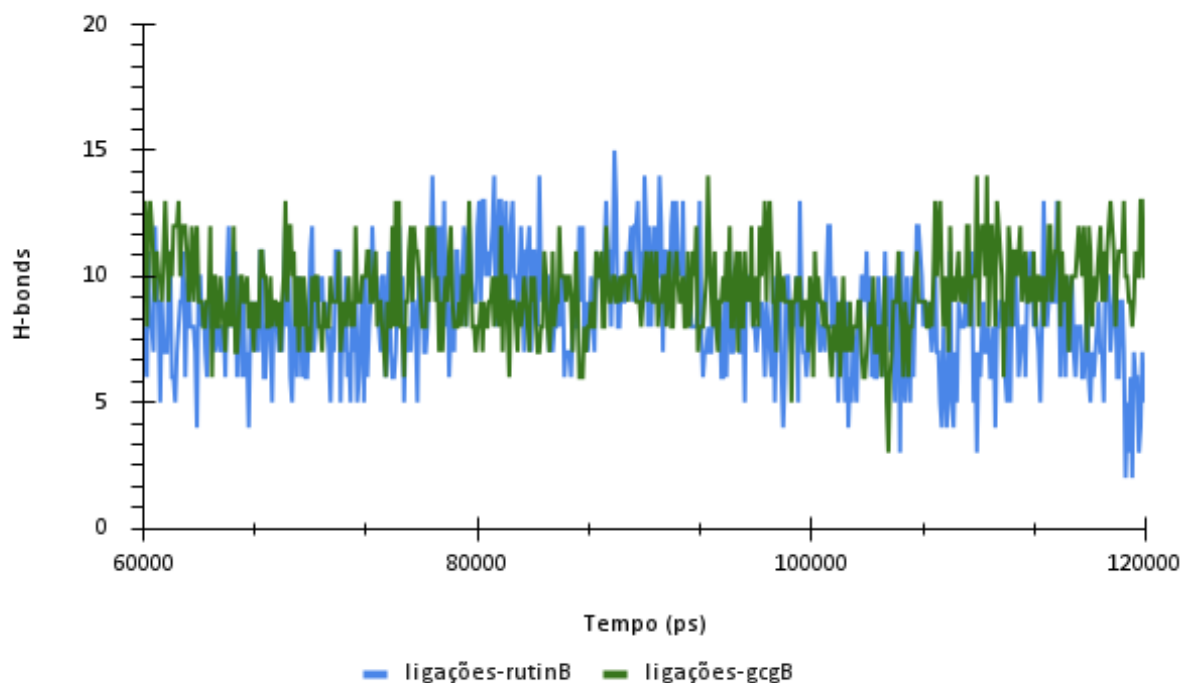
Fonte: Autoria Própria.

As simulações de DM oferecem informações sobre interações não-covalentes que ocorrem no sistema biológico. Dentre elas, as interações por ligação hidrogênio possuem um papel fundamental para a estabilização estrutural dos sítios de interação (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018) e por isso estas foram avaliadas. Os sítios

estáveis são fundamentais para o planejamento de fármacos pois o processo de reconhecimento molecular fármaco-receptor também sofre influência desta interação (SNEHA, P.; DOSS, 2016).

Durante toda a fase produtiva da DM ($\Delta t = 60$ ns) a rotina complexada realizou $9 \pm 1,6$ ligações hidrogênio, enquanto o complexo holo $8 \pm 2,2$ (Figura 9). A fim de avaliar a relevância destas interações, correlacionamos estes resultados com o número de doadores/aceptores de ambos os complexos. Para o substrato natural (GCG) temos um total de 11 doadores e 13 aceptores resultando na possibilidade de realizar até 24 ligações hidrogênio. A partir deste dado, podemos calcular seu potencial de interagir por ligação hidrogênio (Hbondcap.)- conforme definido por Silva e colaboradores (2020), que resulta num valor de 33,3% (8/24) indicando que o GCG possuiria 66,7% das interações a serem realizadas. Para a rotina, que apresenta 10 doadores e 16 aceptores ou seja 26 grupos, seu Hbondcap é de 34,6% (9/26). Desta forma, a rotina interage mais com a LaTR do que o GCG pelas suas ligações hidrogênio, fato importante num inibidor competitivo.

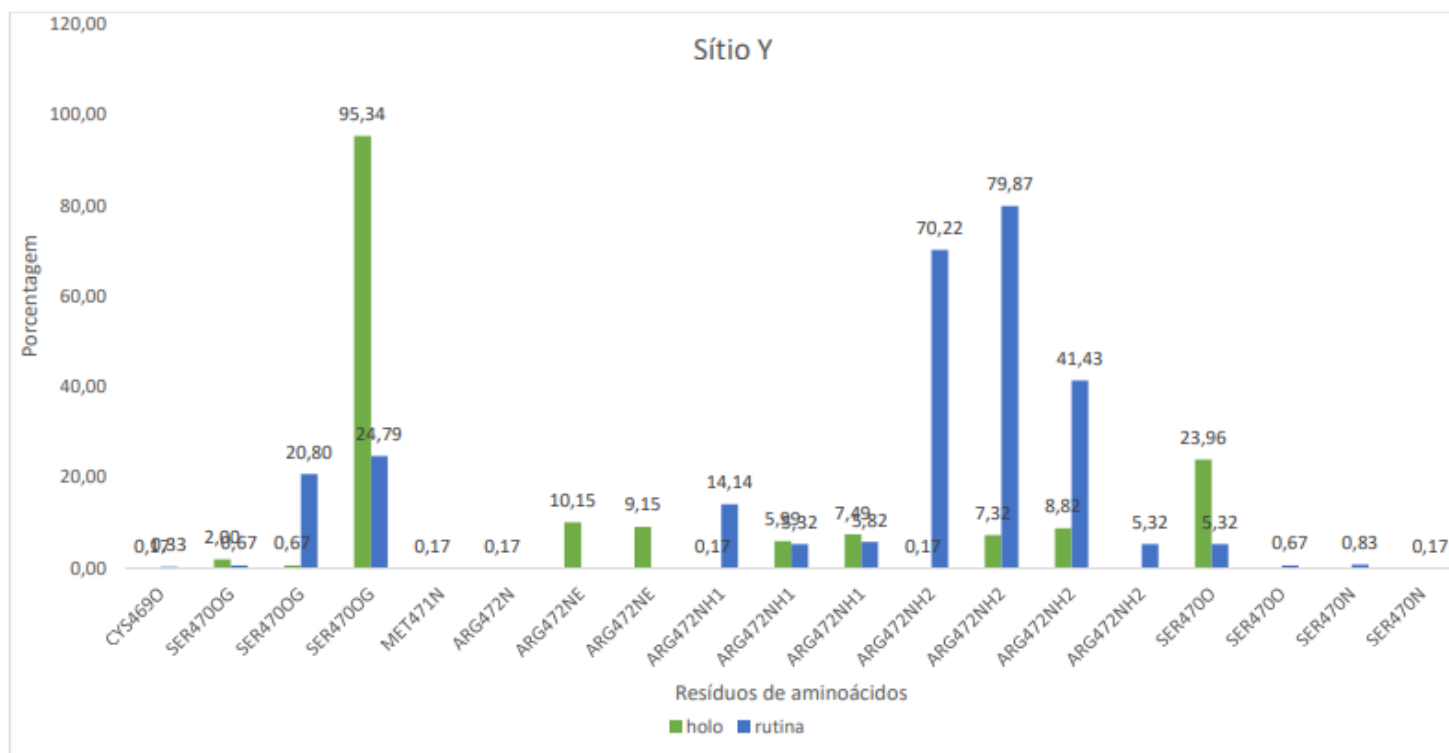
Figura 9- Número de interações por ligação hidrogênio durante a fase produtiva da DM ($\Delta t = 60$ ns) nos complexos LaTR holo e rutina. Esta análise empregou o módulo *H-bond* (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2006) no GROMACS-2021.3 (VAN DER SPOEL, *et al.*, 2005).



Fonte: Autoria Própria.

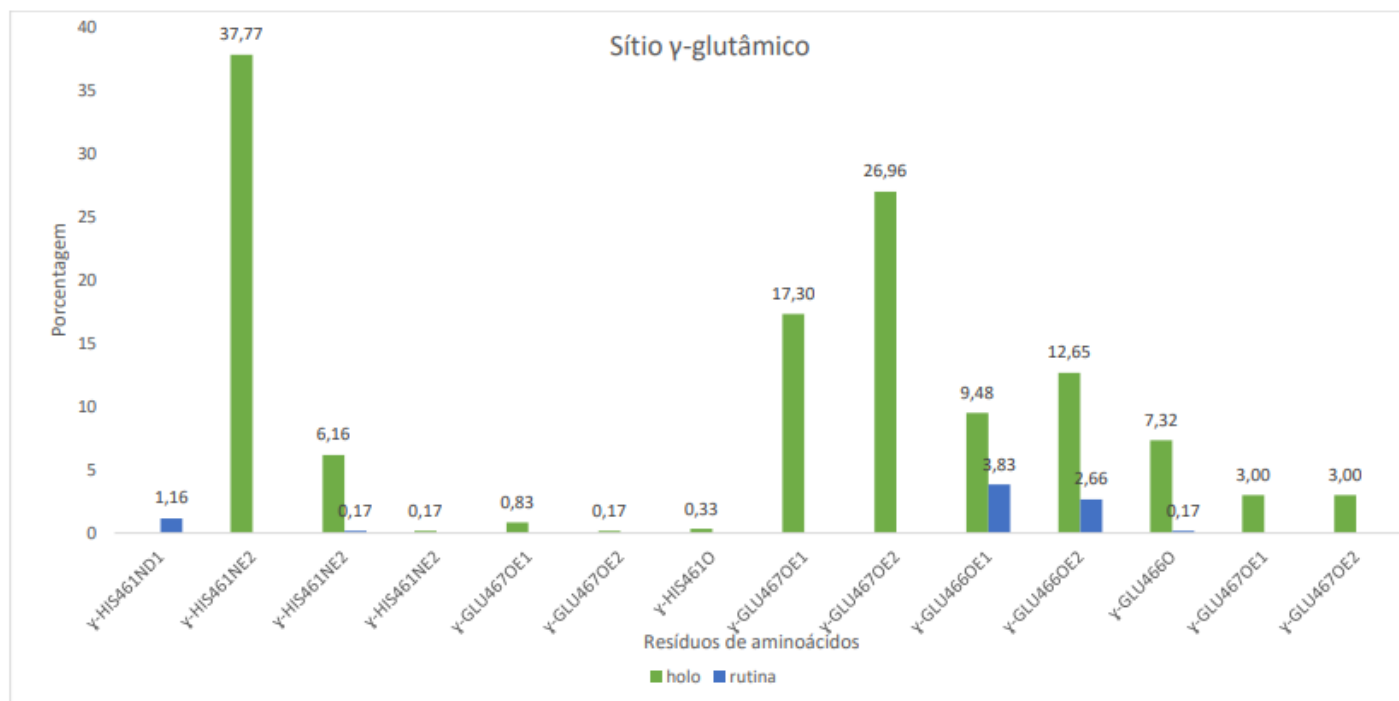
Esses dados isolados não refletem a eficiência da rutina como inibidor da TR, principalmente pelo fato dessas ligações serem lábeis e transientes. Por esse motivo, a análise da estabilidade/permanência destas foi realizada pelo *software* HbMap2Grace (GOMES, *et al.*, 2009) que calcula tanto as interações ocorridas entre os ligantes e os aminoácidos da LaTR nos seus subsítios durante a fase produtiva, quanto a porcentagem de tempo em que essas ligações se mantiveram (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Permanência das ligações hidrogênio durante a fase produtiva da DM ($\Delta t = 60$ ns) nos complexos *LaTR* holo e rotina no sítio Y. Esta análise empregou o *HbMap2Grace* (GOMES, *et al.*, 2009).



Fonte: Autoria Própria.

Figura 11– Permanência das ligações hidrogênio durante a fase produtiva da DM ($\Delta t = 60$ ns) nos complexos LaTR holo e rutina no sítio γ -glutâmico. Esta análise empregou o *HbMap2Grace* (GOMES, *et al.*, 2009).



Fonte: Autoria Própria.

A partir dessa análise podemos perceber que a rutina interage com os resíduos do sítio γ -glutâmico especialmente a HIS461 (resíduo catalítico essencial da TR) mesmo num período curto de tempo (Figura 10). Esta interação é importante pois mimetiza a mesma interação existente com o resíduo γ -Glu do substrato natural (TS₂) (BAILEY *et al.*, 1993; BOND *et al.*, 1999; PITA; PASCUTI 2011; PAIXÃO; PITA, 2019).

Por fim, destacamos a interação com os resíduos do sítio Y: CYS469, ARG472, SER470, MET471 e GGG. Comparando os dados (Figura 11) podemos perceber que a rutina e o substrato natural interagiram com o resíduo CYS469 durante 0,33 e 0,17 % da fase produtiva da DM, tendo a rutina uma interação mais duradoura. A ARG472 destaca-se por sua alta permanência no complexo com a rutina (79,87; 70,22 e 41,43%, figura 11) frente a 10,15% no complexo holo. Em relação a SER470, a rutina manteve sua interação por 72,05% do tempo frente a 95,34% para holo. Por fim,

apenas o GCG (holo) interage com a MET471 (0,17%) durante a fase produtiva. Todos estes dados indicam que a rutina apresenta interações mais estáveis com os aminoácidos neste sítio em comparação com o GCG reforçando seu papel como um possível inibidor competitivo para o tratamento das leishmanioses, por exemplo.

5.4 Escolha do composto para testes *in vitro*

A rutina, também chamada de vitamina P, é um bioflavonoide hidrossolúvel bastante estudado e que demonstra uma imensa gama de atividades biológicas, das quais podemos citar as atividades: antioxidante, anticonvulsivante, analgésica, antiartrítica, vasoprotetora, anticancerígena, neuroprotetora, cardioprotetora, antibacteriana, antifúngica, antimalárica e antiviral (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). Estudos recentes relacionam a rutina em nano formulações ao abrandamento de doenças pulmonares, a exemplo de: asma, fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar e câncer pulmonar (PAUDEL *et al.*, 2022).

Além disso, este composto foi testado, por diversas metodologias *in silico* e *in vitro*, com sucesso frente a *L. donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Velho Mundo (AL-HALBOSIY, *et al.*, 2020; CHAUHAN *et al.*, 2018; KANT *et al.*, 2022), inclusive frente a TR de *L. donovani* (MEHWISH *et al.*, 2021). Chauhan e colaboradores (2018) demonstraram que a rutina induziu a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO), moléculas com ação leishmanicida, no baço de animais infectados com cepas de *L. donovani* resistentes ao antimônio, indicando sua capacidade de favorecer o hospedeiro frente a infecção. Mehwish e colaboradores (2021), demonstraram que a rutina aumentou a produção de óxido nítrico causando apoptose nos parasitos tratados. Além disso, eles comprovaram a supressão da TR de *L. donovani*, por ensaio de PCR em tempo real. Assim há a possibilidade de a rutina ser um possível inibidor da TR, uma vez que a sua inibição causaria um aumento na expressão dessas moléculas.

