



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**GABRIELA DOS SANTOS RODRIGUES**

**ABORDAGEM COMBINADA DE TRIAGEM VIRTUAL INVERSA E BASEADA EM  
LIGANTES NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS PROTEICOS PARA AFIDICOLINA  
E NOVOS HITS CONTRA *Leishmania major***

**SANTARÉM  
2022**

**GABRIELA DOS SANTOS RODRIGUES**

**ABORDAGEM COMBINADA DE TRIAGEM VIRTUAL INVERSA E BASEADA EM  
LIGANTES NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS PROTEICOS PARA AFIDICOLINA  
E NOVOS HITS CONTRA *Leishmania major***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Oeste  
do Pará, como requisito à obtenção do título de mestre.  
Orientadora: Prof. Dra. Gabriela Bianchi dos Santos.  
Coorientador: Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos  
Santos.

**SANTARÉM  
2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

---

- R696a Rodrigues, Gabriela dos Santos  
Abordagem combinada de triagem virtual inversa e baseada em ligantes na identificação de alvos proteicos para afidicolina e novos hits contra *Leishmania major*./ Gabriela dos Santos Rodrigues. – Santarém, 2022.  
110 p. : il.  
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Gabriela Bianchi dos Santos.  
Coorientador: Cleudson Breno Rodrigues dos Santos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde Coletiva, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
1. *Leishmania major*. 2. Afidicolina. 3. Modelagem molecular. I. Santos, Gabriela Bianchi dos, *orient.* II. Santos, Cleudson Breno Rodrigues dos, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 616.9364



PROGRAMA DE  
PÓS GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE

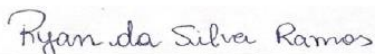
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PPGCSA**

**ATA Nº 2**

Aos 29 dias do mês de abril do ano de dois mil 2022, às 15h00min, na sala por meio da tecnologia de comunicação à distância "Google Meet" sob o link <https://meet.google.com/vkb-kjja-xar>, conforme orientação da CAPES - Portaria Nº36 de 19 de março de 2020, realizou-se defesa de Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde de autoria de Gabriela dos Santos Rodrigues, intitulada "Abordagem combinada de triagem virtual inversa e baseada em ligantes na identificação de alvos proteicos para afidicolina e novos hits contra Leishmania major". A Banca Examinadora constituiu-se por: Prof. Dr. Ryan da Silva Ramos (UEAP – Avaliador 1); Prof. Dr. Glauber Vilhena da Costa (UNIFAP – Avaliador 2) e Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro (UFOPA - Avaliador 3). Seguindo o regimento interno do curso, o presidente da banca Prof(a). Dr(a). Gabriela Bianchi dos Santos (Orientadora) abriu a sessão, passando a palavra para a mestranda, que fez a exposição da sua Dissertação. Findada a arguição, a banca examinadora e o orientador reuniram-se em outra sala virtual, sem a presença da candidata e do público, tendo a Banca Examinadora deliberado por sua: (X) APROVAÇÃO, condicionada às correções sugeridas pela Banca Examinadora e entrega da versão corrigida no prazo de 30 dias a contar da data da defesa. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, Presidente (orientador(a)) e mestrando(a).

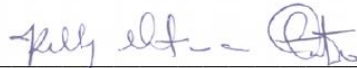
Santarém-Pará. 29 de Abril de 2022.



Avaliador 1 – Prof. Dr. Ryan da Silva Ramos



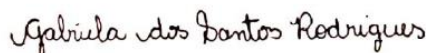
Avaliador 2 – Prof. Dr. Glauber Vilhena da Costa



Avaliador 3 – Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro

  
Gabriela Bianchi dos Santos  
Docente/UFOPA  
SIAPE: 2375623

Presidente – Profa. Dra. Gabriela Bianchi dos Santos



Mestranda – Gabriela dos Santos Rodrigues

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus familiares por todo apoio nessa etapa da minha carreira científica.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Gabriela Bianchi dos Santos pela dedicação a este trabalho, por ter sempre palavras de incentivo e pela confiança. Sem dúvidas, a senhora é uma grande inspiração para a minha carreira científica.

Ao Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos pela valiosa colaboração e orientação neste projeto.

Ao Laboratório de Modelagem e Química Computacional (LMQC) da UNIFAP onde parte deste projeto foi executada.

Ao colega Me. Lúcio Rocha de Lima pela grande ajuda na execução de *softwares* e servidores *web* de modelagem molecular utilizados na pesquisa.

Aos meus pais Rose e João por serem meu porto seguro nessa trajetória desafiadora.

Ao meu companheiro David por sempre me incentivar e vibrar pelas minhas conquistas.

Às amigas da primeira turma do mestrado em Ciências da Saúde pela união e força diante de todos os obstáculos nessa jornada.

À CAPES pela bolsa de mestrado por meio do processo n°. 88887.472746/2019-00.

À FAPESPA pelo fomento através do novo acordo de novembro de 2021.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo fomento de elaboração de dissertações do através do Edital 04/2021.

Ao Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG – Amazônia Legal), Projeto “Consolidação da Pós-Graduação em Ciências da Saúde com foco em Biotecnologia e Inovação terapêutica para atenção à saúde” pelo fomento à pesquisa através do Auxílio (AuxPE) n°. 0817/2020.

## RESUMO

A leishmaniose compreende um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, prevalente em países tropicais e em desenvolvimento. Os fármacos disponíveis para as formas de leishmaniose apresentam problemas de toxicidade e resistência dos parasitas, tornando necessária a busca por novos agentes terapêuticos. A modelagem molecular é um campo útil para o planejamento de fármacos antiparasitários mais seguros e eficientes, especialmente de fontes naturais. Existem diversos produtos naturais ativos sobre *Leishmania* spp., dentre eles a afidicolina, um inibidor seletivo de DNA polimerase- $\alpha$  viral e humana, produzido por fungos *Cephalosporium aphidicola* e *Nigrospora sphaerica*, com mecanismo de ação antiparasitário desconhecido. Portanto, a presente pesquisa teve como objetivos identificar potenciais alvos biológicos da afidicolina e derivados através de triagem virtual reversa. A busca de alvos de *Leishmania major* foi realizada no *Protein Data Bank* (PDB). Os alvos selecionados para *docking* molecular no servidor DockThor foram aqueles cujos ligantes mostraram valores de *molecular overlay* (sobreposição)  $>0,5$  em relação à afidicolina e valores de  $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ . Assim, as enzimas N-miristoiltransferase (NMT), metionil t-RNA sintetase (MetRS) e map-quinase (MAPK) foram elencadas como possíveis alvos de afidicolanos. Considerando as propriedades farmacocinéticas e físico-químicas inadequadas da afidicolina e derivados, foi realizado o alinhamento das moléculas no servidor PharmaGist para construção de modelo farmacofórico. O modelo foi avaliado por análise grupamento hierárquico (HCA) e correlação de Pearson no *software* Minitab. Devido ao número de propriedades hidrofóbicas, um modelo foi construído para cada alvo e submetido à triagem virtual no servidor Pharmit. Os *hits* encontrados foram filtrados através de cálculo de propriedade fármaco-similar no *software* Osiris DataWarrior, alertas de toxicidade no *software* Derek e farmacocinética no servidor PreADMET. O servidor SwissADME também foi utilizado para predição da solubilidade em água e viabilidade sintética. Ao final de todas essas etapas, foram encontradas 2 moléculas para NMT, 09 para MetRS (sendo duas em comum a NMT) e nenhuma para MAPK. A fim de avaliar a seletividade das moléculas em função da afinidade de ligação ( $\Delta G$ ), todas elas foram ancoradas em NMT, MetRS e MAPK através do servidor DockThor. Análises estatísticas dos 07 melhores valores de  $\Delta G$  de cada complexo foram realizadas no *software* GraphPad Prism por meio dos testes ANOVA-*one way* e ANOVA-*two way*, utilizando os ligantes co-cristalizados como controle positivo e a miltefosina como controle negativo, por não apresentar atividade conhecida sobre os alvos supracitados. As moléculas mostraram valores de  $\Delta G$  estatisticamente significativos somente quando foram ancoradas com NMT e MAPK, destacando os ligantes MP-002-507-460, MP-002-528-375 e MP-002-911-105. No entanto, foi observada seletividade considerável para NMT. Após análise das interações intermoleculares no *software* Discovery Studio, apenas MP-002-507-460 e MP-002-911-105 apresentaram mais interações com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de NMT. A predição da atividade biológica através do servidor PASS revelou que as duas moléculas, análogas de esteroides, exibiram probabilidade moderada de atuarem como agentes leishmanicidas. Assim, as duas moléculas encontradas por meio de triagem virtual são candidatas promissoras a ensaios *in vitro* sobre modelos de *Lm*NMT para validação dos resultados teóricos apresentados neste trabalho.

Palavras-chave: Leishmaniose. Afidicolina. Modelagem molecular. Triagem virtual inversa.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, prevalent in tropical and developing countries. The existing drugs presents serious limitations such as toxicity and parasite resistance, therefore, the search for new therapeutic agents is necessary. Molecular modeling methods are useful to facilitate the design of safer and more efficient antiparasitic drugs, especially from natural sources. There are several natural products active against *Leishmania* spp., including aphidicolin, a selective inhibitor of viral and human DNA polymerase- $\alpha$ , produced by fungi *Cephalosporium aphidicola* and *Nigrospora sphaerica*, with an unknown antiparasitic mechanism of action. Hence, this work aimed to find potential biological targets of aphidicolin and derivatives through inverse virtual screening. We used Protein Data Bank (PDB) to search *Leishmania major* targets. The targets selected for molecular docking on DockThor web server were those whose ligands showed molecular overlay values  $>0.5$  relative to aphidicolin and RMSD values  $\leq 2$  Å. Thus, we considered N-myristoyltransferase (NMT), methionyl t-RNA synthetase (MetRS) and map-kinase (MAPK) as possible targets of aphidicolans. Considering the poor pharmacokinetic and physicochemical properties of aphidicolin and derivatives, we used PharmaGist server to align the molecules and to build a pharmacophoric model. We evaluated the model by hierarchical cluster analysis (HCA) and Pearson's correlation in Minitab software. Due to the number of hydrophobic properties, we built a pharmacophoric model for each target and we subjected to virtual screening on the Pharmit server. After that, we filtered the hits through drug-similar property calculation in Osiris Data-Warrior software, as well toxicity alerts in DEREK software and pharmacokinetics on PreADMET web server. We used SwissADME web server to predict water solubility and synthetic accessibility. In the end, we selected only 02 molecules for NMT, 09 for MetRS (02 in common with NMT) and none for MAPK. In order to evaluate the selectivity of the molecules considering the binding affinity ( $\Delta G$ ), we anchored all of them in NMT, MetRS and MAPK on DockThor. Statistical analyzes of the 07 best values of  $\Delta G$  of each complex were performed in the GraphPad Prism software by means of the ANOVA-one way and ANOVA-two way tests, using the co-crystallized ligands as positive control and the miltefosine as a negative control, because there is no known activity against the mentioned targets. The molecules showed statistically significant  $\Delta G$  values only when they were anchored with NMT and MAPK, mainly the ligands MP-002-507-460, MP-002-528-375 and MP-002-911-105. However, we observed considerable selectivity for NMT. After analyzing the intermolecular interactions in Discovery Studio software, only MP-002-507-460 and MP-002-911-105 showed more interactions with the amino acid residues of the NMT binding site. The prediction of biological activity through the PASS server revealed that the two molecules, steroid analogues, exhibited a moderate probability of acting as leishmanicidal agents. Thus, the two molecules found through virtual screening are promising candidates for in vitro assays on *Lm*NMT models to validate the theoretical results presented in this work.