Em contrapartida, outros autores demonstraram que a rutina não apresenta atividade contra *Leishmania major* (MAHMOUD *et al.*, 2022), espécie responsável por causar a leishmaniose tegumentar no Velho Mundo (FIROOZ *et al.*, 2021). Diante do exposto e do fato de que não há relatos na literatura sobre a atividade desse composto

isolado frente a *La* e a fim de validar os resultados obtidos nos ensaios *in silico*, procedemos com os testes de avaliação antiparasitária *in vitro*.

5.5 Citotoxicidade e atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*

A rutina demonstrou ser atóxica frente a macrófagos murinos J774, bem como frente a macrófagos humanos THP-1, com valor de $CC_{50} > 100 \mu M$ para ambas as linhagens celulares (Tabela 3). Estes dados corroboram com o trabalho de Kant e colaboradores (2022), no qual foi observado que a rutina não é tóxica mesmo em uma concentração de $819,00 \mu M$ para a linhagem celular THP-1. O fármaco de referência para a leishmaniose tegumentar, a anfotericina B, apresentou valor de $CC_{50} = 3,3 \mu M$ para macrófagos murinos, demonstrando elevada citotoxicidade. O fato de a rutina não ser citotóxica seria um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de novos tratamentos para essa DTN, porém, assim como já observado para *L. major* (MAHMOUD *et al.*, 2022), a rutina não demonstrou atividade frente a promastigotas de *La* (Tabela 3).

Tabela 3 - Citotoxicidade e atividade anti- *L. amazonensis* da rutina.

	MΦ J774	MΦ THP-1	<i>L. amazonensis</i> (Promastigotas)
Compostos	$CC_{50} \pm DP (\mu M)$	$CC_{50} \pm DP (\mu M)$	$IC_{50} \pm DP (\mu M)$
Rutina	> 100	> 100	> 50
Anfotericina B	$3,3 \pm 0,49$	-	$0,03 \pm 0,006$
Violeta de Genciana	$0,7 \pm 0,09$	$0,296 \pm 0,127$	

Fonte: Autoria própria

A partir da análise de todos esses dados e à luz da literatura, os nossos resultados apontam para a hipótese de que a rutina é inativa frente a espécies causadoras da forma tegumentar e ativa frente às espécies causadoras da leishmaniose na sua forma visceral. Para confirmar essa hipótese será necessária a realização de mais testes. Tendo em vista seu provável potencial frente a *Leishmania* sp., modificações estruturais em sua molécula são uma alternativa para tentar alcançar a atividade frente a espécies causadoras da leishmaniose cutânea.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram aplicados diversos métodos *in silico*, com posteriores etapas de validação e confirmação mediante revisão bibliográfica de resultados semelhantes encontrados para o mesmo sistema em estudo. A Triagem Virtual do banco de 579 moléculas permitiu a identificação das moléculas 5 mais promissoras potencialmente capazes de inibir Tripanotona Redutase de *Leishmania amazonensis*. Estes dados culminaram na seleção de um composto altamente promissor contra a *Leishmania sp.* (rutina) já testado em diversos ensaios utilizando outras espécies de *Leishmania* e escolhido para a avaliação experimental. Pelos ensaios realizados, a rutina não demonstrou atividade frente a *L. amazonensis*, objeto de estudo desse trabalho. Sendo assim, as informações aqui obtidas poderão subsidiar futuros testes laboratoriais em outras condições experimentais, esperando assim, contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M.J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J.C.; HESS, B.; LINDAHL, E. **GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers**. *SoftwareX*. v.1–2, p. 19–25, 2015.
- AKBARI, M., ORYAN, A., & HATAM, G. **Immunotherapy in treatment of leishmaniasis**. *Immunology letters*, v.233, p.80–86, 2021.
- AL-HALBOSIY, M.; ALI, H. Z.; HASSAN, G. M.; GHAFARIFAR, F. **Artemisinin efficacy against old world *Leishmania donovani*: in vitro and ex vivo study**. *Annals of parasitology*. v.63, n.3, p. 295–302, 2020.
- ALTAMURA, F., RAJESH, R., CATTAPRETA, C., MORETTI, N. S., & CESTARI, I. **The current drug discovery landscape for trypanosomiasis and leishmaniasis: Challenges and strategies to identify drug targets**. *Drug development research*, v.83, n.2, p.225–252, 2022.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search tool**. *Journal of Molecular Biology*. v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P.; DAVID, H. M. **Chemotherapy in the treatment and control of Leishmaniasis**. *Advances in Parasitology*. p. 223–274, 2006.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D. A.; RIVERO-ZAMBRANO, L.; MARTÍNEZ-JUÁREZ, L. A.; GARCÍA-RODRÍGUEZ-ARANA, R. **Overcoming the global burden of neglected tropical diseases**. *Therapeutic advances in infectious disease*. v.7, 2020.
- ANDRADE, B. L. A. **A produção do conhecimento em doenças negligenciadas no Brasil: uma análise bioética dos dispositivos normativos e da atuação dos Pesquisadores brasileiros**. Tese (Doutorado em Bioética) - Universidade de Brasília. Brasília, p.22. 2015.
- BAILEY, S., SMITH, K., FAIRLAMB, A.H., HUNTER, W.N. **Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution**. *Eur. J. Biochem*. n.213, v. 1, p. 67–75, 1993.
- BAIOCCO, P.; COLOTTI, G.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A. **Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis**. *Journal of medicinal chemistry*. v.52, n. 8, p. 2603–2612, 2009.
- BAIOCCO, P.; POCE, G.; ALFONSO, S.; COCOZZA, M.; PORRETTA, G.C.; COLOTTI, G.; BIAVA, M.; MORACA, F.; BOTTA, M.; YARDLEY, V.; FIORILLO, A.; LANTELLA, A.; MALATESTA, F.; ILARI, A. **Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: a comparative analysis**

with its physiological substrate by X-ray crystallography. ChemMedChem. v.8 n.7 p.1175-83, 2013.

BALLANTE, F., KOOISTRA, A. J., KAMPEN, S., DE GRAAF, C., & CARLSSON, J. **Structure-Based Virtual Screening for Ligands of G Protein-Coupled Receptors: What Can Molecular Docking Do for You?.** *Pharmacological reviews*, v.73, n.4, p.527–565, 2021.

BALLESTER, P.J. **Machine Learning for Molecular Modeling in Drug Design.** Biomoléculas. v.9, p.216, 2019.

BARRATT, G.; BRETAGNE, S. **Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification.** *The International Journal of Nanomedicine*, p. 301. 2007.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. **Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura.** *Rev. Virtual Quim.*,8 (6), 2072-2104. 2016.

BATTISTA, T.; COLOTTI, G.; ILARI, A.; FIORILLO, A. **Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis.** *Molecules (Basel, Switzerland)*, v.25, n.8, p.1924, 2020.

BEIG, M.; OELLIEN, F.; GAROFF, L.; NOACK, S.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; SELZER, P.M. **Trypanothione reductase: a target protein for a combined *in vitro* and *in silico* screening approach.** PLoS Negl Trop Dis. v. 9, n. 6, 2015.

BENKERT, P., BIASINI, M., SCHWEDE, T. **Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models.** Bioinformatics. v.27, p.343-350, 2011.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. **The Missing Term in Effective Pair Potentials.** J. Phys. Chem. v.91, p.6269–6271, 1987.

BERENDSEN, H.J.C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. **GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation.** Comput. Phys. Commun. v.91, p. 43–56, 1995.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. . **The Protein Data Bank.** Nucleic Acids Research, v. 28, p. 235-242, 2000.

BERNARDES FILHO, F., QUEIROZ, R. M., & NERY, B. **American Tegumentary Leishmaniasis.** *The Journal of emergency medicine*, v.54, n.5, p.692–693, 2018.

BERNDT, C.; LILLIG, C. **Glutathione, Glutaredoxins, and Iron.** Antioxid Redox Signal. 2017

BEUGNET, F.; HALOS, L.; GUILLOT, J. **Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats.** Servet editorial - Grupo Asís Biomedica, S.L, 2018.

BHADRA, P.; HELMS, V. **Molecular Modeling of Signal Peptide Recognition by Eukaryotic Sec Complexes**. International journal of molecular sciences. v. 22 n.19, 2021.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; GALLO CASSARINO, T.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. **SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information**. Nucleic acids research, v. 42, p. 252–8, 2014.

BITAR, M; FRANCO, G. R. **A Basic Protein Comparative ThreeDimensional Modeling Methodological Workfl ow Theory and Practice**. Ieee/acm Transactions On Computational Biology And Bioinformatics, [s.l.], v. 11, n. 6, p.1052-1065, 1 nov. 2014.

BITENCOURT-FERREIRA G., DE AZEVEDO W.F. **Homology Modeling of Protein Targets with MODELLER**. In: de Azevedo Jr. W. (eds) **Docking Screens for Drug Discovery**. Methods in Molecular Biology, vol 2053. Humana, 2019.

BOCEDI, A.; DAWOOD, K. F.; FABRINI, R.; FEDERICI G.; GRADONI, L.; PEDERSEN, J. Z.; RICCI G. **Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites**. The FASEB Journal. v.24, n.4, p.1035-1042, 2010.

BOND, C.S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; HUNTER, W.N. **Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors**. Structure 7. v. 1, p. 81–89, 1999.

BONI, Mariana. **Leishmaniose: estudo de combinação de Fase III**. DNDi, Rio de Janeiro, 13 de setembro de 2019. Disponível em: <<https://www.dndial.org/2019/comunicacao-e-informacao/leishmaniose-estudo-de-combinacao-de-fase-iii/>> Acesso em: 30 de maio de 2021.

BOWIE JU, LÜTHY R, EISENBERG D. **A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure**. Science, 1991.

BRAGA, S. F.; ALVES, É. V.; FERREIRA, R. S.; FRADICO, J. R.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; RIBEIRO, T. G.; JÚNIOR, P. A.; ROMANHA, A. J.; TONINI, M. L.; STEINDEL, M.; COELHO, E. F.; DE OLIVEIRA, R. B. **Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones**. European journal of medicinal chemistry, v.71, p.282–289, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**. Santa Catarina, 13 p. 2018. Disponível em <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/ManualLTAvizualiza%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 30 de maio de 2021.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; DE KONING, H. P. **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** *Trends in Parasitology*. v. 19, p. 232, 2013.

BRYK, T.; HAYMET, A. D. J. **The Ice/Water Interface: Density Temperature Phase Diagram for the SPC/E Model of Liquid Water.** *Mol. Simul.* v.30, p.131–135, 2004.

BURLEY, S. K.; BHIKADIYA, C.; BI C.; BITTRICH, S.; CHEN, L.; CRICLOW, G. V.; CHRISTIE, C. H.; DALENBERG, K.; DI COSTANZO, L.; DUARTE, J. M.; DUTTA, S.; FENG, Z.; GANESAN, S.; GOODSSELL, D. S.; GHOSH, S.; GREEN, R. K.; GURANOVIĆ, V.; GUZENKO, D.; HUDSON, B. P.; LAWSON, C. L.; ZHURAVLEVA, M. **RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences.** *Nucleic acids research*, v. 49, p. D437–D451, 2021.

BURROWS, J. N. **High Concentration Screening: Integrated Lead Generation.** **Oral Presentation at the Society for Medicines Research.** *Trends in Drug Discovery*, 2004.

CAMARGO L.M.A; BARCINSKI M.A. **Leishmanioses, feridas bravas e kalazar.** *Ciência e Cultura*. v. 1, p.34-7, 2003.

CAPRILES, P. V. Z. **Técnicas de bioinformática e modelagem computacional aplicadas ao estudo do genoma de *Trypanosoma cruzi* e de enzimas consideradas de interesse no tratamento da doença de chagas: estudo particular das cruzipainas 1 e 2.** 153 p. Dissertação (Mestrado). Laboratório Nacional de Computação Científica, 2007.

CHAN, C.; YIN H.; GARFORTH J., MCKIE J.H., JAOUHARI R., SPEERS P, DOUGLAS, K. T., ROCK, P. J., YARDLEY, V., CROFT, S. L., & FAIRLAMB, A. H. **Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs.** *J MedChem.* v.41, p.148–156, 1998.

CHAUHAN, K.; KAUR, G.; KAUR, S. **Activity of rutin, a potent flavonoid against SSG-sensitive and -resistant *Leishmania donovani* parasites in experimental leishmaniasis.** *International Immunopharmacology*. v. 64, p. 372-385, 2018.

CHAWLA, B.; JHINGRAN, A.; PANIGRAHI, A.; STUART, K.D.; MADHUBALA, R. **Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin susceptible resistant *Leishmania donovani*.** *PLoS One*. v.6, n.10. 2011.

CHOUDHUR, S. **Additional Bioinformatic Analyses Involving Protein Sequences. Bioinformatics for Beginners**, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124104716000086>>. Acesso em: 30 de maio de 2021.

COBO, F. **Imported Infectious Diseases: The Impact in Developed Countries.** Elsevier, Cambridge, United Kingdom, 2014.

COELHO, A.C.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M.; COTRIM, P.C. **Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes.** Antimicrob Agents Chemother. v.51, p.3030–2. 2007.

COJEAN, S.; HOUZÉ, S.; HAOUCHINE, D.; HUTEAU, F.; LARIVEN, S.; HUBERT, V.; MATHERON, S. **Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker.** Emerg Infect Dis. v.18, n.4, p.704-706. 2012.

COLOVOS, C.; YEATES, T.O. **Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions.** Protein Sci. v.2, p.1511–9, 1993.

COTRINA, F. J.; INIESTA, V.; MONROY, I.; BAZ, V.; HUGNET, C.; MARAÑÓN, F.; ALONSO, C. **A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend against canine leishmaniosis.** Vaccine. v.36, p.1972–1982, 2018.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.** Trends in Parasitology. V.19, p. 502. 2003.

CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H. **Trypanothione reductase from Leishmania donovani. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials.** Eur. J. Biochem. v. 230, p. 460–468, 1995.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. **Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems.** J. Chem. Phys. v.98, p. 10089, 1993.

DE OLIVEIRA, B. C.; DUTHIE, M. S.; PEREIRA, V. R. A. **Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis.** Human Vaccines & Immunotherapeutics. v.16, n.4, p.919-930, 2020)

DELANO, W. L. **Pymol: An open-source molecular graphics tool.** CCP4 Newsletter On Protein Crystallography. v.40, p.82-92, 2002.

DORLO, T.P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; DE VRIES, P.J. **Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis.** J. Antimicrob. Chemother. v.67, n.11, p.2576-2597. 2012.

DUKHYIL AAAB. **Targeting Trypanothione Reductase of Leishmanial major to Fight Against Cutaneous Leishmaniasis.** Infect Disord Drug Targets. vV. 19, n.4, p. 388-393, 2019.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. **VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles.** Methods in Enzymology, v. 277, p. 396–404, 1997.

ESWAR, N; MARTI-RENOM, M. A.; WEBB, B.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.; PIEPER, U.; SALI, A. **Comparative protein structure modeling using MODELLER**. Current Protocols in Protein Science, 2007.