Keywords: Leishmaniasis. Aphidicolin. Molecular modeling. Inverse virtual screening.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química de produtos naturais e derivados de produtos naturais antiparasitários.....	16
Figura 2 – (A) Fêmea de <i>Phlebotomus papatasi</i> ; (B) Formas promastigotas (C) e amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 3 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 4 – Fármacos utilizados no tratamento das diferentes formas de leishmaniose.....	24
Figura 5 – Representação de metodologia de planejamento de fármacos auxiliado por computador.....	27
Figura 6 – Representação esquemática das etapas de <i>docking</i> molecular.....	29
Figura 7 – Visão geral das abordagens de triagem virtual inversa.....	34
Figura 8 – Estrutura química da afidicolina.....	36
Figura 9 – Estruturas químicas da afidicolina (1) e derivados afidicolanos (2-14).....	39
Figura 10 – Esquema geral das etapas metodológicas do estudo <i>in silico</i> .....	46
Figura 11 – (A) Similaridade eletrônica (50%) e estérica (50%) entre ligantes nativos dos alvos selecionados e a afidicolina. Molécula de afidicolina em verde e ligantes co-cristalizados em roxo. (B) <i>Re-docking</i> dos ligantes nativos dos alvos selecionados. Em verde pose experimental e em vermelho pose prevista <i>in silico</i> .....	49
Figura 12 – Análise estatística dos resultados de <i>docking</i> molecular de 1 e derivados (2-14) com (A) ao sítio de ligação de NMT-03 (A), MetRS (B) e MAPK (C), em comparação com os ligantes de referência TUQ, LWN e SB2, respectivamente e miltefosina.....	51
Figura 13 – Ligante co-cristalizado ancorado ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). 53	
Figura 14 – (A) Comparação da interação do ligante nativo (roxo) e a afidicolina (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D dos aminoácidos envolvidos na interação da afidicolina com NMT-03.....	54
Figura 15 – Ligante co-cristalizado ancorado ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX)..	56
Figura 16 – (A) Comparação da interação do ligante co-cristalizado (roxo) e a afidicolina (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D dos aminoácidos envolvidos na interação da afidicolina com MetRS.....	56
Figura 17– Ligante co-cristalizado ancorado ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB).....	58

Figura 18 – (A) Comparação da interação do ligante co-cristalizado (roxo) e a afidicolina (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) Diagrama 2D dos aminoácidos envolvidos na interação da afidicolina com MAPK. ....	58
Figura 19 – Modelo farmacofórico gerado com o servidor PharmaGist. ....	60
Figura 20 – (a) Dendograma de análise de agrupamento hierárquico (HCA) da correlação entre características farmacofóricas e índice de Tanimoto. (b) Dendograma (HCA) das estruturas classificadas como mais similares em azul (A) menos similares em vermelho (B). ....	62
Figura 21 – Hipóteses farmacofóricas. (I) modelo farmacofórico inicial; (II) modelo farmacofórico com base e interação MPK, (III) NMT-03 e (IV) MetRS. Os grupos aceptores de ligação de hidrogênio estão representados na cor laranja e os grupos hidrofóbicos, em verde.	63
Figura 22 – Moléculas aptas ao estudo de <i>docking</i> molecular. Em asterisco (*) se encontram as únicas moléculas triadas para NMT-03 e que pertencem também ao conjunto de ligantes promissores para MetRS. ....	74
Figura 23 – Resultado de afinidade de ligação dos compostos com <i>Lm</i> NMT (NMT-03). O teste ANOVA e de Tukey confirmaram que a diferença de valores de afinidade de ligação de TUQ (controle positivo) e MP-002-911-105 é significativa em relação ao controle negativo (miltefosina). Diferença de afinidade de ligação confirmada entre TUQ e MP-002-527-121.	75
Figura 24 – Resultados de afinidade de ligação dos compostos com <i>Lm</i> MetRS. Teste de Tukey confirmou diferença significativa entre LWN e miltefosina (***) $p=0,006$ , bem como de LWN com todas as moléculas analisadas. ....	75
Figura 25 – Avaliação estatística das afinidades de ligação dos compostos com NMT-03 (A) e MAPK (B). ....	76
Figura 26 - (A): <i>Heatmap</i> dos valores médios de afinidade de ligação (n=7) comparados entre <i>Lm</i> NMT e <i>Lm</i> MetRS. As células em amarelo claro representam os valores menos negativos, enquanto que as células em tons de laranja e vermelho mostram os valores mais negativos de afinidade de ligação. (B) Gráfico de barras comparativo das moléculas triadas com <i>Lm</i> NMT (NMT-03) e <i>Lm</i> MetRS. ....	77
Figura 27 – (A) Estrutura 2D de MP-002-911-105, MP-002-507-460 e MP-002-528-375. Em vermelho estão destacadas as diferenças estruturais entre as moléculas (B) Interações de MP-002-911-105, MP-002-507-460 e MP-002-528-375 com resíduos de aminoácidos da enzima N-miristoiltransferase de <i>Leishmania major</i> . ....	78
Figura 28 – Resumo dos principais resultados deste estudo. ....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxonomia da família Leishmania, distribuição geográfica e formas clínicas por espécie.....	19
Tabela 2 – Receptores triados, coordenadas <i>xyz</i> do centro do Grid e tamanho do Grid Box utilizados nos ensaios de <i>docking</i> molecular.....	41
Tabela 3 – Estruturas cristalográficas selecionadas com base na similaridade eletrostática e valores de RMSD.....	48
Tabela 4 – Cálculo de <i>docking</i> molecular da afidicolina (1) e derivados (2-14) com alvos parasitários.....	50
Tabela 5 – Descritores farmacofóricos previstos no servidor <i>web</i> PharmaGist.....	60
Tabela 6 - Coordenadas <i>xyz</i> dos grupos farmacofóricos utilizados na triagem de novos <i>hits</i> .	64
Tabela 7 - Propriedades físico-químicas utilizadas nos filtros de máximos e mínimos.....	65
Tabela 8 – Predição do perfil farmacocinético de 1 e derivados (2-14). ....	66
Tabela 9 - Predição do perfil farmacocinético dos <i>hits</i> encontrados para NMT-03. ....	69
Tabela 10 - Predição do perfil farmacocinético dos <i>hits</i> encontrados para MetRS. ....	70
Tabela 11 – Valores de Solubilidade em água preditos (Log S) dos compostos promissores, dos ligantes co-cristalizados e comercial. ....	72
Tabela 12 - Valores de acessibilidade sintética compostos promissores, dos ligantes co-cristalizados e comercial.....	73
Tabela 13 - Índice de seletividade baseado em valores de afinidades de ligação dos complexos ligante-receptor. ....	78
Tabela 14 - Predição da atividade biológica dos compostos selecionados por triagem virtual, da afidicolina (1) e derivados (2-14). ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIH	Absorção Intestinal Humana
ARO	Aromático
AS	Acessibilidade Sintética
ATM	Átomos
BHE	Barreira Hematoencefálica
CAAD	Computer-aided Drug Design
CE	Características Espaciais
HBA	Hydrogen Bond Acceptor
HBD	Hydrogen Bond Donor
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
HID	Hidrofóbico
LBVS	Ligand-Based Virtual Screening
Log P	Coefficiente de Partição
Log S	Coefficiente de Solubilidade
LPP	Ligação a Proteína Plasmática
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MetRS	Metionil-tRNA Sintetase
NMT	N-miristoiltransferase
NRB	Number of Rotatable Bonds
$P_{\text{Caco-2}}$	Permeabilidade em células Caco-2
$P_{\text{MDCK}}$	Permeabilidade em células Madin-Darby canine kidney
P-gp	Glicoproteína P
PDB	Protein Data Base
PM	Peso Molecular
RMSD	Root Mean Square Deviation
SBVS	Structure-Based Virtual Screening
TPSA	Topological Polar Surface Area
VS	Virtual Screening

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Leishmaniose .....</b>	<b>19</b>
3.1.1	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. ....	20
3.1.2	Formas clínicas .....	22
3.1.3	Tratamento.....	23
<b>3.2</b>	<b>Métodos <i>in silico</i> empregados na descoberta e planejamento de fármacos .....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Triagem virtual baseada em estrutura .....	28
3.2.1.1	<i>Docking</i> Molecular.....	28
3.2.2	Triagem virtual baseada em ligante .....	31
3.2.2.1	Triagem por Similaridade .....	32
3.2.2.2	Triagem por Padrão Farmacofórico.....	32
3.2.3	Triagem virtual inversa.....	33
<b>3.3</b>	<b>Afidicolina .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção e preparo das moléculas .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Predição da similaridade estrutural.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Triagem virtual inversa.....</b>	<b>40</b>
4.3.1	Pesquisa de alvos de <i>Leishmania</i> spp. ....	40
4.3.2	Preparo dos ligantes co-cristalizados e alvos para <i>docking</i> molecular .....	40
4.3.3	Re- <i>docking</i> .....	40
4.3.4	<i>Docking</i> molecular da afidicolina e derivados .....	41
<b>4.4</b>	<b>Geração do modelo farmacofórico .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação do modelo farmacofórico.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Triagem virtual por padrão farmacofórico.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7</b>	<b>Predição da similaridade estrutural dos novos <i>hits</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Predição da toxicidade e farmacocinética .....</b>	<b>44</b>
<b>4.9</b>	<b>Predição da solubilidade em água.....</b>	<b>44</b>
<b>4.10</b>	<b>Predição da viabilidade sintética de ligantes.....</b>	<b>44</b>
<b>4.11</b>	<b><i>Docking</i> molecular dos novos <i>hits</i>.....</b>	<b>45</b>