FAIRLAMB, A.H; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI, A. **Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids**. Science. v.227, p.1485-7, 2005.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. **Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida**. Annual Review of Microbiology. v.46, p. 696-729, 1992.

FANGUEIRO, J. F.; MARQUES, I. R.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; SOUTO, E. B. **Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis**. *Química Nova*. v. 35, n. 9, p. 1848-1853. 2012.

FERREIRA C.; ESTAQUIER, J.; SILVESTRE, R. **Immune-metabolic interactions between Leishmania and macrophage host**. Current Opinion in Microbiology. v. 63, p. 231-237, 2021.

FIGUEIREDO, K. A.; FIGUEIREDO, J. F. S.; COSTA, R. K. M.; ALVES, M. M. M.; MAGALHÃES, J. L.; CARVALHO, A. L. M.; LIMA, F. C. A. **Prospecção de Alvos Bioquímicos para Estudo *in silico* na Quimioterapia Antileishmania**. Rev. Virtual Quim. v.10, n.5, p.1485-1501, 2018.

FIROOZ, A.; MORTAZAVI, H.; KHAMESIPOUR, A.; GHIASI, M.; ABEDINI, R.; BALIGHI, K.; ESMAILI, N.; NASSIRI-KASHANI, M.; ESKANDARI, S. E.; MOHEBALI, M.; MIR AMIN MOHAMMADI, A.; DOWLATI, Y. **Old world cutaneous leishmaniasis in Iran: clinical variants and treatments**. The Journal of dermatological treatment. v. 32, n. 7, p. 673–683, 2021.

FLOHÉ, L. **The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases**. Biotechnology Advances. v.30, p.294-301, 2012.

FONSECA, M. S. **Análise funcional de enzimas da via de síntese e redução da tripanotona em *leishmania spp***. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Pesquisas René Rachou. Minas Gerais, p.53. 2017.

FORLI, S; HUEY, R; PIQUE, ME; SANNER, MF; GOODSSELL, DS; OLSON, AJ. **Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite**. Nature Protocols, v.11, n.5, p.905-919, 2016.

FREITAS-JUNIOR, L.H.; CHATELAIN, E.; KIM, H.A.; SIQUEIRA-NETO J.L. **VISCERAL leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?**. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. v.2, p.11-19. 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. **Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs**. Molecules. v.14, p.2317, 2009.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; & MAGNANI, M. **Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis**. *Parasites & vectors*. v.11, n.1, p. 273, 2018.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A.K. **The pharmacological potential of Rutin**, *Saudi. Pharm. J.* v.25, n. 149–164, 2017.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. **Iterative partial equalization of orbital electronegativity- a rapid access to atomic charges**. *Tetrahedron*, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GEPPERT H, VOGT M, BAJORATH J. **Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation**. *J Chem Inf Model*. 2010.

GIRAULT, S.; DAVIOUD-CHARVET, T. E.; MAES, L.; DUBREMETZ, J. F.; DEBREU, M. A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C. **Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies**. *Bioorganic & medicinal chemistry*. v.9, n.4, p.837–846, 2001.

GOMES, D. E. B. *et al.* **HbMap2Grace, versão 1.0; Software para mapeamento de frequência de ligações de hidrogênio**. Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

GONTIJO, C. M. F.; MELO M. N. **Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. *Rev. Bras. Epidemiol.* v. 7, n 3, 2004.

GOODFORD, P. J. **A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules**. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 28, n. 7, p. 849-857, 1985.

GUEDES, C.E.S.; DIAS, B.R.S.; PETERSEN, A.L.D.O.A.; CRUZ, K.P.; ALMEIDA, N.D.J.; ANDRADE, D.R.; DE MENEZES, J.O.B.; DE MATOS BORGES, V.; VERAS, P.S.T. ***In vitro* evaluation of the anti-leishmanial activity and toxicity of PK11195**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 113, n. 4, e170345, 2018.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. **Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda**. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 2, p. 494. 2002.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. **Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery**. *Parasitology Research*. 2019.

HILEROWICZ, Y.; KOREN, A.; MASHIAH, J.; KATZ, O.; SPRECHER, E.; ARTZI, O. **Fractional ablative carbon dioxide laser followed by topical sodium stibogluconate application: A treatment option for pediatric cutaneous leishmaniasis**. *Pediatr Dermatol*. v.35, n.3, p. 366-369, 2018.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. **Molecular dynamics simulation for all.** Neuron. v. 99, n. 6, p. 1129-1143, 2018.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. **Ligand efficiency: a useful metric for lead selection.** Drug Disc. Today. v.9, p.430–43, 2004

HUANG S-Y, GRINTER S.Z, ZOU X. **Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions.** Phys Chem Chem Phys, 2010.

HUNTER, W. N.; BAILEY, S.; HABASH, J.; HARROP, S. J.; HELLIWELL, J. R.; ABOAGYE-KWARTENG, T.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H. **Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design.** Journal of molecular biology. v. 227, n. 1, p. 322–333, 1992.

ILARI, A.; FIORILLO, A.; GENOVESE, I.; COLOTTI, G. **Polyamine-trypanothione pathway: an update.** Future medicinal chemistry. v,9, n.1, p.61–77, 2017.

JACOMINI, A. P.; SILVA, M.; SILVA, R.; GONÇALVES, D. S.; VOLPATO, H.; BASSO, E. A.; PAULA, F. R.; NAKAMURA, C. V.; SARRAGIOTTO, M. H.; ROSA, F. A. **Synthesis and evaluation against Leishmania amazonensis of novel pyrazolo[3,4-d]pyridazinone-N-acylhydrazone-(bi)thiophene hybrids.** European journal of medicinal chemistry. v.124, p.340–349, 2016.

JANSON, G.; GROTTESI, A.; PIETROSANTO, M.; AUSIELLO, G.; GUARGUAGLINI, G.; PAIARDINI, A. **Revisiting the "satisfaction of spatial restraints" approach of MODELLER for protein homology modeling.** PLoS computational biology. v. 15, n. 12, 2019.

JIA, Y.; LOPEZ, I.; KOWALSKI, P. **Toxin transcripts in Crotalus atrox venom and in silico structures of toxins.** Journal of venom research. v.10, p.18–22, 2020.

KANT, V.; KUMAR, P.; RANJAN, R.; KUMAR, P.; MANDAL, D.; VIJAYAKUMAR, S. **In silico screening, molecular dynamic simulations, and in vitro activity of selected natural compounds as an inhibitor of Leishmania donovani 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.** Parasitology research. v.121, n.7, p. 2093–2109, 2022.

KARPLUS, M. **Spinach on the ceiling: a theoretical chemist's return to biology.** Annu Rev Biophys Biomol Struct. v.35, p.1–47, 2006.

KASSARDJIAN, A. A., YIM, K. M., RABI, S., LIANG, T. Z., KIM, G. H., OCHOA, M. T., SATTAH, M. V., & AHRONOWITZ, I. Z. **Diffuse cutaneous leishmaniasis and HIV co-infection: A case report and review of the literature.** Journal of cutaneous pathology, v.48, n.6, p.802–806, 2021.

KATO, K. C.; MORAIS-TEIXEIRA, E.; REIS, P. G.; SILVA-BARCELLOS, N. M.; SALAÜN, P.; CAMPOS, P. P.; CORRÊA-JUNIOR, J. D.; RABELLO, A.; DEMICHELI, C.; FRÉZARDA, F. **Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible**

Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.58, p.481, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.** Nature Reviews Microbiology, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KHAN M.O., AUSTIN S.E., CHAN C., YIN H., MARKS D., VAGHJIANIS.N, KENDRICK, H., YARDLEY, V., CROFT, S. L., & DOUGLAS, K. T.. **Use of an additional hydrophobic binding site,the Z site, in the rational drug design of a new class of stron-ger trypanothione reductase inhibitor, quaternary alkylammoniumphenothiazines.** J Med Chem. v.43, p. 3148–3156, 2000.

KHAN, F. I.; WEI, D. Q.; GU, K. R.; HASSAN, M. I.; TABREZ, S. **Current updates on computer aided protein modeling and designing.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 85, p. 48-62, 2016

KIP, A. E.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H.; DORLO, T. P. C. **Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs.** Clin Pharmacokinet. v.57, p.151–176. 2018.

KIRK E. HEVENER, MICHAEL E. JOHNSON. **Chapter Twelve - Hit-to-Lead: Hit Validation and Assessment.** Methods in Enzymology. v. 610, p. 265-309, 2018.

KLAMT. A. **COSMO-RS from quantum chemistry to fluid phase thermodynamics and drug design.** Elsevier. v.1, 2005.

KOFF A.B, ROSEN T. **Treatment of cutaneous leishmaniasis.** J Am Acad Dermatol, v. 31, p. 693-708. 1994.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BAUER, H.; SCHIRMER, R. H. **Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targetsnin trypanosomes and malaria-causing plasmodia.** Angew Chem Int Ed Engl. v.44, p.690-715, 2005.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. **Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects v. 1780, n. 11, p. 1236-1248, 2008.

KRIEGER, S.; SCHWARZ, W.; ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CLAYTON, C. **Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress.** Mol. Microbiol. v. 35, p. 542–552, 2000.

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

LANTWIN, C. B.; SCHLICHTING, I.; KABSCH, W.; PAI, E. F.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. **The structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state.** Proteins, v. 182, p. 161–173, 1994.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. **PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures.** J. App. Cryst. v.26, p.283-291, 1993.

LAVECCHIA A, DI GIOVANNI C. **Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review.** Curr Med Chem, 2013

LEICHUS, B. N.; BRADLEY, M.; NADEAU, K.; WALSH, C. T.; BLANCHARD, J. S. **Kinetic isotope effect analysis of the reaction catalyzed by Trypanosoma congolense trypanothione reductase.** Biochemistry. v.31, p.6414, 1992.

LIMA JR de. **Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente.** Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

LIN, X.; LI, X.; LIN, X. **A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design.** Molecules. v.25, n.6, p.1375, 2020.

LIÑARES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. **Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases.** Current medicinal chemistry. v. 13, n. 3, p. 335–360, 2006.

LIPINSKI, C. A. **Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.** Drug discovery today. Technologies. v.1, n.4, p.337–341.

LOSCHWITZ, J.; JÄCKERING, A.; KEUTMANN, M.; OLAGUNJU, M.; OLUBIYI, O. O.; STRODEL, B. **Dataset of AMBER force field parameters of drugs, natural products and steroids for simulations using GROMACS.** Data in brief. v.35, 2021.

LUNA, E. J. DE A.; CAMPOS, S. R. DE S. L. DA C. **O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas.** Cad. Saúde Pública. v.36, 2020.
MAIA, E., ASSIS, L. C., DE OLIVEIRA, T. A., DA SILVA, A. M., & TARANTO, A. G. **Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence.** *Frontiers in chemistry*, v.8, p.343, 2020.

MAHMOUD, A. H.; MAHMOUD, B. K.; SAMY, M. N.; FOUAD, M. A.; KAMEL, M. S.; MATSUNAMI, K. **Aureanin: a new iridoid from the leaves of *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook.f. ex S.Moore.** Natural product research. v.1 n.9, 2022.

MARINHO, F.D.A.; GONÇALVES, K.C.D.S.; OLIVEIRA, S.S.D.; OLIVEIRA, A.-C.D.S.C.; BELLIO, M.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.D.; BRANQUINHA, M. H. **Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.106, n.4, p.507-509. 2011.

MARTIN, V.; VOULDOUKIS, I.; MORENO, J.; MCGAHIE, D.; GUEGUEN, S.; CUISINIER, A. **The protective immune response produced in dogs after primary**

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR., A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACHA, J. **Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011.** Bull World Health Organ. n. 94, p. 103-110, 2016.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. **Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment.** Q J Med. v.107, p.7–14. 2014.

MEHWISH, S.; VARIKUTI, S.; ALI KHAN, M.; KHAN, T.; KHAN, I. U.; SATOSKAR, A.; ELSAYED ELSEREHY, H. A.; ULLAH, N. **Bioflavonoid-Induced Apoptosis and DNA Damage in Amastigotes and Promastigotes of *Leishmania donovani*: Deciphering the Mode of Action.** Molecules (Basel, Switzerland). v.26, n.19, p. 5843, 2021.

MEIRA, C.S.; DO ESPÍRITO SANTO, R.F., DOS SANTOS, T.B.; ORGE, I.D.; SILVA, D.K.C., GUIMARÃES, E.T.; FRANÇA, L. S. A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MOREIRA, D.R.M.; Soares, M.B.P. **Betulinic acid derivative BA5, a dual NF-kB/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity.** European journal of pharmacology, v. 815, p. 156-165, 2017.

MELI, R.; BIGGIN, P. C. **spyrmsd: symmetry-corrected RMSD calculations in Python.** Journal of cheminformatics. v.12, n.1, p.49, 2020.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. **Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos.** Rev. Virtual Quim. v. 4, n. 4, p. 374-394, 2012.

MESSAOUDI A, BELGUITH H, BEN HAMIDA J. **Homology modeling and virtual screening approaches to identify potent inhibitors of VEB-1 β -lactamase.** Theor Biol Med Model. 2013.

MONTANARI, C.A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos.** EDUSP, 2011.

MORGAT, A.; LOMBARDOT, T.; COUDERT, E.; AXELSEN, K.; NETO, T.B.; GEHANT, S.; BANSAL, P.; BOLLEMAN, J.; GASTEIGER, E.; DE CASTRO, E.; BARATIN, D.; POZZATO, M.; XENARIOS, I.; POUX, S.; REDASCHI, N.; BRIDGE, A. **Enzyme annotation in UniProtKB using Rhea.** Bioinformatics, v. 36, n. 6, p. 1896–1901, 2019.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. **Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function.** Journal of Computational Chemistry, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, GM; HUEY, R; LINDSTROM, W; SANNER, MF; BELEW, RK; GOODSSELL, DS; OLSON, AJ. **Autodock 4 and AutoDock Tools 4: automated docking with selective receptor flexibility.** Computational Chemistry. v.16, p.2785-91, 2009.

MUHAMMED, M. T.; & AKI-YALCIN, E. **Homology Modeling in Drug Discovery: Overview, Current Applications and Future Perspectives**. Chemical Biology & Drug Design. v.93, n.1, p.12-20, 2019.

MYSINGER, M.M.; CARCHIA, M.; IRWIN J.J.; SHOICHET, K. **Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking**. J. Med. Chem. v. 55, n. 14, p. 6582-6594, 2012.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; MOLTENI, V. **Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis**. Chemical Reviews. v.114, p.11305, 2014.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. **Dinâmica Molecular: Teórica e Aplicações em planejamento de Fármacos**. Eclética Química. v.33, n.4, p. 13-24, 2008.

NAVASCONI, T. R.; REIS, V. N.; FREITAS, C. F.; PEREIRA, P. C. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; LONARDONI, M. V. C.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V. **Photodynamic Therapy With Bengal Rose and Derivatives Against *Leishmania amazonensis***. J Lasers Med Sci. v.8, p.46-50, 2017.

NISSINK J.W. **Simple size-independent measure of ligand efficiency**. J Chem Inf Model. 2009.

NO, J. H. **Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries**. Acta Trop. v.155, p.113-123. 2016.

NUNES, R. K.. **Clonagem e expressão da enzima Tripanotona Redutase de *Leishmania braziliensis* e atividade leishmanicida de chalconas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p.13. 2011.

OLIVEIRA, L. F. G.; BENJAMIN, G.; VILLAS BÔAS, G. K. **Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos**. Revista Fitos, v. 8, n. 1, p. 33-42, 2013.

OLIVEIRA, N.; PIRES, I.; MACHUQUEIRO, M. **Improved GROMOS 54A7 Charge Sets for Phosphorylated Tyr, Ser, and Thr to Deal with pH-Dependent Binding Phenomena**. Journal of chemical theory and computation, v.16, n.10, p. 6368–6376, 2020.

OLSSON, M. H.; SØNDERGAARD, C. R.; ROSTKOWSKI, M.; JENSEN, J. H. **PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions**. Journal of chemical theory and computation, v.7, n.2, p.525–537, 2011.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. Núm. 9, 2020. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>>.

OPREA, T. I.; DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; LEESON, P. D. J. **Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective**. Chem. Inf. Comput. Sci. v.41, p.1308–1315, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Integrating neglected tropical diseases into global health and development**. Organização Mundial da Saúde, 2017.

PAIXÃO, V. G.; PITA, S. S. R. **In silico identification and evaluation of new *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TcTR) inhibitors obtained from natural products database of the Bahia semi-arid region (NatProDB)**. Computational Biology and Chemistry. v.79, p.36–47, 2019.

PAQUET, E.; VIKTOR, H.L. **Molecular dynamics, Monte Carlo simulations, and langevin dynamics: a computational review**. Biomed Res Int. v. 2015, 2015.

PARIS, C.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. **Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes**. Antimicrob. Agents Chemother. v.48, n.3, p.852-859, 2004.

PATEL, H.; KUKOL, A. **Integrating molecular modelling methods to advance influenza A virus drug discovery**. Drug discovery today. v.26, n.2, p. 503–510, 2021.

PAUDEL, K. R.; DUA, K.; PANTH, N.; HANSBRO, P. M.; CHELLAPPAN, D. K. **Advances in research with rutin-loaded nanoformulations in mitigating lung diseases**. Future medicinal chemistry. v.14, n.18, p.1293–1295, 2022.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. **Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações**. Quím. Nova. v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PINTO, J. N. **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES EM *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* – ESTUDO in vitro**. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, p.28. 2016.

PINZI, L.; RASTELLI, G. **Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery**. International journal of molecular sciences, v.20, n.18, p.4331, 2019.

PIROLI, D.; SCIANDRA, F.; BOZZI, M.; GIARDINA, B.; BRANCACCIO, A.; DE ROSA, M. C. **Insights from molecular dynamics simulations: structural basis for the V567D mutation-induced instability of zebrafish alpha-dystroglycan and comparison with the murine model**. PLoS One, v. 9, n. 7, p. e103866, 2014.

PITA, S. S. R.; PASCUTI, P. G. **Alvos terapêuticos na doença de Chagas: a tripanotione redutase como foco**. Rev. virtual Quim. v. 3, n. 4, p. 307-324, 2011.

PITA, S. S. DA R.; BATISTA, P. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; PASCUTTI, P. G. **Molecular Dynamics Simulations of Peptide Inhibitors Complexed With Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase.** Chemical Biology & Drug Design. v.80, p.561, 2012.

POL-FACHIN, L.; RUSU, V.H.; VERLI, H.; LINS, R.D. **GROMOS 53A6GLYC, an improved GROMOS force-field for hexopyranose-based carbohydrates.** J Chem Theory Comput. v.8, p.4681–4690, 2012.

POPOVA, M.; ISAYEV, O.; TROPSHA, A. **Deep reinforcement learning for de novo drug design.** Sci. Adv. v.4, 2018.

PRADHAN, S., SCHWARTZ, R. A., PATIL, A., GRABBE, S., & GOLDUST, M. **Treatment options for leishmaniasis.** *Clinical and experimental dermatology*, v.47, n.3, p.516–521, 2022.

QINGLIANG, L.; SHAH, S. **Structure-Based Virtual Screening.** Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). v.1558, p.111–124, 2017

RAMACHANDRAN, G.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. **Stereochemistry of polypeptide chain configurations.** Journal Of Molecular Biology, [s.l.], v. 7, n. 1, p.95-99, 1963.

REGUERA, R.M.; ELMAHALLAWY, E.K.; GARCÍA-ESTRADA, C.; CARBAJO-

ANDRÉS, R.; BALAÑA-FOUCE, R. **DNA Topoisomerases of Leishmania Parasites; Druggable Targets for Drug Discovery.** Curr Med Chem.V. 26, n.32, p. 5900-5923. 2019.

REIS, D. B.; ALBUERQUE, T. S.; SOARES, M. R. **A. As leishmanioses e o livro didático: como as doenças endêmicas são abordadas no ensino público?** Investigações em Ensino de Ciências (IENCI) v. 19, n. 1, 2014.

RIJAL, S.; OSTYN, B.; URANW, S.; RAI, K.; BHATTARAI, N. R.; DORLO, T. P. C.; BEIJNEN, J. H.; VANAERSCHOT, M.; DECUYPERE, S.; DHAKAL, S. S.; LAL DAS, M.; KARKI, P.; SINGH, R.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J-C. **Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance.** Clinical Infectious Diseases, v.56, n.11, p.1530–1538. 2013.

RODRIGUES, K. A.; DIAS, C. N.; NÉRIS, P. L.; ROCHA, J.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; DE MEDEIROS, I. A.; KEESEN, T.; DE OLIVEIRA, T. B.; DE LIMA, M.; BALLIANO, T. L.; DE AQUINO, T. M.; DE MOURA, R. O.; MENDONÇA JUNIOR, F. J.; DE OLIVEIRA, M. R. **2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*.** European journal of medicinal chemistry. v.106, p.1–14, 2015.

RODRIGUES, G. S.; AVELINO, J. A.; SIQUEIRA, A. L. N.; RAMOS, L. F. P.; DOS SANTOS, G. B. **O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos.** Quim. Nova, v. 44, n. 8, p.1036-1044, 2021.

RYDZEWSKI, J.; NOWAK, W. **A redução da dimensionalidade baseada no aprendizado de máquina facilita a avaliação dos caminhos de difusão do ligante: Um caso de citocromo P450cam.** J. Chem. Theory Comput. v.12, p. 2110–2120, 2016

SAIKIA, S., BORDOLOI, M. **Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective.** *Current drug targets*, v.20, n.5, p.501–521, 2019.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. **Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints.** Journal of Molecular Biology, v. 234, p. 779-815, 1993.

SALMASO, V.; MORO, S. **Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligandprotein recognition process: an overview.** *Front Pharmacol* v. 9, p.923, 2018.

SALOMON O. D. **Lutzomyia longipalpis, Gone with the Wind and Other Variables.** *Neotropical entomology*, v.50, n.2, p.161–171, 2021.

SAMPAIO R.N.R.; TAKANO G.H.; MALACARNE A.C.; PEREIRA T.R.; de Magalhaes A.V. **In vivo Terbinafine inefficacy on cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis in C57BL/6 mice.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2003.

SAMPAIO, R., FERREIRA, M. F., MARTINS, S. S., & MOTTA, J. **Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania amazonensis.** *Anais brasileiros de dermatologia*, v.96, n.5, p.602–604, 2021.

SANTANA, W.; DE OLIVEIRA, S.; RAMOS, M. H.; SANTOS, A.; DOLABELLA, S. S.; SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; JAIN, S. **Exploring Innovative Leishmaniasis Treatment: Drug Targets from Pre-Clinical to Clinical Findings.** *Chemistry & biodiversity*, v.18, n.9, 2021.

SATYAJIT, S. D.; NAHARA, L.; MIRONB, A.; GUOC, M. **Chapter Two - Anticancer natural products.** *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. V. 55, p. 45-75, 2020.

SCHNEIDER, G.; CLARK, D.E. **Projeto de medicamento de novo automatizado: já estamos quase lá?** *Angew. Chem.* v.131, p.10906–10917, 2019.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESTRE, J. L. **Efficacy of second line drugs on antimonylresistant amastigotes of Leishmania infantum.** *Acta Tropica*. v. 74, p. 25. 2000.

SESAB. **Boletim Epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar no Estado da Bahia.** 2020. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp->

content/uploads/2017/11/boletimEpidimiologicoLeishmanioseTegumentarOut2020.pdf>.

SESAB. Boletim Epidemiológico: **Leishmaniose Tegumentar no Estado da Bahia**. 2021. Disponível em: < <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimEpidimiologicoLeishmanioseTegumentarAbri2022.pdf>>.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. **Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences**. In: Multiple sequence alignment methods. Humana Press, Totowa, NJ, p. 105-116, 2014.

SILVA, R.C.; FREITAS, H.F.; CAMPOS, J.M.; KIMANI, N.M.; SILVA, C.H.T.P.; BORGES, R.S.; PITA, S.S.R.; SANTOS, C.B.R. **Natural ProductsBased Drug Design against SARS-CoV-2 Mpro 3CLpro**. Int. J. Mol. Sci. v. 22, p. 11739, 2021.

SILVEIRA, F. T., LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. **Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian brazil - a review**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 2, p. 239 – 251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C.M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. **Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis**. Parasite Immunology, v. 31, p. 423 – 431, 2009.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. **Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets**. Asian Pac. J. Trop. Med., v.5, n.6, p.485-489. 2012.

SINGH, N.; MISHRA, B.B.; BAJPAI, S.; SINGH, R.K.; TIWARI V.K. **Natural product based leads to fight against leishmaniasis**. Bioorg. Med. Chem. v. 22, n.1, p.18-45. 2014.

SINGH, O. P.; SINGH, B.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. (2016). **Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective**. Infect. Dis. Poverty, 2016.

SINGH, S.; SINGH, V. K. **Molecular Dynamics Simulation: Methods and Application**. Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics. p. 213–238, 2020.

SMITH, L.G.; ZHAO, J.; MATHEWS, D.H.; TURNER, D.H. **Physics-based all-atom modeling of RNA energetics and structure**. Wiley Interdiscip Rev. v. 8 n.5, 2017.

SNEHA, P.; DOSS, C. G. P. **Molecular dynamics: new frontier in personalized medicine**. Advances in protein chemistry and structural biology. v. 102, p. 181-224, 2016.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. **Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes.** Braz. J. Pharm. Sci. 2004.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. **Recentes avanços na quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos.** RBCF, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SONKAR, A.; SHUKLA, H.; SHUKLA, R.; KALITA, J.; TRIPATHI, T. **Unfolding of *Acinetobacter baumannii* MurA proceeds through a metastable intermediate: a combined spectroscopic and computational investigation.** Int J Biol Macromol .v. 126, p. 941–951, 2019.

SØNDERGAARD, C. R.; OLSSON, M. H.; ROSTKOWSKI, M.; JENSEN, J. H. **Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values.** Journal of chemical theory and computation. v.7, n.7, p.2284–2295, 2021.

STROET, M.; CARON, B.; VISSCHER, K.; GEERKE, D.; MALDE, A.K.; MARK, A. E. **Automated Topology Builder version 3.0: Prediction of solvation free enthalpies in water and hexane.** J. Chem. Theory Comput. v.14, n.11, p. 5834-5845, 2018.

SUN, C.H.; WENG, S.C.; WU, J.H.; TUNG, S.Y.; SU, L.H.; LIN, M.H.; LEE, G.A. **DNA topoisomerase III β promotes cyst generation by inducing cyst wall protein gene expression in *Giardia lamblia*.** Open Biol. v.10, n.2. 2020.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. **Visceral leishmaniasis current therapeutic modalities.** The Indian Journal of Medical Research. v. 123, p. 345, 2006.

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. **Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India.** Bulletin of the World Health Organization. v. 83, p. 394, 2005.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. **Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management.** Therapeutics and Clinical Risk Management. v.3, p.733, 2007..

SUV/DIVE/GEZOO-SC. **Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA),** 2018.

TAKARADA, G. G. M. **Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade de extratos de Berberis e do cloridrato de berberina para o tratamento das FAIRLAMB BERMAN leishmanioses.** Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D.; OPREA, T. ANGEW. **The design of leadlike combinatorial libraries** Chem. Int. Ed. Engl. v.38, p.3743–3748, 1999.

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K.; SINGH, S. P.; SINGH, R. K. **Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural**

Products in Control of Leishmaniasis. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. v. 18, n. 1. 2018.

TIWARI, N.; TANWAR, N.; MUNDE, M. **Molecular insights into trypanothione reductase-inhibitor interaction: A structure-based review.** Archiv Der Pharmazie, v.351, n.6, 2018.

TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M.L.; SMITH, A.C.; CROFT, S.L.; FAIRLAMB, A.H. **Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: Effect on parasite intracellular survival.** Proc. Natl. Acad. Sci. v. 95, p. 5311–5316, 1998.

TOVAR, J.; WILKINSON, S.; MOTTRAM, J. C.; FAIRLAMB, A. H. **Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the *tryA* gene locus.** Molecular Microbiology. v.29, n. 2, p.653–660, 1998.

TRIGGLE, D., TAYLOR, J. **Comprehensive Medicinal Chemistry II** Volume 4: Computer-Assisted Drug Design. 2006.

TURCANO, L.; BATTISTA, T.; DE HARO, E. T.; MISSINEO, A.; ALLI, C.; PAONESSA, G.; COLOTTI G.; HARPER, S.; FIORILLO, A.; ILARI, A.; BRESCIANI, A. **Spiro-containing derivatives show antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei* through inhibition of the trypanothione reductase enzyme.** PLoS neglected tropical diseases, v.14, n.5, 2020.

UETRECHT, J. **Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future.** Chemical Research in Toxicology. v.21, n.1, p.84–92, 2008.

UETRECHT, J. **Prediction of a new drug's potential to cause idiosyncratic reactions.** Current Opinion in Drug Discovery & Development. v.4 n.1, p.55–9, 2001.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. **GROMACS: fast, flexible, and free.** Journal of computational chemistry. v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005

VAN DER SPOEL, D.; VAN MAAREN, P.J.; LARSSON, P.; TÎMNEANU, N. **Thermodynamics of Hydrogen Bonding in Hydrophilic and Hydrophobic Media.** J. Phys. Chem. B. v. 110, p. 4393–4398, 2006.

VANOMMESLAEGHE, K.; GUVENCH, O. **Molecular mechanics.** Curr Pharm Des. v. 20, p. 3281–3292, 2014.

VASCONCELOS, J. M.; GOMES, C. G.; SOUSA, A.; TEIXEIRA, A. B.; LIMA, J. M. **Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento.** RBAC. v.50, n.3, p.221-7. 2018.

VENKATESAN, S.K.; SAUDAGAR, P.; SHUKLA, A.K; DUBEY, V. K. **Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents.** Interdiscip Sci Comput Life v.3, p.217, 2011.

VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. São Paulo: Sbbq, 2014. p.152.

VIANNA, G. **Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético**. An 7º Congr Bras Med Cirurg. v.4, p.426–428. 1912.