4.12	Predição da atividade biológica.....	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
5.1	<b>Triagem virtual inversa.....</b>	<b>47</b>
5.2	<b><i>Docking</i> molecular da afidicolina e derivados.....</b>	<b>49</b>
5.2.1	N-miristoil transferase (PDB: 5A28).....	52
5.2.2	Metionil tRNA sintetase (PDB: 6SWX).....	55
5.2.3	Map-quinase (PDB: 3UIB).....	57
5.3	<b>Geração do modelo farmacofórico .....</b>	<b>59</b>
5.3.1	Avaliação do modelo farmacofórico .....	60
5.4	<b>Hipótese farmacofórica e triagem virtual .....</b>	<b>63</b>
5.5	<b>Predição da toxicidade e farmacocinética da afidicolina e derivados .....</b>	<b>66</b>
5.6	<b>Predição da toxicidade e farmacocinética dos novos <i>hits</i> .....</b>	<b>69</b>
5.7	<b>Predição da solubilidade em água dos novos <i>hits</i> .....</b>	<b>711</b>
5.8	<b>Predição da acessibilidade sintética dos novos <i>hits</i> .....</b>	<b>72</b>
5.9	<b><i>Docking</i> molecular dos novos <i>hits</i>.....</b>	<b>74</b>
5.10	<b>Predição do espectro de atividade biológica.....</b>	<b>79</b>
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica como doenças tropicais negligenciadas (DTNs) um grupo de doenças transmissíveis que apresentam maior prevalência em países em desenvolvimento (WHO, 2022a). Essas doenças representam um grande problema de saúde pública devido à alta morbidade e mortalidade associadas, com estimativas de mais de um bilhão de infectados em todo o mundo, com maior concentração em regiões como África Subsaariana, Ásia e América Latina (RAMÍREZ; GUHL, 2012). São exemplos de DTNs algumas infecções virais como raiva, dengue e chikungunya, bacterianas como hanseníase, úlcera de Buruli, tracoma e boubá, fúngicas como micetoma, cromoblastomicose, bem como acidentes ofídicos (WHO, 2022a). Porém, das DNTs mais importantes, a maioria é de origem parasitária, incluindo as diferentes formas clínicas da leishmaniose, doença de Chagas, tripanossomíase humana africana, esquistossomose, filariose linfática, oncocercose, teníase/cisticercose e equinococose (WANG, 2017; WHO, 2022a).

As leishmanioses representam um grupo de doenças transmitidas por protozoários do gênero *Leishmania* através da picada de mosquitos vetores dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. As formas clínicas da leishmaniose, cutânea, mucocutânea e visceral, são endêmicas de regiões tropicais e subtropicais do globo, abrangendo 98 países na Europa, África, Ásia e América Latina. Apesar da vasta área de ocorrência, mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral estão concentrados no Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (ALVAR et al., 2012). Anualmente ocorrem entre 0,7 a 1 milhão de novos casos, e aproximadamente 20.000 a 30.000 pessoas morrem pela doença, principalmente por leishmaniose visceral, cuja taxa de mortalidade é superior a 95% na ausência de tratamento (WHO, 2022b).

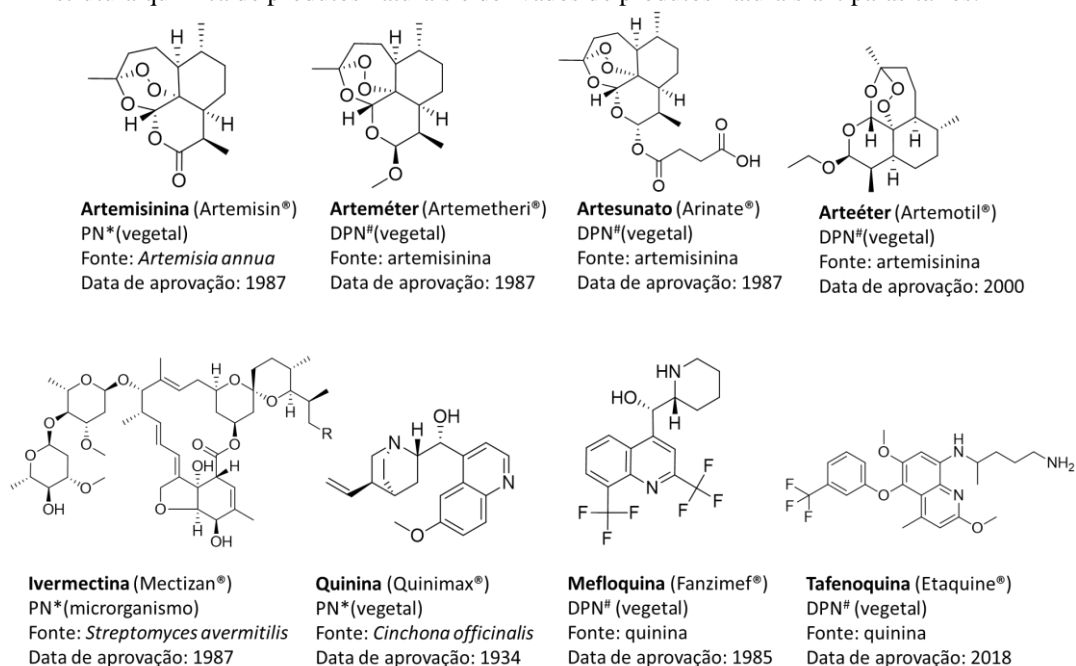
Com a baixa prioridade pela indústria farmacêutica, as estratégias de gerenciamento da leishmaniose dependem significativamente dos fármacos disponíveis no mercado para o seu tratamento. A maioria deles, entretanto, foi desenvolvida há mais de meio século e apresenta sérias reações adversas, além do notável surgimento de cepas de parasitas resistentes a esses fármacos (SINGH et al., 2019). Desse modo, a busca por novos agentes terapêuticos se faz necessária, devendo partir da identificação e otimização de candidatos a fármacos que tenham como alvos enzimas ou rotas metabólicas que não existam em seus hospedeiros, a fim de evitar possíveis efeitos colaterais (YUNTA et al., 2019).

Atualmente, as estratégias adotadas na química medicinal para o planejamento racional de novos candidatos a fármacos têm sido direcionadas para o estudo detalhado da estrutura dos ligantes bioativos e das moléculas-alvos. Os métodos convencionais experimentais são, em geral, demorados e exigem instalações e equipamentos específicos, sendo muito custosos. Assim, a modelagem molecular se apresenta como uma alternativa para o planejamento de fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2014). Trata-se de um sistema de estudos que permite gerar, manipular e/ou representar de maneira realista as estruturas moleculares, podendo ser realizado por computadores e ferramentas que auxiliam na interpretação da relação entre a estrutura e a atividade biológica (ANDREI et al., 2012). Entre as abordagens mais empregadas no planejamento de fármacos estão a triagem virtual baseada em ligantes e estrutura, bem como o estudo da estrutura *versus* atividade farmacológica (RODRIGUES et al., 2012).

No cenário de descoberta de novas substâncias antiparasitárias, os metabólitos e/ou subprodutos de organismos vivos como plantas, animais e microrganismos, também chamados de produtos naturais, representam uma fonte inexplorada de novos quimiotipos com potencial terapêutico (CHEUKA et al., 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020). Entre os exemplos de fármacos antiparasitários de origem vegetal estão a quinina, isolada da espécie vegetal *Cinchona officinalis*, a artemisinina oriunda da *Artemisia annua* (ver Figura 1). Em relação aos compostos bioativos de origem microbiana, aproximadamente três quartos são provenientes de actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces*. Os exemplos de fármacos antiparasitários aprovados incluem a ivermectina isolada de *Streptomyces avermitilis* e alguns leishmanicidas, como anfotericina B e paromomicina, produzidas por *S. nodosus* e *S. krestomuceticus*, respectivamente (ABDEL-RAZEK, 2020).



Figura 1 – Estrutura química de produtos naturais e derivados de produtos naturais antiparasitários.



Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2020. PN\*= produto natural; DPN#= derivado de produto natural.

Entre as classes de produtos naturais os terpenóides são bem conhecidos por diversas propriedades biológicas como atividade anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária (SINGH; SHARMA, 2015). Os estudos na literatura envolvendo terpenos e *Leishmania* spp. se limitam a avaliações *in vitro* utilizando o parasita íntegro. Em investigação realizada por Santos et al. (2013) diterpenos isolados da óleoresina de *Copaifera officinales* mostraram ação *in vitro* contra formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*. Diterpenos de outras fontes naturais, como corais marinhos (*Plumarella delicatissima*) e esponjas (*Dendrilla antarctica*), também se mostram potenciais inibidores de *L. donovani* (THOMAS et al., 2018; SHILLING et al., 2020). Através dos resultados de uma triagem virtual baseada em estrutura bem-sucedida Herrera-Acevedo et al. (2021) identificaram dois diterpenóides do tipo caurano ativos *in vitro* sobre a enzima pteridina redutase-1 de *L. major*.

A afidicolina é um diterpeno tetracíclico isolado de culturas dos fungos *Cephalosporium aphidicola* e *Nigrospora sphaerica* (BRUNDRET, 1972). Essa molécula é bem conhecida pela interrupção seletiva da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) de células eucarióticas através da inibição da enzima DNA polimerase- $\alpha$  (OHASHI; TAGUCHI; IKEGAMI, 1978; SALA et al., 1980; GEUSKENS et al., 1981; SPADARI; SALA; PEDRALI-NOY, 1982).

Mais recentemente, estudos realizados com a afidicolina e seus derivados semissintéticos, mostraram alta atividade *in vitro* sobre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (KAYSER et al., 2001; SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

Embora a atividade antiparasitária da afidicolina descrita na literatura seja promissora, o mecanismo de como esse produto natural ou os seus derivados semissintéticos atuam sobre os parasitas ainda permanece incerto, o que demanda estudos mais detalhados sobre sua estrutura química e os grupos funcionais que estão associados a sua atividade biológica, bem como, do alvo de ação do fármaco em células dos parasitas. Assim, este estudo teórico teve como objetivo levantar potenciais alvos biológicos de *L. major* que sejam modulados pela afidicolina e derivados semissintéticos produzidos por Kayser et al. (2001) e Santos et al. (2014), bem como selecionar novos *hits* com melhores perfis de toxicidade e farmacocinética.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar alvos proteicos de *Leishmania major* para afidicolina e afidicolanos através de triagem virtual inversa e busca de novos *hits* por métodos de modelagem molecular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar alvos de *Leishmania major* promissores através de triagem virtual inversa;
- Realizar *docking* molecular com os alvos cujos ligantes apresentem similaridade estérica e eletrônica à afidicolina e alvos validados por *re-docking*;
- Construir modelo farmacóforo resultante do alinhamento da afidicolina com derivados já descritos na literatura;
- Realizar triagem virtual a partir do melhor modelo farmacofórico obtido;
- Selecionar os *hits* por meio do cálculo de propriedade fármaco-similar, ausência de alertas de toxicidade, perfil farmacocinético adequado, cálculo de solubilidade em água e de acessibilidade sintética;
- Realizar ancoramento molecular entre os alvos encontrados na triagem virtual inversa e *hits* mais promissores.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Leishmaniose

A leishmaniose compreende um grupo de enfermidades infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. Mais de 20 espécies deste gênero produzem formas clínicas que afetam a pele (leishmaniose cutânea, LC), as membranas mucosas (leishmaniose mucocutânea, LMC) e as vísceras (leishmaniose visceral, LC) de seres humanos e outros vertebrados (Tabela 1) (INCEBOZ, 2019). Os parasitas são transmitidos através da picada de fêmeas hematófagas do mosquito-pólvora pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* endêmico da África, Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo, e *Lutzomyia* natural do Texas, nos Estados Unidos, até a América do Sul (MITROPULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010; REY, 2013; WHO, 2020). Nas Américas, as espécies que mais causam doenças em seres humanos são *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi* e *L. infantum* (COSTA, 2005).