WATTS, K.S.; DALAL, P.; TEBBEN, A.J.; CHENEY, D.L.; SHELLEY, J.C. **Macrocycle conformational sampling with MacroModel**. J Chem Inf Model. v.54, p. 2680–2696, 2014.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J; ProSA-web: **Interactive web servisse for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins**. Nucleic Acid Res. v.35, p.407–10, 2007.

YOUNG, J.; KIMA, P.E. **The Leishmania parasitophorous vacuole membrane at the parasite-host interface**. Yale J. Biol. Med. v.92, n.3, p.511-521, 2019.

ZACHARIAS, J.; KNAPP, E-W. **Protein secondary structure classification revisited: processing DSSP information with PSSC**. Journal of chemical information and modeling, v. 54, n. 7, p. 2166-2179, 2014.

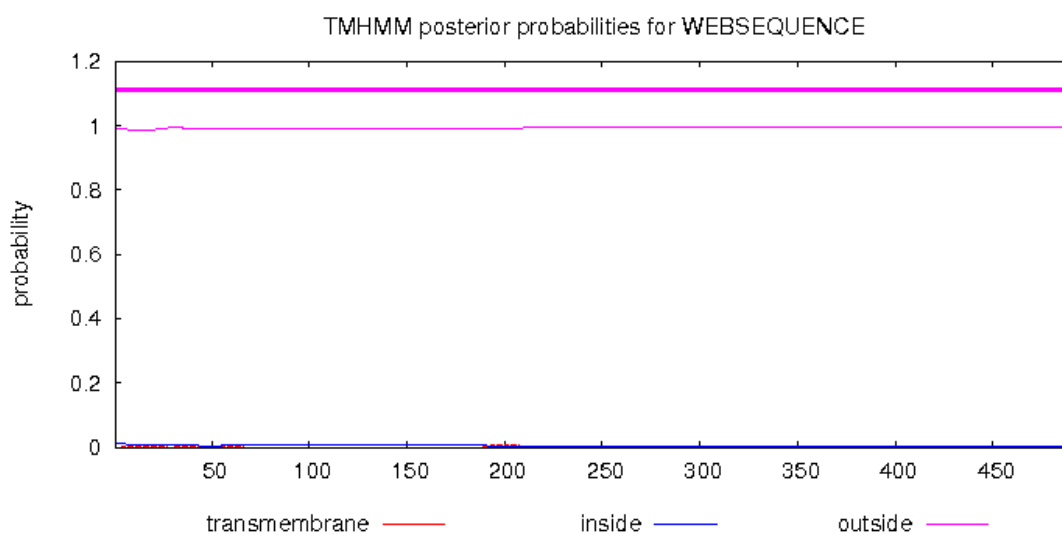
ZHANG, Y.; BOND, C. S.; BAILEY, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. **The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen Trypanosoma cruzi at 2.3 Å resolution**. Protein science : a publication of the Protein Society. v. 5, n. 1, p. 52–61, 1996.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. **Leishmaniasis drug discovery: recente progress and challenges in assay development**. Drug DiscovToday. p.4, 2017.

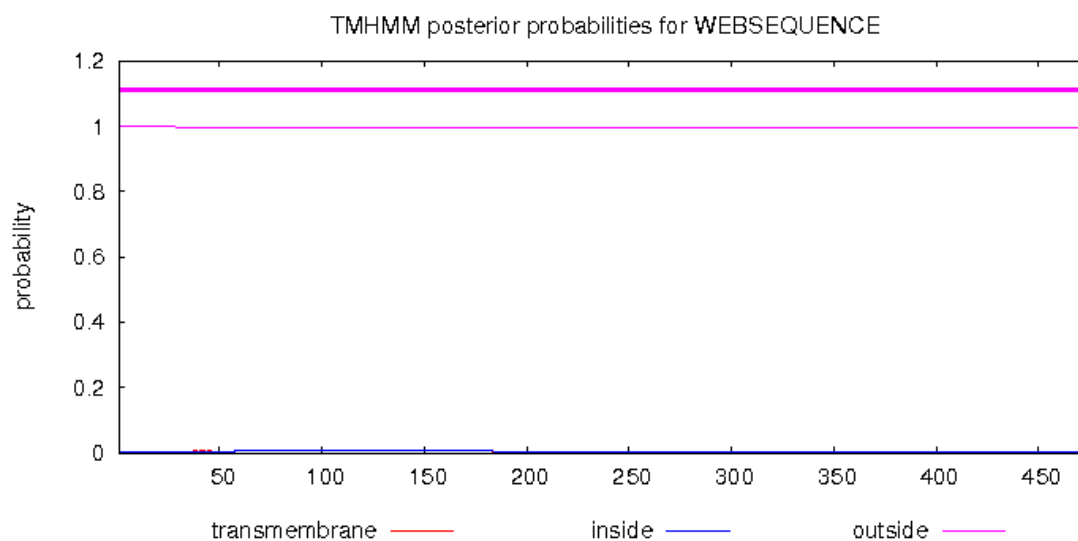
ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1 - Predição de regiões transmembranares (TMHMM) e Verificação da inexistência de peptídeo sinal (SignalP-5.0), para as sequências código UNIPROT A5JV95 e Q0GU43, respectivamente

```
# WEBSEQUENCE Length: 491
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.32293
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.21373
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.01146
WEBSEQUENCE    TMHMM2.0    outside    1  491
```

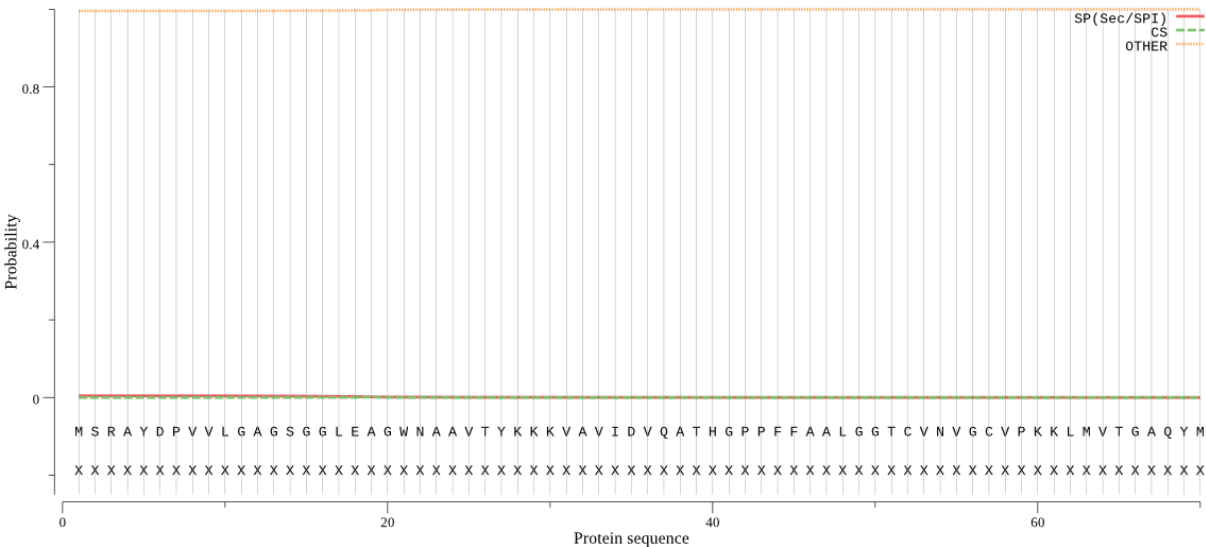


```
# WEBSEQUENCE Length: 476
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.14917
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.11075
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00083
WEBSEQUENCE    TMHMM2.0    outside    1  476
```



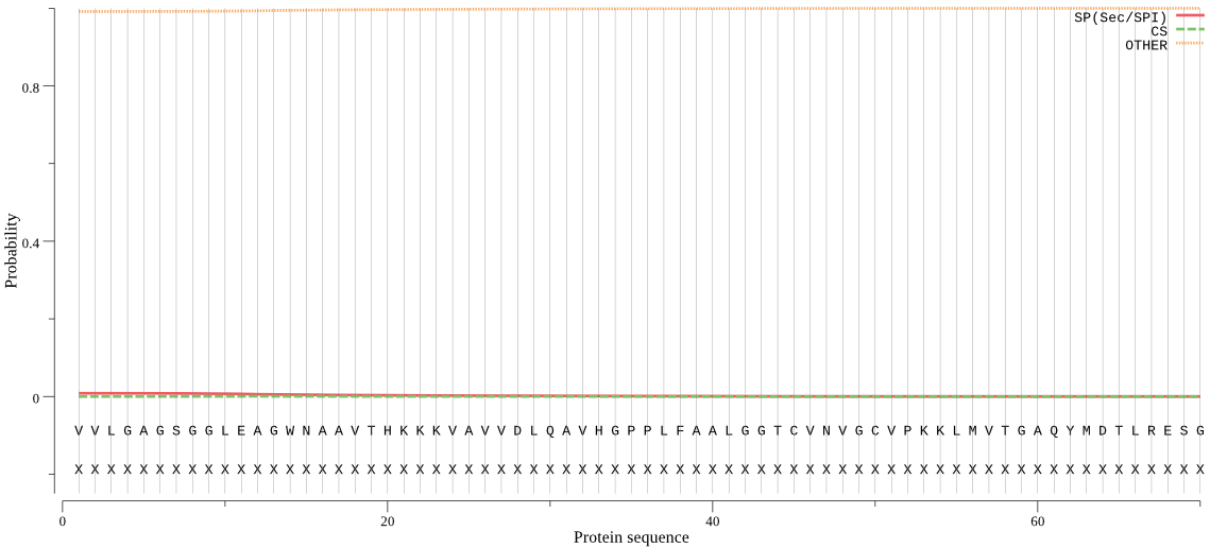
Protein type	Signal Peptide (Sec/SPI)	Other
Likelihood	0.0044	0.9956

SignalP-5.0 prediction (Eukarya): Sequence

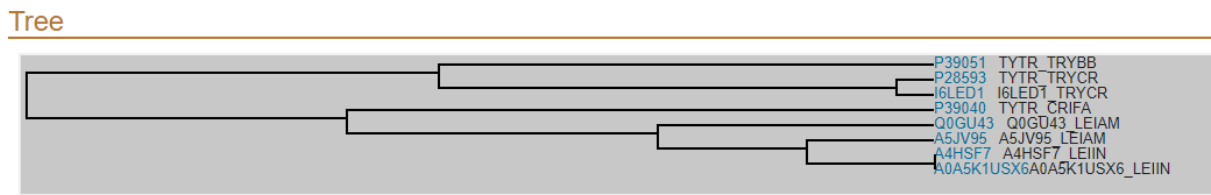


Protein type	Signal Peptide (Sec/SPI)	Other
Likelihood	0.0082	0.9918

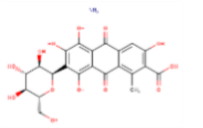
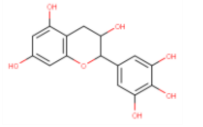
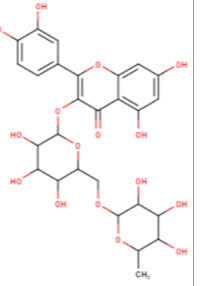
SignalP-5.0 prediction (Eukarya): Sequence

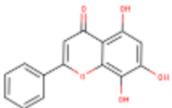
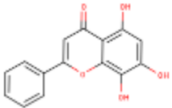
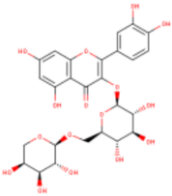
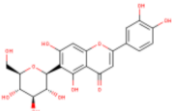
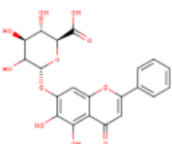


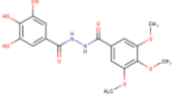
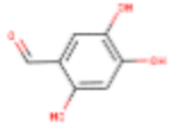
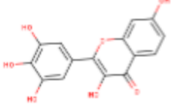
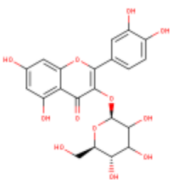
Anexo 2 - Dendograma para as proteínas que apresentaram mais de 80% de identidade sequencial

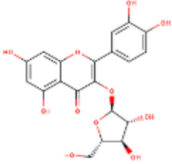
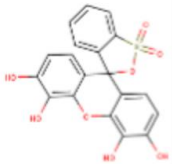
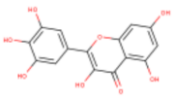
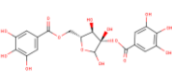
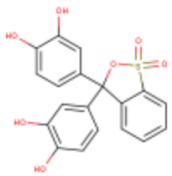


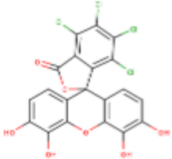
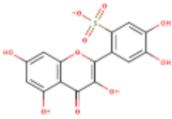
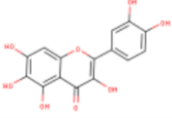
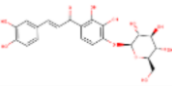
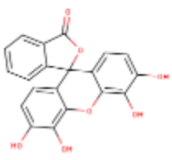
Anexo 3 - Resultados da Triagem Virtual dos catecóis frente a LaTR

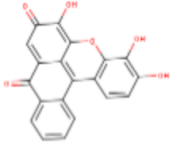
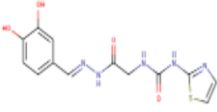
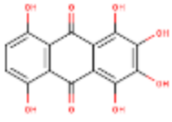
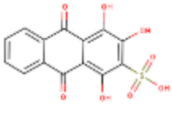
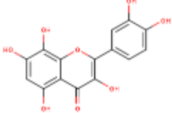
MFCD	ENERGIA (ΔG_{bind})	NOME DE SÉRIE	ESTRUTURA 2D	pKa	logP	Molecular Weight (g/mol)	Número de Átomos Pesados (N)	Ki [nM]	pKi	LE	BEI	LLE	LELP	SILE
MFCD0005 0527	-13.16	CARMINATE AMMONIUM		2.22	1.07	509.42	35	0.22537	9.65	0.28	0.02	8.58	3.88	3.32
MFCD0007 5939	-12.78	(-)- EPIGALLOCA TECHIN		8.73	1.49	470.47	33	0.43213	9.36	0.28	0.02	7.87	5.25	3.28
MFCD0006 6625	-12.67	MAYBRIDGE NBR 00332		6.37	-0.87	610.52	43	0.51511	9.29	0.22	0.02	10.16	-4.03	3.01

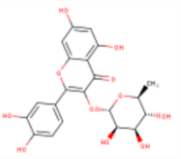
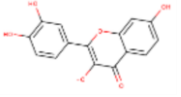
MFCD0001 6946	-12.58	5,7,8- TRIHYDROXY FLAVONE		6.79	2.71	270.24	20	0.59982	9.22	0.46	0.03	6.51	5.88	3.75
MFCD0000 6830	-12.55	RUTIN		6.37	-0.87	610.52	43	0.63555	9.20	0.21	0.02	10.07	-4.07	2.98
MFCD0001 7654	-12.50	PELTATOSID E		6.37	-1.29	596.49	43	0.68984	9.16	0.21	0.02	10.45	-6.05	2.96
MFCD0001 7433	-12.49	HOMOORIENT IN		6.14	-0.35	448.38	32	0.70348	9.15	0.29	0.02	9.50	-1.22	3.24
MFCD0001 7735	-12.48	BAICALIN		3.15	0.76	446.36	32	0.71314	9.15	0.29	0.02	8.39	2.66	3.23

MFCD0003 4313	-12.47	1(3,4,5- trihydroxyben zoyl)-2-(3,4,5- trimethoxyben zeno)		7.92	0.70	378.33	27	0.72665	9.14	0.34	0.02	8.44	2.07	3.40
MFCD0001 6933	-12.31	HYPERIN		6.37	-0.14	464.38	33	0.94370	9.03	0.27	0.02	9.17	-0.51	3.16
MFCD0001 6783	-12.09	5- HYDROXYFIS ETIN		6.31	1.51	302.24	22	1.38	8.86	0.40	0.03	7.35	3.75	3.51
MFCD0001 7746	-11.94	ISOQUERCITR IN		6.37	-0.14	464.38	33	1.77	8.75	0.27	0.02	8.89	-0.53	3.07

MFCD0001 6749	-11.93	AVICULARIN		6.37	0.49	434.35	31	1.81	8.74	0.28	0.02	8.25	1.74	3.12
MFCD0000 6046	-11.90	PYROGALLOL RED		8.10	3.03	400.36	28	1.88	8.73	0.31	0.02	5.70	9.72	3.21
MFCD0000 6827	-11.79	MYRICETIN		6.37	1.85	318.24	23	2.27	8.64	0.38	0.03	6.79	4.92	3.37
MFCD0001 7418	-11.68	HAMAMELITA NNIN		7.78	0.68	470.34	33	2.74	8.56	0.26	0.02	7.88	2.62	3.00
MFCD0000 5868	-11.65	PYROCATEC HOL VIOLET		8.88	3.50	386.38	27	2.87	8.54	0.32	0.02	5.04	11.06	3.18

MFCD0002 2269	-11.55	4'5'- dihydroxy- 4,5,6,7- tetrachloroflu orescein		8.10	5.69	502.09	31	3.42	8.47	0.27	0.02	2.78	20.84	3.02
MFCD0005 9895	-11.53	QUERCETINS ULFONIC ACID		-2.69	1.34	382.30	26	3.51	8.45	0.33	0.02	7.11	4.12	3.18
MFCD0001 7428	-11.49	QUERCETAG ETIN		6.56	1.85	318.24	23	3.81	8.42	0.37	0.03	6.57	5.05	3.29
MFCD0001 7496	-11.47	MAREIN		7.32	0.75	450.39	32	3.92	8.41	0.26	0.02	7.66	2.85	2.97
MFCD0004 1839	-11.38	GALLEIN		8.10	3.27	364.31	27	4.57	8.34	0.31	0.02	5.07	10.59	3.10

MFCD0004 6951	-11.25	COERULEIN		7.32	2.02	346.29	26	5.70	8.24	0.32	0.02	6.22	6.37	3.10
MFCD0003 0456	-11.14	2-[3-(2-thiazolyl)ureid o]acetic acid n2- dihydroxyben zoyl		9.00	0.65	335.34	23	6.83	8.17	0.36	0.02	7.52	1.83	3.19
MFCD0004 5361	-11.11	ALIZARIN CYANIN		6.84	3.70	304.21	22	7.18	8.14	0.37	0.03	4.44	10.00	3.22
MFCD0004 5368	-11.07	PURPURIN SULFONATE		-2.89	3.79	336.27	23	7.70	8.11	0.35	0.02	4.32	10.74	3.17
MFCD0001 7680	-11.06	GOSSYPETIN		6.59	1.85	318.24	23	7.75	8.11	0.35	0.03	6.26	5.25	3.17

MFCD0001 6932	-11.05	QUERCITRIN		6.37	0.90	448.38	32	7.98	8.10	0.25	0.02	7.20	3.56	2.86
MFCD0000 6829	-11.01	Fisetin		6.32	1.81	286.24	21	8.57	8.07	0.38	0.03	6.26	4.71	3.24

Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa

Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review

Tratamiento de leishmaniasis, limitaciones de la terapéutica actual y la necesidad de nuevas alternativas: Una revisión narrativa

Recebido: 26/05/2021 | Revisado: 04/06/2021 | Aceito: 08/06/2021 | Publicado: 22/06/2021

Alexandre Silva Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7335-960X>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: alesantiago@live.com

Samuel Silva da Rocha Pita

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4053-8721>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: samuelpita@gmail.com

Elisvalva Teixeira Guimarães

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9274-2957>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: etguimaraes@uneb.br

Resumo

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Suas principais formas clínicas são a tegumentar (LT) e a visceral (LV). Atualmente a terapêutica contra a leishmaniose baseia-se na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Estes compostos apresentam limitações que dificultam a adesão do paciente ao tratamento como: a elevada toxicidade e a necessidade de administração prolongada por via parenteral, além da possível seleção de cepas resistentes. Assim, utilizando a revisão narrativa de literatura, buscou-se elucidar um panorama do tratamento atual da leishmaniose, seus mecanismos de ação elucidados, sua toxicidade atribuída, seus efeitos adversos e vias de administração. Para tanto, os dados mais atualizados disponíveis na literatura foram trazidos para facilitar o acesso às informações sobre as opções terapêuticas, além das novas alternativas terapêuticas e perspectivas de vacinas contra esta doença negligenciada.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas; *Leishmania*; Tratamento farmacológico; Mecanismos moleculares de ação farmacológica.

Abstract

Leishmaniasis groups some neglected diseases caused by intracellular protozoa *Leishmania*. Its main clinical forms are the tegumentary (LT) and Visceral (LV). Currently, the therapy against leishmaniasis is based on the use of five drugs: the pentavalent antimonials, amphotericin B and its liposomal formulation, miltefosine, paromomycin and pentamidine. These compounds present limitations that difficult patient's adherence to treatment, such as high toxicity and the need for prolonged parenteral administration, in addition to the selection of resistant strains. Thus, employing the literature narrative review, we brought a panorama of the current leishmaniasis treatment, its elucidated action mechanisms, attributed toxicity, adverse effects and administration routes. Aiming to point this, the more updated data available in the literature were brought to facilitate access information on therapeutic options, in addition to new therapeutic alternatives and vaccine perspectives against this neglected disease.

Keywords: Neglected diseases; *Leishmania*; Pharmacological treatment; Molecular mechanisms of pharmacological action.

Resumen

Leishmaniasis es un grupo de enfermedades desatendidas causadas por protozoarios intracelulares del género *Leishmania*. Sus principales formas clínicas son tegumentario (LT) y visceral (LV). Actualmente, la terapéutica contra leishmaniosis es basada en la utilización de cinco fármacos: los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y su formulación liposomal, la miltefosina, la paromomicina y la pentamidina. Estos compuestos presentan limitaciones que dificultan la adherencia del paciente al tratamiento como: la elevada toxicidad y la necesidad de administración prolongada por vía parenteral, así como una posible selección de cepas resistentes. Así, utilizando la revisión narrativa

de literatura, se busca aclarar un panorama del tratamiento actual de la leishmaniasis, sus mecanismos de acción elucidados, su toxicidad, sus efectos adversos y vías de administración. Para tanto, se traen los datos más actuales disponibles en la literatura para facilitar el acceso a las informaciones sobre las opciones terapéuticas, y también de las nuevas alternativas terapéuticas y perspectivas de vacunas contra esta enfermedad desatendida.

Palabras clave: Enfermedades desatendidas; *Leishmania*; Tratamiento farmacológico; Mecanismos moleculares de acción farmacológica.

1. Introdução

As leishmanioses constituem um grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida*, *Trypanosomatidae*), que se apresentam sob duas formas principais: a amastigota e a promastigota (Vasconcelos, et al., 2018). A infecção tem início quando a forma infectante (promastigota) entra em contato com o tecido do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do mosquito flebotômico fêmea infectado (Ueno & Wilson, 2012). A apresentação clínica da doença é dependente da espécie do parasito envolvido na infecção, sendo as principais formas clínicas a tegumentar (LT) e a visceral (LV), considerada mais grave devido ao seu quadro clínico, que pode levar o paciente ao óbito. A LT pode ser subdividida em: cutânea (LC), a mucosa (LM), cutânea difusa (LCD) e sua forma disseminada (LD) (Kevric, et al., 2015; Vasconcelos, et al., 2018).

Dados da Organização Pan-americana de Saúde informam que no continente Americano entre 2001-2018 foram registrados 63.331 novos casos de leishmaniose visceral e 989.096 casos de leishmaniose tegumentar (cutânea e mucosa). Do total de casos de 2018, 84% de leishmaniose tegumentar e 97% leishmaniose visceral foram registrados pelo Brasil. É importante salientar que pacientes com LV podem apresentar hepatoesplenomegalia devido a proliferação progressiva de parasitos em macrófagos no fígado, baço e medula óssea, podendo chegar ao quadro de supressão medular. Caso não sejam tratados, poderão desenvolver pancitopenia e imunossupressão, sendo propensos a infecções concomitantes por outros microrganismos (McGwire & Satoskar, 2014). No Brasil, uma das formas mais graves da leishmaniose tegumentar é a LCD, que devido a imunossupressão celular específica induzida pelo parasito, apresenta um difícil controle da infecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, resultando no caráter evolutivo crônico e tratamento dificultado (Silveira, 2009).

Atualmente, a terapêutica contra a leishmaniose baseia-se na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Com exceção dos compostos antimoniais, todos os outros medicamentos não foram desenvolvidos inicialmente com ação leishmanicida. Além disso estão associados a deficiências graves como toxicidade, administração prolongada e possível surgimento de resistência por parte do parasito (Tiwari, et al., 2018). Tendo em vista a gravidade da doença e os problemas apresentados pela terapêutica atual, esta revisão tem como objetivo elucidar um panorama sobre o tratamento atual da leishmaniose, seus mecanismos de ação elucidados, toxicidade atribuída, efeitos adversos e vias de administração; compilando dados atualizados disponíveis em literatura para facilitar o acesso às informações sobre as opções terapêuticas, além das novas alternativas terapêuticas e perspectivas de vacinas contra esta doença negligenciada.

2. Metodologia

Este artigo trata-se de uma revisão narrativa de literatura, sendo assim, constituída por uma análise ampla da literatura, apropriada para descrever e discutir o desenvolvimento ou o "estado da arte" de um determinado assunto, sem estabelecer uma metodologia rigorosa e replicável em nível de reprodução de dados (Rother, 2007; Vosgerau & Romanowski, 2014).

3. Resultados e Discussão

3.1 Terapia Atual

A terapia medicamentosa para todas as formas de leishmaniose visa a garantia da adesão ao tratamento, o alívio dos sintomas e do desconforto causado pela doença, a administração com segurança dos medicamentos indicados, o controle e/ou a minimização da ocorrência de efeitos adversos (Brasil, 2018). No entanto, todos os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento desta enfermidade mostram-se insatisfatórios em termos de eficácia, custo, facilidade de administração e/ou segurança (McGwire & Satoskar, 2014; Murray, 2010; Hendrickx, et al., 2019).

Além disso, os antimoniais, por exemplo, aliado à longa duração do tratamento através de injeções, podem apresentar o inconveniente da dor local, por conta da via de administração intramuscular (IM), necessitando assim da alternância dos locais de aplicação, preferindo-se a região glútea. A anfotericina B, pertencente à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), não apresenta boas propriedades físico-químicas. Sua solubilidade em água é limitada, apresenta baixa permeabilidade em membranas, elevado peso molecular e presença de muitos grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (Barratt & Bretagne, 2007; Fangueiro, et al., 2012). Por isso, a anfotericina B é fracamente absorvida e possui baixa biodisponibilidade oral, sendo obrigatoriamente administrada por via intravenosa (IV), demandando hospitalização do paciente, o que limita o seu uso em países pobres e em desenvolvimento (Croft & Coombs, 2003; Bastos, et al., 2016).

A miltefosina, único fármaco de administração por via oral, pode ocasionar distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal que levam o paciente à interrupção prematura do tratamento, o que corrobora para o aumento dos casos de resistência do parasito (Guerin, et al., 2002; Sundar, et al., 2005). Quanto à paromomicina, a necessidade de administração parenteral representa uma dificuldade para a sua adoção em países pobres e em desenvolvimento (Bastos, et al., 2016). A pentamidina apresenta como um dos efeitos secundários irreversíveis, o diabetes mellitus insulino dependente. Além disso, casos de resistência à pentamidina também têm sido descritos em literatura, como pode ser observado em mais detalhes na tabela 1 (Sundar, et al., 2006; Bray, et al., 2013).

3.2 Os Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais trivalentes (Sb^{III}) já eram usados no Brasil em 1912 como o primeiro tratamento eficaz para leishmaniose (Vianna, 1912; Hendrickx, et al., 2019), sendo posteriormente substituídos pelos pentavalentes (Sb^V) na tentativa de reduzir seus diversos efeitos secundários graves. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose (Kato, et al., 2014), os quais são administrados por via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) (Kip, et al., 2018). O antimônio pentavalente (Sb^V) é considerado um pró-fármaco, que é convertido na forma ativa trivalente (Sb^{III}) sob condições de pH baixo nos fagócitos hospedeiros (Singh, et al., 2012). Este mecanismo de ação dentro do organismo gera toxicidade tanto contra o hospedeiro quanto contra o parasito (Kato, et al., 2014). Atualmente, dois complexos de antimoniais pentavalentes estão disponíveis comercialmente: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Tiwari, et al., 2018). No Brasil, o medicamento de escolha é o Glucantime® (Serenio, et al., 2000).

O Sb^{III} induz apoptose nos parasitos através da inibição da tripanotona redutase (TR) (Tiwari, et al., 2018). A TR é uma enzima essencial e exclusiva dos parasitos da família *Trypanosomatidae*, responsável pelo metabolismo redox do tiol, sendo assim essencial para a manutenção da vida nos protozoários do gênero *Leishmania* (Beig, et al., 2015). A TR é uma flavoenzima dependente de NADPH capaz de catalisar a redução do dissulfeto de tripanotona [TS2] em ditiol tripanotona T(SH)₂ (Flohé, 2011; Krauth-Siegel, et al., 2005). Desse modo, através da TR a tripanotona é mantida reduzida (Krauth-Siegel & Comini, 2008). Sendo assim, esta enzima age como um antioxidante parasitário de defesa ao estresse oxidativo do hospedeiro (Dukhly, 2019).

O Sb^V também apresenta atividade antiparasitária através da inibição da atividade da topoisomerase (No, 2016). As topoisomerases são um grupo de enzimas responsáveis por controlar a homeostase topológica do DNA durante os processos de replicação, transcrição e condensação da cromatina; estando envolvidas diversos processos celulares, incluindo ciclo celular, proliferação e diferenciação celular (Sun, et al., 2020). Na leishmania, a enzima se encontra presente no núcleo e na única mitocôndria existente. Existem diferenças claras na estrutura e expressão entre as enzimas do parasito e do hospedeiro, demonstrando assim o grande potencial terapêutico dos inibidores topoisomerase como droga com atividade leishmanicida (Reguera, et al., 2019). Também já foi proposto como mecanismo de ação provável a inibição da adenosina trifosfato (ATP) e da guanosina trifosfato (GTP) através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise (Koff & Rosen, 1994).