Tabela 1 – Taxonomia da família *Leishmania*, distribuição geográfica e formas clínicas por espécie.

Região	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
África, Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Américas	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. naiiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
		<i>L. colombiensis</i>		
Forma clínica	Visceral	Cutânea	Cutânea	Mucocutânea

Fonte: *World Health Organization* (2010).

A área de distribuição da doença abrange aproximadamente 90 países nos trópicos, subtropicais e sul da Europa (CDC, 2020), estando associada a fatores de risco como desnutrição, deslocamento da população, moradia precária, deficiências no sistema imunológico e falta

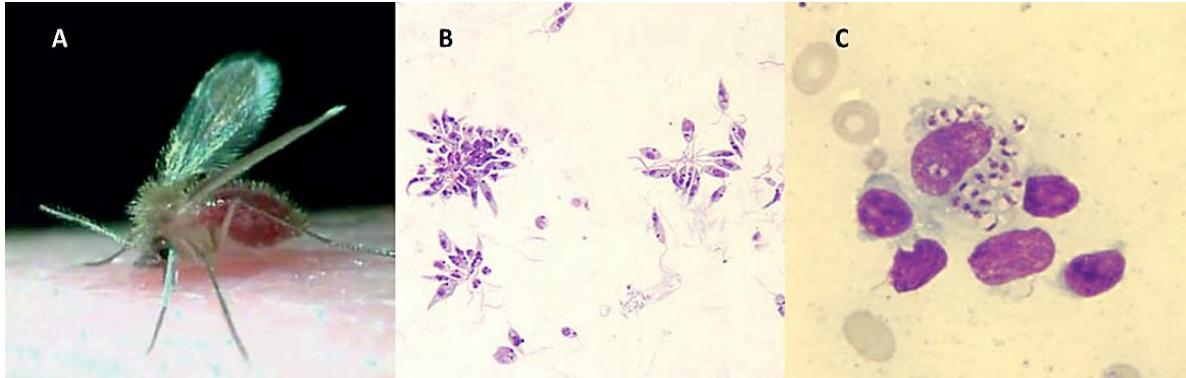
de recursos financeiros (WHO, 2020). São relatados, em média, 1,3 milhão de novos casos de leishmaniose por ano. Desses, em torno de 300.000 são de LV, com maior prevalência em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão; e 1 milhão de casos de LC, especialmente em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria e Tunísia; e mucocutâneos relatados em maior proporção no Brasil, Peru e Bolívia. A mortalidade pela leishmaniose visceral, a forma mais fatal da doença, é estimada em 20.000 a 50.000 óbitos todos os anos (WHO, 2015). Dos 46.041 casos registrados nas Américas em 2018, 84% (16.432) ocorreram no Brasil (PAHO, 2019). De 2002 a 2016, esse continente registrou aumento da taxa de mortalidade, alcançando, em 2016, a média de 7,9%, a maior taxa em relação aos outros continentes (PAHO, 2018; PAHO, 2019).

A leishmaniose é uma doença espectral, ou seja, a forma clínica depende das espécies de *Leishmania* envolvidas e da predisposição aguda do sistema de defesa do hospedeiro (REY, 2013). Desse modo, varia de lesões ulcerativas e cicatriciais autocuráveis (leishmaniose cutânea, LC), a infecções e lesões corrosivas nas mucosas do nariz, boca e faringe (leishmaniose mucocutânea, LMC) e leishmaniose visceral disseminada (LV) ou calazar, manifestada por febre, caquexia, hepatoesplenomegalia e morte, se não tratada (ASHFORD, 2000). Além disso, pode surgir como uma doença oportunista em indivíduos imunossuprimidos por infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus*, HIV), pacientes reumáticos, oncológicos e hematológicos que fazem uso de fármacos imunossupressores, como azatioprina, metotrexato, esteroides e ciclosporinas (BOGDAN, 2012).

### 3.1.1 Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* é parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear. O ciclo de vida desses parasitas é do tipo dimórfico, pois apresentam duas formas evolutivas bem definidas que são promastigotas (desenvolvem-se e vivem extracelularmente no flebotomíneo) e amastigotas (multiplicam-se intracelularmente nos macrófagos do hospedeiro) e, heteroxênico, pois necessita de dois hospedeiros para completar o ciclo: invertebrado (flebotomíneo) e vertebrado (mamíferos) (MELO FILHO, 2018) (ver Figura 2).

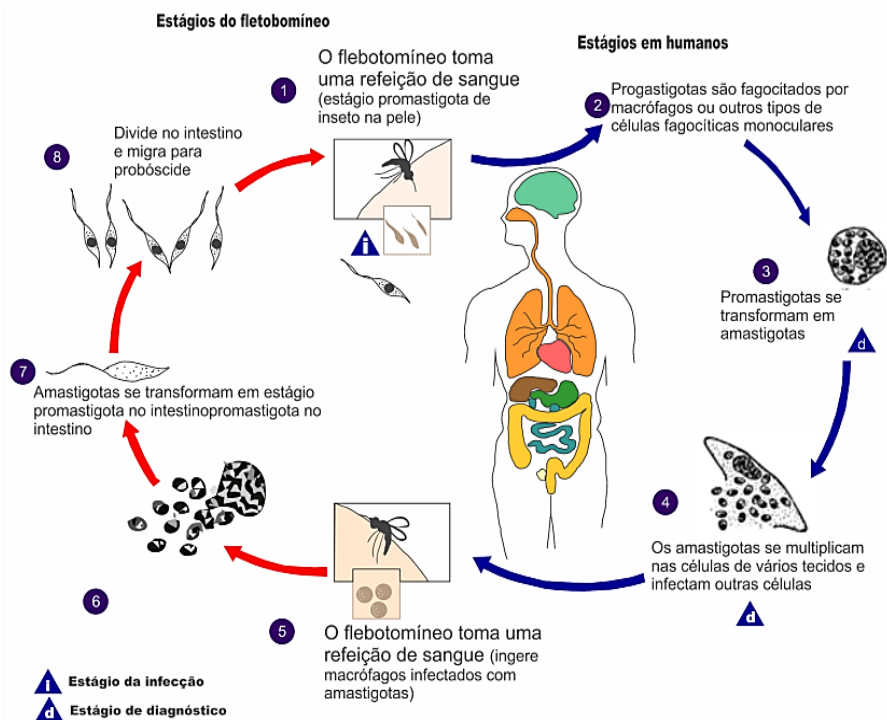
Figura 2 – (A) Fêmea de *Phlebotomus papatasi*; (B) Formas promastigotas (C) e amastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: Maroli et al. (2013); CDC (2022).

A forma promastigota está presente na saliva do mosquito-pólvora infectado (Figura 3). (1) Ao picar o ser humano, o mosquito-pólvora, através da probóscide, injeta os promastigotas na derme, (2) os quais são fagocitados por macrófagos do hospedeiro. (3) No interior dessas células, o caráter ácido do fagolisossomo induz a conversão de promastigota (delgada e flagelada) para a forma amastigota (arredondada) que possui apenas uma mitocôndria e seu DNA concentrado no cinetoplasto (4) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Figura 3 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de CDC (2020).

As formas amastigotas se multiplicam nos macrófagos e, conforme ocorre a ruptura celular, os tecidos são destruídos, liberando amastigotas que podem infectar outros macrófagos. O estágio de amastigota é chamado de forma de diagnóstico da leishmaniose, e é a forma infectante para o mosquito-pólvora. **(5,6,7)** Os amastigotas ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo são convertidos em promastigotas que se multiplicam por divisão binária no intestino médio do flebotomíneo. **(8)** Após desenvolvimento, os promastigotas migram para o aparelho bucal do mosquito, onde podem ser liberadas no hospedeiro durante o repasto sanguíneo (KUMAR et al., 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

### 3.1.2 Formas clínicas

A leishmaniose cutânea é uma doença localizada, manifestada pela formação de pápula vermelha com bordas incrustadas no local da picada do mosquito-pólvora, geralmente, entre duas semanas a dois meses após o contato com o parasito. Por conta da irritação e do prurido intenso, a pápula evolui gradualmente para ulcerações com formação de exsudato seroso no centro e bordas elevadas. Usualmente essas lesões tendem a ser autolimitadas e cicatrizam por involução dentro de seis a 18 meses sem tratamento. Porém são susceptíveis a infecções bacterianas secundárias e, frequentemente, deixam cicatrizes desfigurantes. Ao microscópio, pode-se notar a presença de granulomas, células gigantes e poucos parasitas (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005; KUMAR et al., 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

A leishmaniose mucocutânea, também chamada de leishmaniose tegumentar americana, apresenta período de incubação e formação de úlceras primárias de forma semelhante ao que ocorre na forma cutânea. Entretanto, diferente dessa última, a forma mucocutânea acomete também as mucosas, levando à sua destruição e de estruturas teciduais relacionadas, especialmente dos lábios, gengiva, palato duro e mole, nariz, faringe e laringe. A doença é resultado da disseminação linfática e hematogênica de amastigotas da pele para as membranas mucosas. Na maioria dos casos, se manifesta entre dias a anos após um caso de LC, mas também pode se desenvolver como uma doença primária (sem qualquer história de acometimento pela forma cutânea), simultaneamente à LC e em alguns casos de LV em indivíduos coinfectados pelo HIV. Os sintomas começam de forma inespecífica com congestão e obstrução nasal, epistaxe e rinorreia. À medida que a doença evolui, atingindo a região nasofaríngea, podem surgir disfagia, disfonia, perda dentária, obstrução respiratória grave e, nos casos mais severos, o

óbito. Na LMC o diagnóstico e tratamento precoces são imprescindíveis para evitar a progressão da doença, se não tratadas a tempo, as lesões não curam espontaneamente, são susceptíveis a infecções secundárias e causam mutilação facial grave e desfigurante (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005; KUMAR et al., 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

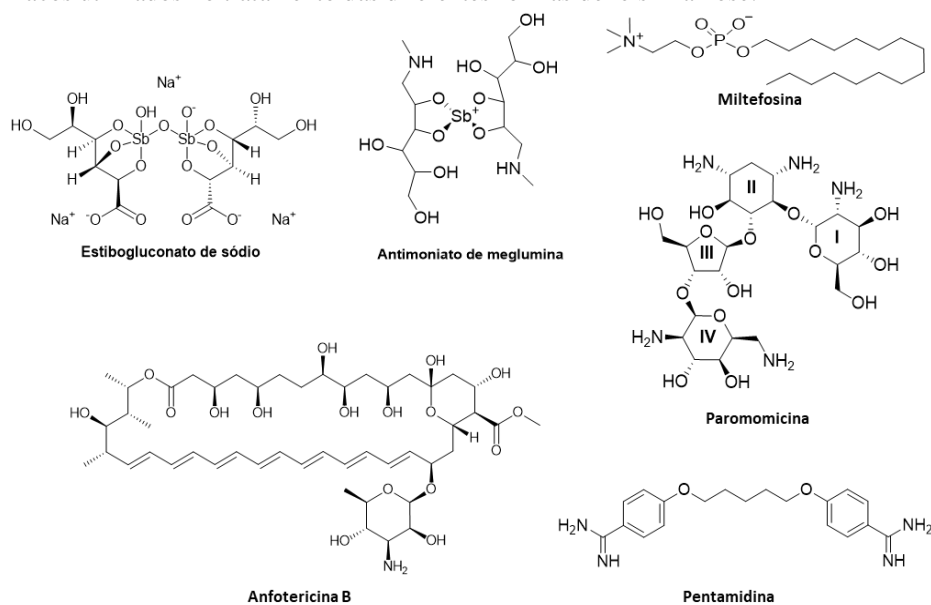
A leishmaniose visceral, conhecida como calazar, é uma doença do sistema fagocítico mononuclear, cujas manifestações clínicas surgem após um período de seis meses a seis anos. Pode se apresentar como uma infecção assintomática e autolimitada, como uma doença fulminante aguda e fatal ou de forma crônica e debilitante (KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2016). Nos casos sintomáticos, as manifestações clínicas iniciais são inespecíficas e têm como exemplos o aparecimento gradativo de febre, diarreia e anemia. Também são relatados calafrios e sudorese, o que pode levar à suspeita de infecção por parasitas do gênero *Plasmodium* sp. no início dos sintomas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Os parasitas se proliferam, invadem as células do endotélio e são carregados para órgãos como fígado e baço, onde causam hepato e esplenomegalia, respectivamente. Alterações hematológicas, como trombocitopenia, resultam em equimoses e sangramentos de mucosas. Além disso, é frequente a leucopenia, hiper-gamaglobulinemia, hipoalbuminemia e linfadenopatia. A anorexia e a desnutrição levam à debilidade do hospedeiro. Nestes pacientes o óbito ocorre por elevado parasitismo, por outro lado, a ocorrência de hemorragias e infecções secundárias (pneumonia, disenteria e tuberculose pulmonar) são determinantes para a letalidade. Pode ocorrer lesão renal pela formação de imunocomplexos e invasão às células glomerulares. A persistência da doença predispõe ao surgimento de áreas granulomatosas e hiperpigmentadas na pele chamadas de leishmaniose dérmica pós-calazar, uma forma dermatrópica da infecção pela espécie de *Leishmania donovani*. Nas formas maculares e hipopigmentadas a presença de parasitos é pequena, em compensação, as lesões eritematosas e nodulares concentram uma carga parasitária elevada (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005; KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

### 3.1.3 Tratamento

Os agentes com eficácia conhecida contra as formas de leishmaniose incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, pentamidina e miltefosina (Figura 4).



Figura 4 – Fármacos utilizados no tratamento das diferentes formas de leishmaniose.



Fonte: Autora (2022).

Os antimoniais pentavalentes (Sb<sup>V</sup>) constituem a primeira linha de fármacos em várias regiões do mundo para o tratamento das leishmanioses, estando em uso desde a década de 1940 (MOORE; LOCKWOOD, 2010). São fármacos administrados por via parenteral, associados a variados efeitos adversos, incluindo dor local, náusea, vômito, mialgia, diarreia e erupções cutâneas, até hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (GUERIN et al., 2002). Os representantes dessa classe são o antimoniato de meglumina (Glugantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®) (FRÉZARD; DEMICHELII; RIBEIRO, 2009). O mecanismo de ação dos Sb<sup>V</sup> parece necessitar da sua conversão à forma trivalente (Sb<sup>III</sup>), capaz de inibir a enzima tripanotona redutase, causando estresse oxidativo. O estibogluconato de sódio inibe diretamente a enzima DNA topoisomerase I levando à inibição da replicação e transcrição do DNA (POLONIO; EFFERTH, 2008).

A anfotericina B é um macrolídeo polieno isolado de culturas de *Streptomyces nodosus* (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Devido à baixa biodisponibilidade oral é administrada por via parenteral (PASSERO et al., 2013). Esse fármaco inibe a biossíntese de ergosterol presente na membrana celular do parasita, o que altera a permeabilidade da membrana, resultando em distúrbio eletrolítico e morte celular (BRITAIN, 1994; PASSERO et al., 2013). Devido ao grande potencial de causar nefrotoxicidade, manifestada por insuficiência renal aguda, é utilizada somente nos casos onde há resistência parasitária aos fármacos de primeira linha (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; SUNDAR; SINGH, 2018).

A miltefosina é um agente antineoplásico pertencente à classe das alquilfosfocolinas, cuja atividade sobre *L. donovani* é conhecida desde a década de 1980 (URBINA, 1997). Dos fármacos antileishmania, foi o primeiro a ser administrado por via oral, sendo um avanço na terapia desse grupo de doenças. Por outro lado, é fortemente contraindicada durante a gestação, devido ao seu alto potencial teratogênico e tempo de meia-vida de 7 dias. (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). O mecanismo de ação está relacionado à inibição da citocromo-c-oxidase, resultando em disfunção mitocondrial e morte de parasitas (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo isolado de *Streptomyces rimosus*, utilizado por via parenteral para o tratamento da LV e formulações tópicas para o tratamento da LC (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). O mecanismo de ação antibacteriano se dá pela ligação à subunidade 30S ribossomal, causando a produção de proteínas defeituosas, atuando de forma semelhante sobre *L. donovani* (NO, 2016). Apesar do seu baixo custo, de aproximadamente 10 dólares por paciente, a via de administração e efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade são fatores que limitam o seu uso (SUNDAR et al., 2007; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

A pentamidina é uma diamina aromática utilizada desde a década de 1940 no tratamento da leishmaniose visceral, porém atualmente é mais empregada nas formas severas de LC, administrada por via endovenosa ou intramuscular (MS, 2011). Efeitos secundários irreversíveis, como o desenvolvimento de diabetes *mellitus* insulino dependente, levaram à redução da utilização do fármaco (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006). O mecanismo de ação ainda não é completamente esclarecido, mas supõe-se que a pentamidina se liga ao DNA do cinetoplasto e interfere na replicação e transcrição mitocondrial, além de inibir a recaptação de poliaminas, como espermidina, essencial para crescimento e sobrevivência dos parasitas (SANDS; KRON; BROWN, 1985; PÉREZ-PERTEJO et al., 2006).

Portanto, considerando o que foi exposto acima, fica clara a existência de diversas limitações das opções farmacológicas disponíveis até o momento para o tratamento da leishmaniose, tanto em função dos efeitos adversos e toxicidade como na seleção de cepas de parasitas resistentes aos fármacos. Outro ponto de preocupação é a via de administração empregada que é majoritariamente por via parenteral. Embora a miltefosina seja administrada por via oral, a sua toxicidade, especialmente em mulheres de idade fértil, limita a sua utilização (ROATT et

al., 2020). Desse modo, a descoberta de outras entidades químicas que ofereçam melhor perfil farmacológico, comodidade e segurança para a população afetada se mostra muito necessária.

### 3.2 Métodos *in silico* empregados na descoberta e planejamento de fármacos

O caminho da descoberta de uma molécula promissora até o desenvolvimento de um medicamento eficaz, seguro e comercialmente viável é muito complexo e envolve um enorme esforço interdisciplinar (BISHT; SINGH, 2018). Com o avanço na pesquisa e desenvolvimento de áreas do conhecimento que constituem o escopo de atuação da química medicinal, como a química e as ciências biológicas, tornou-se possível planejar a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008). Partindo da premissa de que a grande maioria dos fármacos disponíveis precisam interagir efetivamente com uma macromolécula-alvo para desempenhar sua atividade farmacológica, o planejamento de candidatos a fármacos atualmente requer cada vez mais informações detalhadas sobre o alvo e o conjunto de ligantes de interesse (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Importante considerar que os avanços tecnológicos e investimentos maciços possibilitaram as indústrias farmacêuticas gerar grandes bases de compostos e realizar triagens biológicas automatizadas em larga escala (HTS, do inglês *High-Throughput Screening*) para a descoberta de moléculas bioativas (MONTANARI, 2011). Apesar disso, nota-se uma baixa produtividade em termos de lançamento de novos fármacos pela indústria farmacêutica, manifestada por um pequeno número de exemplares aprovados pelas agências reguladoras de medicamentos. Torna-se evidente que o modelo de triagem de um número cada vez maior de moléculas pode resultar em candidatos a fármacos que não terão êxito nos ensaios clínicos, precisando urgentemente de revisão (SCHNEIDER, 2012).