O uso dos antimoniais pode ocasionar dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade. Além de todos esses inconvenientes, também é necessária a internação hospitalar para a sua aplicação por via intramuscular ou intravenosa (Hendrickx, et al., 2019).

3.3 Anfotericina B

A anfotericina B (AmpB) é um metabólito antifúngico de polieno, pouco solúvel em água e possui alta afinidade por membranas contendo esterol. O ergosterol é o principal esteroide presente nas membranas plasmáticas dos parasitos do gênero *Leishmania*, a anfotericina liga-se ao ergosterol, causando desorganização da membrana, formação de poros aquosos, alteração da permeabilidade de membrana com extravasamento de líquidos, desequilíbrio iônico e morte do parasito (Sampaio, 2003; Kip, et al., 2018; Tiwari, et al., 2018). Sua aplicação é intravenosa, o que resulta em menor adesão do paciente ao tratamento (Hendrickx, et al., 2019). A AmpB também tem a capacidade de ligar-se ao colesterol das membranas humanas, mecanismos esse responsável por uma grande fração de seus efeitos tóxicos (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009).

Dentre os efeitos adversos causados pelo uso da AmpB destacam-se a febre alta, calafrios e insuficiência renal (Freitas-Junior, 2012), além de hipocalcemia e nefrotoxicidade com limitação de dose o que dificulta seu uso na clínica (Kip, et al., 2018). A nefrotoxicidade é descrita como o principal efeito adverso associado ao uso da AmpB (Hendrickx, et al., 2019). Os efeitos adversos da AmpB foram contornados por sua formulação lipossomal (AmBisome), que também foi altamente eficaz na cura de todas as formas de infecções por leishmania (Kip, et al., 2018; Tiwari, et al., 2018). Essa formulação consiste em incorporar a AmpB numa bicamada de lipossomas, o que resulta numa redução significativa da toxicidade renal relacionada à infusão. Algumas leves reações, nefrotoxicidade transitória e trombocitopenia podem ser observadas após o seu uso. Um grande inconveniente dessa formulação é o alto custo que impossibilita seu uso por populações de baixa renda, que ironicamente são os mais afetados por esse grupo de doenças (Nagle, 2014).

3.4 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), um análogo alquilfosfocolina, originalmente desenvolvido como agente antitumoral, atualmente é o único medicamento de uso oral disponível para o tratamento da leishmaniose (Tiwari, et al., 2018). A sua atividade antitumoral tem como alvo as vias de sinalização do fosfoinositol 3-cinase-Akt/PKB para inibir o crescimento metastático das células. Em relação a sua atividade antiparasitária, nenhum modo de ação foi ainda elucidado, porém surgiram várias hipóteses, como a indução de apoptose, distúrbio das vias de sinalização celular dependente de lipídios, alteração da composição da membrana e efeitos imunomoduladores (Dorlo, et al., 2012; Paris, et al., 2014). Além disso, a miltefosina tem a capacidade de despolarizar o potencial da membrana mitocondrial e inibir a citocromo-c oxidase, o que pode estar relacionado a morte dos parasitos por apoptose (Marinho, et al., 2011).

A miltefosina também produz efeitos colaterais graves (Singh, et al., 2014). São relatadas nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade gastrointestinal grave, o que dificulta o seu emprego em mulheres grávidas e crianças (Dorlo, et al., 2012; Hendrickx, et al., 2019). Aliado aos efeitos adversos, sua aplicação está comprometida devido ao crescente aumento das taxas de falha terapêutica e ao lento, porém inevitável, surgimento de resistência do parasito ao fármaco (Cojean, et al., 2012; Rijal, et al., 2013; Hendrickx, et al., 2019).

3.5 Paromomicina

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídico, possui atividade antileishmania e antibacteriana, no entanto, este medicamento não é uma boa opção para o tratamento de pacientes com leishmaniose por conta de sua baixa absorção e administração através de injeções intramusculares (Tiwari, et al., 2018; Hendrickx, et al., 2019). Estudos informam que o mecanismo de ação da paromomicina envolve a inibição da síntese de proteínas do protozoário ligando-se à subunidade ribossômica 30S, resultando no acúmulo de complexos ribossômicos anormais 30S-50S e, finalmente, causando a morte celular (Kip, et al., 2018). Outros estudos relacionam a inibição da síntese de proteínas e a alteração no potencial da membrana mitocondrial com a morte parasitária (Chawla, et al., 2011). A paromomicina apresenta como efeitos adversos mais comuns a nefrotoxicidade, a ototoxicidade e a hepatotoxicidade (Hendrickx, et al., 2019).

3.6 Pentamidina

A pentamidina é um derivado sintético da amidina usado como terapia de segunda linha contra a leishmaniose, uso este limitado devido à baixa eficácia e a sua administração por via IM ou, preferencialmente, por administração IV (Kip, et al., 2018; Hendrickx, et al., 2019). O mecanismo de ação da pentamidina não é claro, mas a mitocôndria foi considerada um importante alvo (Coelho, et al., 2007). Sugere-se que o composto penetra nos parasitos através de transportadores de arginina e poliamina e iniba a topoisomerase mitocondrial II (Singh, et al., 2016). Estudos bioquímicos indicaram que clones de promastigotas de *Leishmania donovani* e *Leishmania amazonensis* apresentam resistência ao medicamento devido à diminuição da captação, seguido por aumento do efluxo de medicamentos (Singh, et al., 2012). Seus efeitos adversos incluem a indução de diabetes mellitus insulino-dependente, hipotensão, efeitos gastrointestinais, hipoglicemia grave, choque, miocardite, cardiotoxicidade e toxicidade renal (Kip, et al., 2018; Hendrickx, et al., 2019).

Tabela 1: Principais drogas utilizadas na clínica para tratamento das Leishmanioses.

Fármacos	Mecanismos de ação	Via de Administração	Efeitos Adversos	Referências
Antimoniais pentavalentes	Redução do Sb+5 a Sb+3 dentro do organismo; Apoptose, através da inibição da tripanotona redutase; Inibição da atividade da topoisomerase.	IM, IV	Dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e, cardiotoxicidade.	7,10,20,29.
Miltefosina	Inibição do citocromo-c oxidase através da despolarização do potencial da membrana mitocondrial, o que pode estar relacionado à morte de parasitos por apoptose.	VO	Toxicidade gastrointestinal, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade.	7,10,37,39.
Paromomicina	Inibição da síntese de proteínas do protozoário ligando-se à subunidade ribossômica 30S, resultando no acúmulo de complexos ribossômicos anormais 30S-50S, causando a morte celular.	IM ou TÓPICO	Nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade.	7,10,21.
Pentamidina	Inibição o sistema de transporte ativo; Inibição da topoisomerase mitocondrial II.	IM ou, preferencialmente IV	Cardiotoxicidade, hipotensão e efeitos gastrointestinais, bem como, indução de diabetes mellitus insulino-dependente.	7,10,22,45.

Fonte: Autores.

3.7 Novas Alternativas Terapêuticas

Apesar do recente desenvolvimento de vacina para cães, até o momento, não há uma vacina para humanos, tornando o tratamento farmacológico a única opção, já que o controle do vetor não tem se mostrado uma efetiva medida de prevenção da leishmaniose (Luna & Campos, 2020; Bastos, et al, 2006). Nos últimos anos, no Brasil, foram licenciadas duas vacinas para administração nos cães (Martin, et al., 2014; Reguera, et al., 2016; Beugnet, et al., 2018; Cotrina, et al., 2018).

A Leishmune® (Zoetis, Brasil) é uma vacina de segunda geração e foi licenciada no Brasil em 2003 para proteger os cães contra *L. donovani* (Reguera, et al., 2016; Lopes, et al., 2018). Os cães vacinados não apresentam sinais clínicos nem parasitos em amostras de pele, linfonodos e sangue (Nogueira, et al., 2005; Vulpiani, et al., 2011), o que contribui para a redução da prevalência e incidência da doença nas populações, tanto de cães quanto de seres humanos em zonas endêmicas, diminuindo o risco de transmissão da doença para os flebótomos (Palatnik-De-Sousa, et al., 2009; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Reguera, et al., 2016).

A Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal SA, Brasil) foi aprovada em 2013, sendo a primeira vacina recombinante aprovada no Brasil (Reguera, et al., 2016; Coura-Vital, et al., 2018). O estudo comparativo desenvolvido entre animais vacinados com Leishmune® e Leish-Tec®, demonstrou que não há diferença significativa na carga parasitária presente nos animais vacinados com ambas as vacinas, bem como baixas taxas de transmissão dos cães para os flebótomos em testes de xenodiagnóstico (Fernandes, et al., 2014). O que só reforça a capacidade de redução da prevalência e incidência da doença nas populações, tanto de cães quanto de seres humanos.

Mesmo com esse grande avanço na área veterinária, ainda há um longo caminho até que se produza uma vacina de uso humano contra a leishmaniose, tendo em vista que esta deve ser segura, eficaz, estável e de baixo custo. Além disso, a maior incidência da doença acontece em países em desenvolvimento, sendo, portanto, um grande desafio uma vez que são necessários grandes investimentos financeiros, de infraestrutura e em pesquisa para que esse objetivo possa ser alcançado (Silva, et al., 2013).

Apesar de nenhuma vacina humana ter atingindo o status de registro, duas vacinas humanas foram testadas em ensaios clínicos. Uma vacina de primeira geração de leishmania autoclavada foi testada em um estudo de fase II com crianças no Sudão e mostrou-se imunogênica, segura e teve conversão positiva do teste cutâneo de leishmania. Sua segurança e a imunogenicidade foram observadas em 76% dos voluntários humanos que produziram IFN- γ em resposta ao lisado do parasito (Luna & Campos, 2020; Palatnik-De-Sousa & Nico, 2020).

A segunda vacina humana testada em ensaios clínicos foi a LeishF3, que é uma vacina multicomponente e está em fase II. A vacina demonstrou uma robusta resposta imune contra leishmaniose visceral durante o ensaio de fase I com humanos saudáveis nos Estados Unidos. Além de ter sido considerada segura, também foi detectada secreção aumentada de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5 e IL-10. Em um estudo realizado em Bangladesh foi encontrada uma forte resposta de citocinas para cada componente da vacina em pacientes com leishmaniose visceral (Moafi, et al., 2019; Luna & Campos, 2020; Palatnik-De-Sousa & Nico, 2020).

É importante ressaltar que a ampla utilização da monoterapia, levou ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados. Dessa forma, as combinações mostraram-se boas alternativas e têm apresentado diversas vantagens em relação à monoterapia, incluindo a minimização dos efeitos tóxicos através da redução do tempo de tratamento; maior adesão ao tratamento; redução dos custos diretos e indiretos para o sistema de saúde e a atenuação do desenvolvimento de resistência por parte do parasito (Alvar, et al, 2006; Bastos, et al, 2016). Dentre estas combinações terapêuticas estão: estibogluconato de sódio e paromomicina; antimoniatto de meglumina e paromomicina; anfotericina B e miltefosina; anfotericina B e paromomicina e, por fim, miltefosina e paromomicina (Alvar, et al, 2006; Sundar & Olliaro, 2007; Bastos, et al, 2016).

Em 2019 a DNDi finalizou um ensaio de fase II e iniciou um de fase III, combinando termoterapia e miltefosina para o tratamento da leishmaniose cutânea (LC) não complicada. Nesse estudo foi avaliada a eficácia e a segurança da combinação de termoterapia (uma sessão) + miltefosina (dose padrão de 2,5 mg/kg/dia por 21 dias, via oral), em comparação à apenas uma sessão de termoterapia no tratamento da LC não complicada no Peru e na Colômbia. Esse estudo contou com 130 participantes e os resultados preliminares na análise por intenção de tratar (ITT) mostraram evidências a favor da combinação. O estudo de fase III tem como objetivo determinar se a combinação de tratamentos não é inferior ao tratamento padrão de primeira linha (antimoniatto de meglumina de 20 mg/kg/dia por 20 dias, uso parenteral) e a monoterapia com miltefosina (dose padrão de 2,5 mg/kg/dia por 28 dias, por via oral) (Boni, 2019). Ainda em 2019 a DNDi desenvolveu um diverso portfólio, totalizando 21 projetos com dez novas classes químicas (quatro séries líderes, quatro candidatos pré-clínicos e dois candidatos clínicos) com diferentes mecanismos de ação contra os parasitos do gênero *Leishmania*. Esta cadeia de desenvolvimento oferece uma base sólida para que se avance com uma ou mais novas terapias orais seguras e acessíveis para a leishmaniose visceral e cutânea (DNDi, 2019).

Além da termoterapia anteriormente citada, outras terapias alternativas também podem ser aplicadas a leishmaniose, a exemplo da terapia fotodinâmica, que surgiu como uma alternativa de tratamento promissora, que permite a administração local com menos efeitos colaterais (Pinto, et al., 2016). Esse tipo de terapia é baseada na aplicação de uma substância fotossensível na lesão-alvo, que, ao receber luz de comprimento de onda específico, é ativada desencadeando uma série de reações na presença de oxigênio molecular, levando a produção de espécies reativas de oxigênio, que resulta na morte celular e destruição do tecido doente (Machado, 2000; Bacelar, et al., 2015). Os fotossensibilizadores podem ser corantes, que são

substâncias fotossensíveis, geralmente não tóxicas para aplicação tópica, caracterizadas por uma alta capacidade de absorver a luz visível (Volpe, et al., 2018). Um exemplo de corante fotossensibilizador é o Rosa Bengala, derivado do grupo xanteno; o qual seus derivados éster metílico de rosa bengala (RBMET) e éster butílico (RBBUT) mostraram-se eficazes contra *L. amazonensis* no tratamento da leishmaniose tegumentar (Navasconi, et al., 2017). Em 2018, um estudo utilizando laser de dióxido de carbono (CO₂) fracionado seguido de aplicação tópica de estibogluconato de sódio demonstrou que este é um tratamento seguro e promissor para infecção por leishmaniose cutânea em crianças. Dez crianças foram tratadas, destas, apenas uma não respondeu ao tratamento, as outras nove obtiveram cura clínica, com alta tolerância ao tratamento e nenhum efeito adverso observado ou relatado (Hilerowicz, et al., 2018). Outros exemplos de terapias alternativas são a crioterapia e eletroterapia (Zulfiqar, et al., 2017).

A Química Medicinal é um ramo da ciência que versa sobre a descoberta e o desenvolvimento de fármacos (Taylor & Triggle, 2006). Através dela é possível: a identificação e interpretação do mecanismo molecular de ação de compostos biologicamente ativos; a investigação das relações entre a estrutura química e a atividade biológica, o que contribui significativamente para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos, bem como para o desenvolvimento de novos medicamentos mais seguros e eficazes (Amaral, et al., 2017); além destes, o melhoramento das propriedades medicamentosas, por meio de modificações específicas nas estruturas químicas, viabilizando-se a síntese de novos e mais potentes compostos com características farmacofóricas comuns a compostos antileishmania (Rashid, et al., 2016).