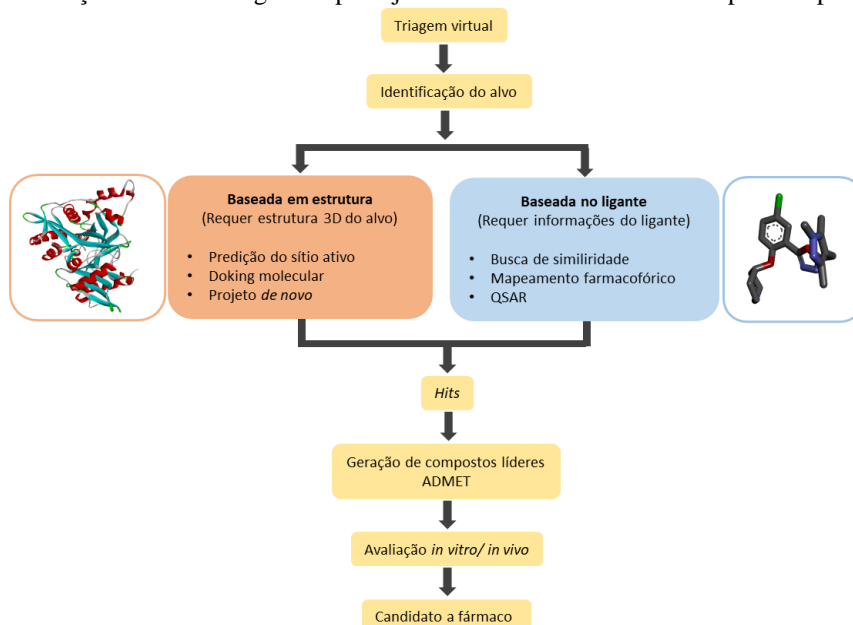
Nesse sentido, as ferramentas de desenho de fármacos auxiliados por computador (CAAD, do inglês *Computer Assisted Drug Design*), podem otimizar tempo e recursos injetados nos ensaios de rastreio experimentais (LEENANDA; LINDERT, 2016).

A triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*) é um termo introduzido desde a década de 1990, consistindo em uma ferramenta que utiliza algoritmos e modelos computacionais para a avaliação de novas moléculas com potencial terapêutico (SCHNEIDER, 2010). Desse modo, partindo de uma grande coleção de compostos depositados em bancos de dados,

a triagem virtual é utilizada para pré-selecionar aqueles com maior probabilidade de serem ativos, os quais serão priorizados nas metodologias experimentais *in vitro* (PATRICK, 2013). A detecção e seleção de moléculas ativas e não ativas é muito importante em uma pesquisa de descoberta de novos *hits* (termo inglês para designar composto líder ou bioativo) (ZHENG, 2008).

Na triagem virtual, os compostos orgânicos promissores são selecionados como ligantes de alvos moleculares de interesse, os quais na maioria das vezes são enzimas, receptores ou ácidos nucleicos. Como resultado, podem ser sintetizados e, posteriormente, avaliados por ensaios *in vitro*. As moléculas analisadas não necessariamente precisam existir e, com isso, não há consumo de material. Entretanto, dependendo da abordagem, este estudo necessita de conhecimento prévio das propriedades espaciais e energéticas que são responsáveis pela interação de um potencial ligante (KLEBE, 2006; RODRIGUES et al., 2012). Além disso, são requisitos a estrutura tridimensional (3D) da macromolécula alvo, determinada por ressonância magnética nuclear (RMN), difração de raio-X ou por computador através de estratégias de modelagem; e compostos com características físico-químicas similares às de fármacos já reconhecidos clinicamente (ANDERSON, 2003). As abordagens mais comumente empregadas nesta estratégia podem ser divididas em: triagem virtual baseada na estrutura (SBVS, do inglês *Structure-based Virtual Screening*) e triagem virtual baseada no ligante (LBVS, do inglês *Ligand-based Virtual Screening*) (Figura 5).

Figura 5 – Representação de metodologias de planejamento de fármacos auxiliado por computador.



Fonte: Adaptado de Leenanda; Lindert (2016).

### 3.2.1 Triagem virtual baseada em estrutura

Das abordagens VS os métodos de SBVS são considerados mais eficientes para o planejamento de novos fármacos. Essa estratégia engloba métodos que necessitam e exploram a estrutura tridimensional (3D) do alvo biológico (VÁZQUEZ et al., 2020), obtida de dados experimentais (cristalografia de raios-x, ressonância magnética nuclear ou técnicas de espalhamento de nêutrons) fator que limita a sua utilização quando o alvo biológico complementar a um ligante não é conhecido. Por outro lado, ao contrário das LBVS, não dependem unicamente de dados experimentais já disponíveis, uma vez que a estrutura 3D também pode ser derivada de modelagem por homologia ou de simulações de dinâmica molecular (LIONTA et al., 2014; BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019).

No SBVS a proteína de interesse é encaixada a bibliotecas de ligantes, disponíveis comercialmente através de algoritmos computacionais. A energia de ligação resultante desse encaixe é calculada através de funções de pontuação, necessitando de ensaios experimentais posteriores para validar a ligação (BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019).

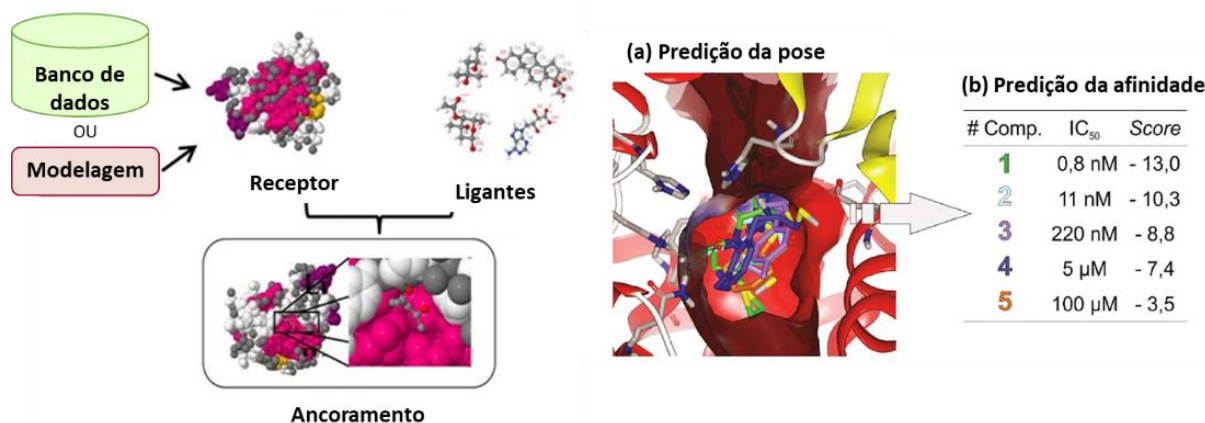
Os exemplos de métodos de SBVS mais comumente utilizados são o *docking* molecular e a dinâmica molecular. Essas técnicas computacionais têm grande aplicação na análise de energia de ligação e interação entre ligante e proteína, as simulações de dinâmica molecular também são capazes de avaliar as mudanças conformacionais que ocorrem durante o ancoramento (BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019).

#### 3.2.1.1 *Docking* Molecular

O *docking* molecular também conhecido como “atracamento molecular”, “ancoramento molecular” ou “docagem” é um método de desenho de fármacos baseado em estrutura que simula a interação molecular predizendo a orientação preferencial e afinidade de um ou mais ligantes no sítio ativo de proteínas (FAN; FU; ZHANG, 2019) (Figura 6). Na química medicinal, as aplicações do *docking* molecular incluem a identificação de sítio ativo de macromoléculas, novos alvos através de reposicionamento de fármacos, eventuais efeitos adversos e busca de novos *hits* contra um alvo ou conjunto de alvos de interesse, visando a geração de uma biblioteca rica em potenciais ligantes (BARREIRO; FRAGA, 2014; PINZI; RASTELLI, 2019). Em linhas gerais, essa abordagem visa à obtenção de um grupo de conformações do ligante

com seu alvo e classificação baseada nas estabilidades energéticas geradas no complexo ligante-receptor (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006). Existem dois tipos de *docking* molecular: ancoragem de ligante flexível e ancoragem de proteína flexível (BATTOOL; AHMAD; CHOI, 2019).

Figura 6 – Representação esquemática das etapas de *docking* molecular.



Fonte: Eweas; Maghrabi; Namaneh (2014); Piccirillo; Amaral (2018).

O *docking* molecular é realizado seguindo dois componentes inter-relacionados: algoritmos de busca e funções de pontuação. Os algoritmos de busca devem “pesquisar o cenário de energia potencial em detalhes suficientes para encontrar o mínimo de energia global” (BROOIJMANS; KKUNTZ, 2003). Ou seja, analisam e geram diferentes conformações e orientações para o ligante no sítio ativo da macromolécula, considerando os graus de liberdade rotacional-translacional e torcional (ângulos diedros) (BROOIJMANS; KKUNTZ, 2003; GIOIA et al., 2017; TORRES et al., 2019).

Na ancoragem de ligante flexível os algoritmos de busca são frequentemente classificados como sistemáticos, estocásticos ou determinísticos (BROOIJMANS; KKUNTZ, 2003). Os métodos de busca sistemática geram todas as poses possíveis do ligante através de modificações gradativas na conformação do ligante e pequenas variações nos parâmetros estruturais, a fim de convergir para a solução de energia mínima correspondente à pose mais provável do ligante (FERREIRA et al., 2015; (TESSARO; SCAPOZZA, 2020). As principais estratégias utilizadas pelos algoritmos sistemáticos são a busca conformacional e a busca por fragmentação. Nos métodos de busca conformacional, todas as ligações rotacionáveis são giradas

em 360°, buscando gerar todas as conformações possíveis. Enquanto os métodos de fragmentação são baseados na construção incremental do ligante no sítio receptor a fim de recriar o ligante original (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2006). FlexX, Glide e DOCK são exemplos de *softwares* que empregam abordagens de busca por fragmentação (RODRIGUES et al., 2012).

Nos algoritmos de pesquisa estocástica ou randômicos, a busca da conformação é realizada através da modificação aleatória dos parâmetros estruturais do ligante, geralmente alterando um grau de liberdade do sistema por vez (FERREIRA et al., 2015). Monte Carlo (MC) e algoritmos genéticos são dois exemplos de algoritmos que pertencem à classe dos métodos estocásticos. A estratégia Monte Carlo busca regiões de mínimos de energia após mudanças no espaço conformacional do ligante (BROOIJMANS; KKUNTZ, 2003). Os algoritmos genéticos, também chamados de evolucionários ou evolutivos, são técnicas de busca que simulam o processo de evolução natural. As poses dos ligantes são referidas por cromossomos constituídos por genes (ângulos de torção de moléculas). As populações de indivíduos (poses) podem evoluir através de mutação e cruzamento de genes, para que assim, aquelas com melhores pontuações produzam novas populações por meio de seleção dos indivíduos mais aptos (RODRIGUES et al., 2012; BARREIRO; FRAGA, 2014; PICCIRILO; AMARAL, 2018). Exemplos de ferramentas que utilizam algoritmos genéticos são AutoDock, Gold e DockThor.

Nos algoritmos determinísticos, por sua vez, o estado inicial determina a orientação e a conformação do ligante feita para gerar o próximo estado que, em geral, deve ser menor ou igual em energia ao estado inicial. Esse tipo de algoritmo requer um gasto computacional bastante elevado. Figuram como exemplos os métodos de minimização de energia e dinâmica molecular (TORRES et al., 2019).

A energia de ligação entre ligante e proteína é avaliada por funções de pontuação, sendo um aspecto crucial nos estudos de *docking* molecular. Quando apenas um ligante está ancorado em uma macromolécula, a função de pontuação deve inferir dentre as orientações previstas pelos algoritmos de busca, aquela que representa com maior precisão a possível estrutura real do complexo ligante-receptor (SETHI et al., 2019). Em contrapartida, em uma avaliação com múltiplos ligantes, a função de pontuação além de inferir a melhor pose, também precisa classificar os melhores valores de energia de ligação dos ligantes um em relação ao outro (MENG et al., 2011; LIU et al., 2018). A variação da energia decorrente da formação do complexo ligante-receptor é dada pela constante de ligação intrínseca ( $K_b$ ) e pela energia livre

de Gibbs ( $\Delta G^0$ ). Normalmente, a previsão da energia de ligação é realizada pela complementaridade estérica entre o ligante e o receptor, bem como sua complementaridade química (FERREIRA et al., 2015).

Existem três tipos de funções de pontuação: físico-químicas, experimentais e baseadas no conhecimento. As funções físico-químicas analisam os termos eletrostáticos e de van der Waals e íons metálicos do sítio de ligação. As funções experimentais são projetadas para a reprodução de um conjunto experimental de informações sobre a interação ligante-proteína. Já as funções com base no conhecimento utilizam dados estatísticos para reproduzir as geometrias de complexos ligante-proteína visualizadas experimentalmente (FERREIRA; GLAUCIUS; ANDRICOPULO, 2011; BARREIRO; FRAGA, 2014).

As estratégias baseadas na estrutura do alvo molecular são passíveis a falsos positivos e falsos negativos, sendo essa uma grande desvantagem do ancoramento molecular. Entretanto, muitos pontos compensam as suas limitações, por exemplo, o baixo custo de instalação, a não exigência de uma biblioteca de ligantes pré-existentes, potenciais novos ligantes podem ser incorporados em qualquer fase do desenvolvimento de fármacos e a velocidade computacional (CAVASOTTO; ORRY, 2007). Com relação a esse último ponto, uma das razões para a rapidez do *docking* se dá pelo ancoramento rígido ou semirrígido da proteína e uso de algoritmos de busca eficientes na resolução de problemas de muitas variáveis (BARREIRO; FRAGA, 2014).

### 3.2.2 Triagem virtual baseada em ligante

A LBVS utiliza informações de compostos bioativos já conhecidos, assim esses dados são usados para comparar e identificar outras moléculas com propriedades semelhantes em bibliotecas químicas. Desse modo, essas informações são utilizadas na classificação dos compostos aptos para seleção e testagem experimental de atividade biológica (LYNE, 2002). As técnicas de maior uso na LBVS incluem correlação quantitativa entre a estrutura e atividade biológica (QSAR, do inglês *Quantitative Structure Activity Relationship*), emprego de fármacos, busca de similaridade e aprendizado de máquinas (ALVES et al., 2017). Além disso, outra abordagem que pode ser utilizada, denominada triagem virtual inversa, é aplicada quando se pretende buscar possíveis alvos moleculares para uma molécula já conhecida e com atividade comprovada, em vez da procura de compostos para um alvo de interesse (SCIOR et al., 2012).



### 3.2.2.1 Triagem por Similaridade

A busca por similaridade está apoiada no princípio de que moléculas com estruturas semelhantes podem apresentar atividade biológica semelhante (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008). Dessa forma, a busca de compostos estruturalmente similares ao de referência, ou seja, aquele que apresenta atividade biológica conhecida, é uma das estratégias mais utilizadas em química medicinal, devido ao baixo custo computacional e eficiência na seleção de novos *hits*. A triagem por similaridade é baseada em “impressão digital molecular” (do inglês, *molecular fingerprint 2D*), que envolve transformar a molécula em uma sequência de *bits*, que pode ser facilmente comparada entre duas ou mais moléculas (ENGEL, 2006; WILLETT, 2006; CERETO-MASSAGUÉ et al., 2015).

Na química, as moléculas são descritas por cadeias binárias que representam a ausência ou presença de características estruturais específicas. Para lidar com variáveis binárias, ou seja, cujos valores são “1” ou “0”, vários coeficientes de similaridade podem ser empregados (TODESCHINI et al., 2012). O mais utilizado é o de Tanimoto que consiste na razão do número de *bits* comuns entre as impressões digitais, definido como “1”, pelo número total de *bits*. Assim, como descrito na Equação 1, o termo “a” representa o número de características presentes em uma molécula A e ausentes em uma molécula B; “b” significa características presentes em B e ausentes em A; e “c” diz respeito às características compartilhadas por ambas. Os resultados do coeficiente de Tanimoto são classificados em valores que variam de 0 a 1, desse modo, quanto mais próximo de 1, maior é a similaridade estrutural com a molécula de referência (BALDI; NASR, 2010; RODRIGUES et al., 2012).

$$T = \frac{c}{a + b - c} \quad (1)$$

### 3.2.2.2 Triagem por Padrão Farmacofórico

A modelagem do farmacóforo é um método baseado no alinhamento de conformações moleculares 3D. O farmacóforo é definido como um conjunto de propriedades estéricas e eletrônicas necessárias para assegurar as interações intermoleculares ideais com um alvo biológico, bem como favorecer ou inibir a sua resposta biológica (SEIDEL et al., 2020). Desse

modo, a teoria por trás da modelagem farmacofórica é que padrões químicos comuns em arranjos 3D semelhantes, levam à atuação na mesma enzima, proteína ou receptor biológico (VUORINEN; SCHUSTER, 2015). Essas características comuns incluem a distância de átomos ou grupos funcionais, ângulos de ligação, regiões volumosas, átomos específicos, grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, anéis aromáticos ou grupos hidrofóbicos (MASON; GOOD; MARTIN, 2001).

A geração de um modelo farmacofórico pode servir de molde para a busca em bancos de dados por *hits* que satisfaçam os arranjos moleculares associados à atividade biológica (RODRIGUES et al., 2012). Como esses modelos não se concentram em átomos ou grupos funcionais, mas em propriedades estereoeletrônicas, moléculas que são estruturalmente diferentes e com padrões farmacofóricos similares, podem ser reconhecidas pelo mesmo sítio de ligação em um alvo macromolecular (SEIDEL et al., 2020). Dessa forma, o objetivo geral da modelagem farmacofórica é prever a atividade através da classificação das moléculas em ativas (aqueles que correspondem ao modelo) e inativas (moléculas que não se encaixam no modelo) (VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

Entre os serviços que se propõem a modelar farmacóforos, tem-se como exemplo o servidor *web* PharmaGist (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>), desenvolvido por Schneidman-Duhovny et al. (2008). O servidor não requer a estrutura do alvo macromolecular, porém necessita de um conjunto de ligantes ativos contra um alvo específico. Os possíveis modelos farmacofóricos são obtidos por alinhamento flexível dos ligantes, sendo então listados por ordem de pontuação (*score*). Em geral, o modelo farmacofórico escolhido para a triagem virtual baseada em farmacóforo é aquele que além da maior pontuação de alinhamento, apresenta as características químicas importantes para a atividade validadas estatisticamente (DOS SANTOS et al., 2020).

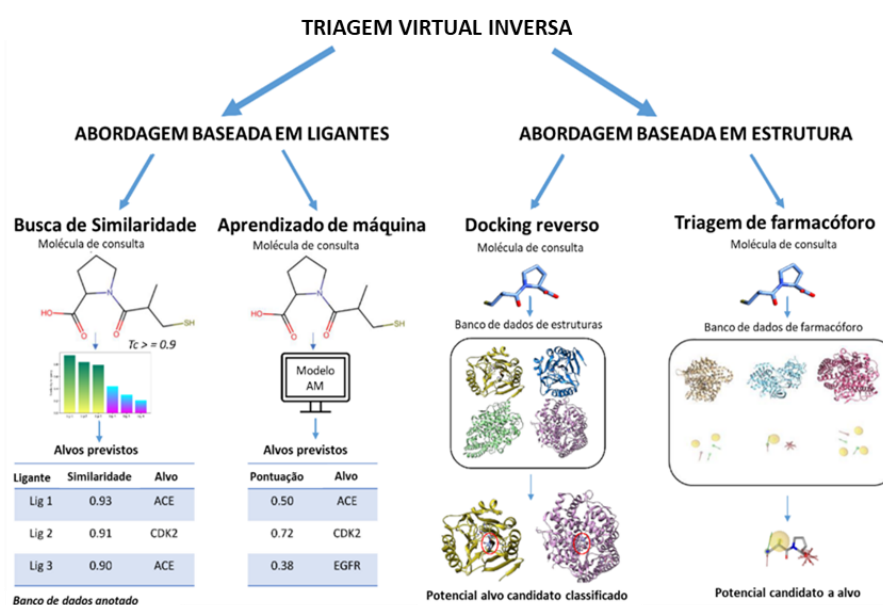
### 3.2.3 Triagem virtual inversa

O termo “triagem virtual inversa” ou “pesca de alvo *in silico*” é utilizado para “denominar as estratégias que buscam identificar alvos potenciais ou não intencionais para um determinado ligante a partir de um grande número de receptores, examinando seus ligantes ou estruturas cristalográficas conhecidas” (HUANG et al., 2018). Essas técnicas são consideradas alternativas promissoras, uma vez que os métodos convencionais para identificação de alvos

biológicos são caros e demorados, pois se baseiam no isolamento de proteínas, análise espectrométrica e expressão de mRNA (GALATI et al., 2021). Além de triar alvos para moléculas bioativas que não possuem alvo farmacológico definido, como os produtos naturais, esses métodos possibilitam explorar novas indicações terapêuticas para fármacos já conhecidos (e.g. reposicionamento de fármacos), bem como detectar reações adversas e toxicidade de fármacos (HUANG et al., 2018).

Assim como na triagem convencional, a triagem virtual inversa se divide em métodos baseados em ligantes e métodos baseados em estrutura (LIU et al., 2014) (Figura 7).

Figura 7 – Visão geral das abordagens de triagem virtual inversa.



Fonte: Galati et al. (2021).