Uma vertente recente da Química Medicinal são os métodos *in silico* (computacionais). Como exemplo temos a Triagem Virtual, que surgiu na identificação de novos candidatos a fármacos como alternativa a triagem de alto rendimento (HTS). Sua principal vantagem é que bibliotecas virtuais (quimiotecas) contendo diversos compostos (> 500) são avaliadas através de diferentes ferramentas computacionais, resultando num pequeno conjunto de compostos priorizados para ensaios secundários. Economiza-se assim insumos, matérias-primas e reagentes. Além disso esses métodos *in silico* possibilitam também a identificação de: propriedades moleculares (*drug-like* e estruturais), similaridade 2D, a presença de grupos farmacofóricos (Piccirillo & Amaral, 2018), cardiotoxicidade, capacidade de agregação, presença de falsos positivos (PAINS) e a toxicidade de moléculas. Além disso, os estudos de Triagem Virtual podem ser aplicados a compostos de origem sintética quanto natural. O Banco de Dados de Produtos Naturais do Semi-Árido Baiano (NatProDB, www.natprodb.uefs.br), por exemplo é uma base de dados com grande diversidade química o que pode favorecer a descoberta de novas entidades químicas (Paixão & Pita, 2019).

Adicionalmente, outra estratégia que tem sido empregada para melhorar a eficiência desse tratamento é a busca de novas formas farmacêuticas sítio-específicas. Os sistemas mais utilizados são os lipossomas e as nanopartículas; e seus principais benefícios são: a redução dos efeitos adversos, através direcionamento do fármaco aos tecidos ou células afetadas; a proteção do fármaco contra a degradação em fluidos biológicos, o que culminou na possibilidade de administração por novas vias; além do aumento da biodisponibilidade, possibilitando a administração por via oral (Bastos, et al, 2016).

4. Conclusão

Embora a Leishmaniose se apresente como um problema de saúde pública, diversos trabalhos apontam inúmeras limitações às terapêuticas atuais, incluindo toxicidade e alto custo. Além disso, exceto a miltefosina que é de administração oral, todos os outros requerem administração parenteral, evidenciando assim, a necessidade de opções terapêuticas mais eficazes, mais seguras e que apresentem vias de administração mais convenientes, a fim de facilitar a adesão ao tratamento e consecutivamente sua taxa de sucesso.

Sendo assim, o presente trabalho expõe os principais problemas das terapias atuais, as alternativas que vêm sendo empregadas e perspectivas futuras de novos tratamentos, reforçando a necessidade de busca por outras alternativas

terapêuticas. Nesse contexto, essas novas opções terapêuticas podem ser reveladas de uma ou mais classes químicas diferentes das utilizadas atualmente, tornando notável que os estudos de novos protótipos devam ser fortemente apoiados como ferramentas de controle de riscos e agravos à população e à saúde pública.

Referências

- Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P., & David, H. M. (2008). Chemotherapy in the treatment and control of Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 223-274.
- Amaral, A. T., Andrade, C. H., Kummerle, A., & Guido, R. V. C. (2017). A evolução da Química Medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. *Química Nova*, 694-700.
- Bacelar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C., & Baptista, M. S. (2015). Eficiência fotodinâmica: da fotoquímica molecular à morte celular. *Int J Mol Sci*, p. 20523-59.
- Barratt, G., & Bretagne, S. (2007). Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *The International Journal of Nanomedicine*, p. 301.
- Bastos, M. M., Boechat, N., Hoelz, L. V. B., & de Oliveira, A. P. (2016). Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. *Rev. Virtual Quim.*, 8 (6), 2072-2104.
- Beig, M., Oellien, F., Garoff, L., Noack, S., Krauth-Siegel, R. L., & Selzer, P. M. (2015). Trypanothione reductase: a target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 6.
- Beugnet, F., Halos, L., & Guillot, J. (2018). Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats. Servet editorial - Grupo Asís Biomedica, S.L.
- Boni, Marina. (2019). Leishmaniose: estudo de combinação de Fase III. DNDi América Latina. Disponível em: <<https://www.dndial.org/2019/comunicacao-e-informacao/leishmaniose-estudo-de-combinacao-de-fase-iii/>>.
- Brasil, Ministério da Saúde. (2018). Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Santa Catarina, 13 p. Disponível em <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/ManualLTAvisualiza%C3%A7%C3%A3o.pdf>>.
- Bray, P. G., Barrett, M. P., Ward, S. A., & De Koning, H. P. (2013). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, 19, 232.
- Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K. D., & Madhubala, R. (2011). Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin susceptible resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One*, 6(10).
- Coelho, A. C., Messier, N., Ouellette, M., & Cotrim, P. C. (2007). Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, p.3030-2.
- Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., & Matheron, S. (2012). *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg Infect Dis*, 18, 704-706.
- Cotrina, F. J., Iniesta, V., Monroy, I., Baz, V., Hugnet, C., Marañón, F., A& lonso, C. (2018). A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend against canine leishmaniosis. *Vaccine*, 36, 1972-1982.
- Coura-Vital, W., Leal, G. G. De A., Marques, L. A., Pinheiro, A. Da C., Carneiro, M., & Reis, A. B. (2018). Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLoS one*, 13(12).
- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19, 502.
- DNDi, (2019). Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas. Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses. DNDi América Latina. <https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf>.
- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & De Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother*, 67, 2576-2597.
- Dukhyil A. A. B. (2019). Targeting Trypanothione Reductase of Leishmanial major to Fight Against Cutaneous Leishmaniasis. *Infect Disord Drug Targets*, 19, 388-393.
- Fangueiro, J. F., Marques, I. R., Severino, P., Santana, M. H. A., & Souto, E. B. (2012). Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. *Química Nova*, 35, 1848-1853.
- Fernandes, C. B., Junior, J. T. M., Jesus, C., Souza, B. M., Lorangeira, D. F., Fraga, D. B., Barrouin-Melo, S. M. (2014). Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, 1287-1295.
- Flohé, L. (2012). The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnology Advances*, 30, 294-301.
- Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., & Siqueira-Neto J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist*, 2, 11-19.

- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., & Bryceson, A. D. M. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 2, p. 494.
- Hendrickx, S., Caljon, G., & Maes, L. (2019). Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. *Parasitology Research*.
- Hilerowicz, Y., Koren, A., Mashiah, J., Katz, O., Sprecher, E., & Artzi, O. (2018). Fractional ablative carbon dioxide laser followed by topical sodium stibogluconate application: A treatment option for pediatric cutaneous leishmaniasis. *Pediatr Dermatol*. v.35, n.3, p. 366-369.
- Kato, K. C., Morais-Teixeira, E., Reis, P. G., Silva-Barcellos, N. M., Salaün, P., Campos, P. P., Corrêa-Junior, J. D., Rabello, A., Demicheli, C., & Frézarda, F. (2014). Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.58, p.481.
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World Leishmania Infections a Practical Review. *Dermatologic Clinics*. 33, 579.
- Kip, A. E., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Dorlo, T. P. C. (2018). Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clin Pharmacokinet*. v.57, p.151–176.
- Koff A. B., & Rosen T. (1994). Treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 31, 693-708.
- Krauth-Siegel R. L., & Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*.
- Krauth-Siegel, R. L., Bauer, H., & Schirmer, R. H. (2005). Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew Chem Int Ed Engl*. 44, 690-715.
- Laniado-Laborín, R., & Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*. 26, 223-227.
- Lopes, E. G., Sevá, A. P., Ferreira, F., Nunes, C. M., Keid, L. B., Hiramoto, R. M., & Soares, R. M. (2018). Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of Leishmania infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis in Brazil. *Epidemiology and Infection*.
- Luna, E. J. De A., & Campos, S. R. de S. L. da C. (2020). O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. *Cad. Saúde Pública*. 36.
- Machado, A. E. (2000). Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*. 23, 237–243.
- Marinho, F. D. A., Gonçalves, K. C. D. S., Oliveira, S. S. D., Oliveira, A.- C. D. S. C., Bellio, M., D'ávila-Levy, C. M., Santos, A. L. S. D., & Branquinha, M. H. (2011). Miltefosine induces programmed cell death in Leishmania amazonensis promastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 106, 507-509.
- Martin, V., Vouldoukis, I., Moreno, J., McGahie, D., Gueguen, S., Cuisinier, A. (2014). The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP / QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary Research*. 45, 1–15.
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med*. 107, .7–14.
- Moafi, M., Rezvan, H., Sherkat, R., & Taleban, R. (2019). Leishmania vaccines entered in clinical trials: a review of literature. *Int J Prev Med*. 10, 95.
- Murray, H. W. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis in 2010: direction from Bihar state, India. *Future Microbiol*. 5, 1301–1303.
- Nagle, A. S., Khare, S., Kumar, A. B., Suppek, F., Buchynskyy, A., & Mathison, C. J. N., Molteni, V. (2014). Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chemical Reviews*. 114, 11305.
- Navasconi, T. R., Reis, V. N., Freitas, C. F., Pereira, P. C. S., Caetano, W., Hioka, N., Lonardon, M. V. C., Aristides, S. M. A., & Silveira, T. G. V. (2017). Photodynamic Therapy With Bengal Rose and Derivatives Against Leishmania amazonensis. *J Lasers Med Sci*. 8, 46-50.
- No, J. H. (2016). Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop*. 155, 113-123.
- Nogueira, F. S., Moreira, M. A. B., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Menz, I., Parra, L. E., & Luvizotto, M. C. R. (2005). Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis Absence of Leishmania parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. 23, 4805–4810.
- Organização Pan-Americana Da Saúde (OPAS/OMS). (2018). Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Organização Pan-Americana da Saúde.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*. 29, 339–345.
- Paixão, V. G., & Pita. S. S. R. (2019). In silico identification and evaluation of new Trypanosoma cruzi trypanothione reductase (TcTR) inhibitors obtained from natural products database of the Bahia semi-arid region (NatProDB). *Computational Biology and Chemistry*. 79, 36–47.
- Palatnik-De-Sousa, C. B., Silva-Antunes, I., Morgado, A. A., Menz, I., Palatnik, M., & Lavor, C. (2009). Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. *Vaccine*. 27, 3505–3512.
- Palatnik-De-Sousa, C. B., & Nico, D. (2020). The delay in the licensing of protozoal vaccines: a comparative history. *Front Immunol*. v.11, p.204.
- Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*. v.48, n.3, p.852-859.
- Piccirillo, E., & Amaral, A. T. (2018). Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. *Quím. Nova*41, 662-677.

- Pinto, J. G., Fontana, L. C., Oliveira, M. A., Kurachi, C., Raniero, L. J., & Ferreira-Strixino, J. (2016). In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. *Lasers Med Sci*. 31, 883–890.
- Rashid, U., Sultana, R., Shaheen, N., Hassan, S.F., Yaqoob, F., Ahmad, M. J., Iftikhar, F., Sultana, N., Asghar, S., Yasinza, M., Ansari, F. L., & Qureshi, N. A. (2016). Structure based medicinal chemistry-driven strategy to design substituted dihydropyrimidines as potential antileishmanial agents. *Eur J Med Chem*. 10, 230-44.
- Reguera, R. M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., & Balaña-Fouce, R. (2016). Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 227, 98–114.
- Reguera, R.M., Elmahallawy, E.K., García-Estrada, C., Carbajo-Andrés, R., & Balaña-Fouce, R. (2019). DNA Topoisomerases of *Leishmania* Parasites, Druggable Targets for Drug Discovery. *Curr Med Chem*. 26, 5900-5923.
- Rijal, S., Ostyn, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T. P. C., Beijnen, J. H., Vanaerschot, M., Decuypere, S., Dhakal, S. S., Lal Das, M., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M., & Dujardin, J-C. (2013). Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, 56, 1530–1538.
- Rother E.T. (2007). Revisão sistemática x revisão narrativa. *Acta Paul Enferm*, 20(2):v-vi. <http://www.scielo.Br/scielo.php?script=sci_arttext&pid+S0103-21002007000200001>.
- Sampaio R. N. R., Takano G. H., Malacarne A. C., Pereira T. R., & de Magalhães A. V. (2003). In vivo Terbinafine inefficacy on cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in C57BL/6 mice. *Rev Soc Bras Med Trop*.
- Sereno, D., Holzmüller, P., & Lemestre, J. L. (2000). Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*. 74:25.
- Silva, K. L. O., Santos, D. P., Coelho, N. M. D., Silva, D. C., Okamoto, A. C., & Junior Gaetti-Jardim, E. (2013). Vacinas contra Leishmaniose: uma revisão. *Archives of Health Investigation*. 2, 18-28.
- Silveira, F. T., Lainson, R., De Castro Gomes, C. M., Laurenti, M. D., & Corbett, C. E. P. (2009). Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 31, 423 – 431.
- Singh, N., Kumar, M., & Singh, R.K. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 5, 485-489.
- Singh, N., Mishra, B. B., Bajpai, S., Singh, R. K., & Tiwari V. K. (2014). Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg. Med. Chem*. 22, 18-45.
- Singh, O. P., Singh, B., Chakravarty, J., & Sundar, S. (2016). Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infect. Dis. Poverty*.
- Sun, C. H., Weng, S.C., Wu, J. H., Tung, S. Y., Su, L.H., Lin, M. H., & Lee, G. A. (2020). DNA topoisomerase III β promotes cyst generation by inducing cyst wall protein gene expression in *Giardia lamblia*. *Open Biol*. 102.
- Sundar, S., & Chatterjee, M. (2006). Visceral leishmaniasis current therapeutic modalities. *The Indian Journal of Medical Research*. v. 123, p. 345.
- Sundar, S., & Murray, H. W. (2005). Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bulletin of the World Health Organization*. 83, 394.
- Sundar, S., & Oliaro, P. L. (2007). Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 3, 733.
- Taylor, J. B., & Trigg, D. J. (2007). *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier.
- Tiwari, N., Gedda, M. R., Tiwari, V. K., Singh, S. P., & Singh, R. K. (2018). Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. v. 18, n. 1.
- Ueno, N., & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 28, 35–44.
- Vasconcelos, J. M., Gomes, C. G., Sousa, A., Teixeira, A. B., & Lima, J. M. (2018). Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. *RBAC*. 50, 221-7.
- Vianna, G. (1912). Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *An 7º Congr Bras Med Cirurg*. 4, 426–428.
- Volpe, R. A. F. N., Navasconi, T. R., Reis V. N., Hioka, N., Becker, T. C. A., Lonardoni, M. V. C., Aristides, S. M. A., & Silveira, T. G. V. (2018). Terapia fotodinâmica para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana: avaliação da associação de terapias em camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Lasers Med Sci*. 9, 274-282.
- Vosgerau, D. S. A. R. & Romanowski, J. P. (2014). Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. *Revista de Diálogo Educacional*, (14)41, 165-189.
- Vulpiani, M. P., Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F., & Ferri, N. (2011). Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: State of the art. *Veterinary Medicine*.
- Zulfiqar, B., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2017). Leishmaniasis drug discovery: recente progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today*. p.4.