Os métodos baseados em ligantes mais simples são apoiados na similaridade química e similaridade de forma, de uma perspectiva bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). Na perspectiva 2D o princípio básico é de que moléculas semelhantes provavelmente terão propriedades farmacológicas semelhantes. O descritor universal para esse tipo de comparação é o *fingerprint* (ver item 3.2.2.1). Do ponto de vista 3D, a premissa é que moléculas com volumes semelhantes potencialmente podem se ligar a espaços do mesmo tamanho ou semelhante no sítio ativo de proteínas, considerando o efeito de ajuste induzido pelo ligante (HUANG et al., 2018). Portanto, a predição dos alvos se dá através da identificação de macromoléculas com ligantes conhecidos que são quimicamente semelhantes à molécula de consulta. Esses métodos

têm como vantagem o baixo custo computacional, uma vez que necessitam apenas de cálculos de similaridade estrutural entre o conjunto de compostos analisados (CERETO-MASSAGUÉ et al., 2015). Exemplos de *softwares* que empregam o princípio da similaridade para prever direta ou indiretamente alvos potenciais são o TargetHunter (<https://www.ranksays.com/siteinfo/targethunter.net>), SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) e Similarity ensemble approach (SEA) (<https://sea.bkslab.org/>) (CHÁVEZ-FUMAGALLI, 2018).

As abordagens mais importantes de triagem virtual inversa baseada em estrutura são o *docking* reverso e a triagem por farmacóforo baseada em receptores. O fundamento teórico dos métodos de triagem farmacofórica baseada em receptores é que a ligação de uma molécula a um alvo proteico é decorrente da presença de porções funcionais no ligante que permitem a sua interação com o alvo. Todos os modelos farmacofóricos correspondentes pré-definidos com base na estrutura do ligante-proteína resultam em uma lista de possíveis alvos e perfil alvo/atividade farmacológica (ROGNAN, 2010).

*Docking* reverso consiste no ancoramento computacional de uma pequena molécula de interesse a uma biblioteca de estruturas de alvos moleculares. Essa abordagem pode ser utilizada na identificação de potenciais alvos biológicos de candidatos a fármacos, na descoberta de novos efeitos terapêuticos de fármacos conhecidos, também chamado de reposicionamento de fármacos, bem como para evitar ligação a outras proteínas e efeitos adversos, que prejudicam o desenvolvimento de novos fármacos (GRINTER et al., 2011).

Em geral, os passos para a realização do *docking* reverso são a geração de um banco de dados de estruturas cristalográficas, previsão da conformação energeticamente favorável dos ligantes no sítio ativo de cada proteína e a classificação dos alvos com base na afinidade de ligação do complexo formado (GALATI et al., 2021). Os bancos de dados são formados por estruturas cristalográficas baixadas de grandes bases de dados, como o Protein Data Bank (PDB), as quais são tratadas manualmente através de procedimentos comuns no *docking* tradicional, como a retirada de moléculas de água e adição de hidrogênios (HUANG et al., 2018). Preferencialmente, a definição das características do sítio ativo é realizada em função da presença de um ligante co-cristalizado. No entanto, na ausência de um ligante, o sítio ativo pode ser definido através de ferramentas de localização de sítio ativo. Negi et al. (2013) utilizaram a ferramenta de busca de sítio ativo MOE (*Molecular Operating Environment*)

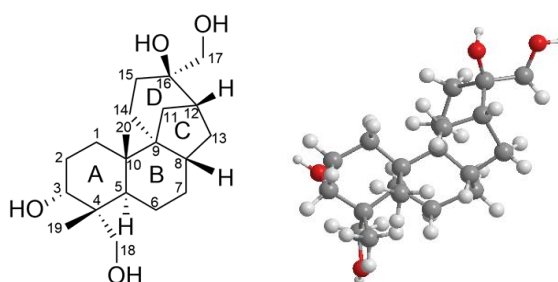
(<https://www.chemcomp.com/Products.htm>) em seu estudo de *docking* reverso para identificação de potenciais alvos proteicos de *Plasmodium falciparum* para alcaloides da espécie vegetal *Cassia siamea*.

A pontuação de encaixe entre o ligante e os alvos do banco de dados é um critério de classificação dos diferentes receptores na triagem. O encaixe mais estável é aquele com menor valor de energia. Assim o valor mais negativo de afinidade de ligação significa uma interação mais forte entre o ligante e a proteína, sugerindo que aquele pode ser um alvo potencial para a molécula de interesse (HUANG et al., 2018; GALATI et al., 2021).

### 3.3 Afidicolina

Afidicolina (C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>) é um diterpeno tetracíclico caracterizado pelo esqueleto biciclooctano nos anéis C e D (Figura 8), produzido por culturas dos fungos endofíticos *Cephalosporium aphidicola* Petch e *Nigrospora sphaerica*, cuja estrutura química foi evidenciada em estudos de Brundret et al. (1972) a partir de estudos químicos e de cristalografia de raio-X (BRUNDRET; DALZIEL; HESP, 1972; STARRATT; LOSCHIAVO, 1973). Alguns fungos produtores deste metabólito podem parasitar culturas de cereais como trigo, arroz, aveia e cevada, podendo ser encontrados em seus grãos (SPADARI; SALA; PEDRALI-NOY, 1982).

Figura 8 – Estrutura química da afidicolina.



Fonte: Autora (2022).

Os primeiros estudos envolvendo a afidicolina demonstraram seu potencial como um potente agente antiviral, atuando sobre *Herpes simplex* tipo 1 e 2 e *Vaccinia virus*, além de ser ativa contra ceratite herpética em coelhos, um tipo de infecção da córnea provocada pelo herpes vírus (BUCKNALL et al., 1973). Efeitos sobre a síntese do DNA viral de adenovírus em células HeLa foram observados pela primeira vez por Longiaru et al. (1979).

É reconhecida a propriedade antimitótica da afidicolina sobre linhagens celulares de neuroblastoma (CINATL et al., 1992), de células tumorais corticotróficas (AtT-20) (KAGEYAMA et al., 2015) e carcinoma cervical humano (YU; ZHAO; WANG, 2015). Entretanto, seu uso como agente antitumoral foi limitado pela baixa solubilidade em água e pela rápida metabolização do álcool em C-3 ao derivado inativo 3-cetoafidicolina, por ação de enzimas do complexo citocromo P450 (EDELSON; GORYCKI; MACDONALD, 1990). Essas limitações levaram ao desenvolvimento do 17-glicinato-afidicolina, um análogo sintético que possui uma fração éster solúvel em água (PEDRALI-NOY et al., 1982; O'DWYER et al., 1994). Esse análogo apresentou atividade em modelos *in vivo* de câncer de ovário humano, além disso, foi submetido a ensaios clínicos de fase I que estabeleceram a dosagem e infusão contínua de 24h como o esquema recomendado dessa molécula como agente de sincronização celular ou em combinação com a cisplatina (SESSA et al., 1991; O'DWYER et al., 1994).

O mecanismo de ação da afidicolina na atividade antitumoral ocorre pela inibição seletiva da enzima DNA-polimerase- $\alpha$  de eucariotos (BERGER et al., 1979). Diferente de outros análogos de nucleotídeos, a afidicolina não age sobre outras rotas metabólicas envolvidas na síntese de ácido nucleico, como por exemplo metilação do DNA, biossíntese do ácido ribonucleico (RNA), proteínas e nucleotídeos (BARANOVSKIY et al., 2014). Atualmente, devido à inibição seletiva da DNA-polimerase a afidicolina é comumente utilizada na prática laboratorial como um sincronizador do ciclo celular sem indução de apoptose ou senescência celular (MISHRA et al., 2019).

Estudos com derivados semissintéticos da afidicolina modificados em regiões específicas da molécula vêm sendo realizados para avaliar de forma racional o seu potencial antiparasitário. Em investigação realizada por Kayser et al. (2001) do potencial leishmanicida da afidicolina e de seus 17 derivados semissintéticos, foi demonstrado que a atividade leishmanicida dos compostos mais ativos está muito relacionada à estrutura primária da afidicolina, permitindo apenas poucas modificações no padrão de substituição, além disso, os compostos mais hidrofílicos foram mais eficazes na morte de amastigotas de *Leishmania donovani*. A análise desenvolvida por Santos et al. (2014) contra *Leishmania* spp. revelou que os compostos mais ativos mantinham a hidroxila livre (OH) em posição específica (C3), bem como, apresentaram bons parâmetros para uma boa biodisponibilidade oral. Outro estudo realizado por Santos et al. (2016) testou sete afidicolanos contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e mostrou que três deles foram mais ativos que a afidicolina.

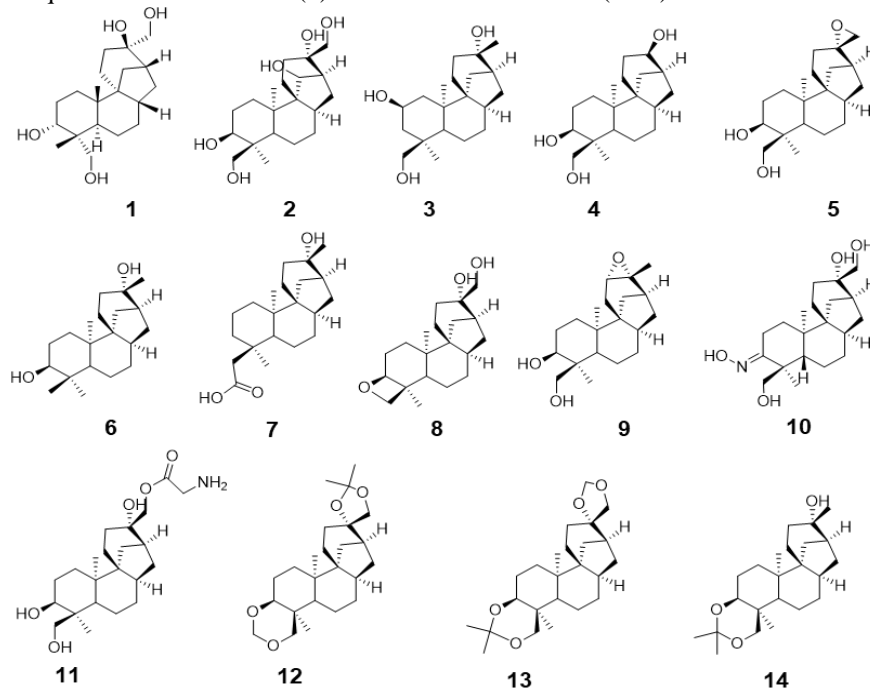
O mecanismo pelo qual a afidicolina e seus derivados causam a morte dos parasitas é desconhecido, entretanto, a inibição da DNA polimerase- $\alpha$  dos parasitas demonstra ser improvável ou parece diferir das enzimas encontradas em mamíferos. Isso pode ser explorado para novas abordagens terapêuticas, em função da seletividade da molécula e seus derivados. Desse modo, a elucidação das interações envolvidas entre o composto e o alvo molecular é de grande importância para o entendimento do mecanismo de ação desse produto natural.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Seleção e preparo das moléculas

A molécula pivô escolhida para as simulações computacionais foi a afidicolina (**1**). A estrutura de **1** foi selecionada do banco de dados EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>) (Figura 9). Já os derivados afidicolanos (**2-14**) testados contra *Leishmania* spp. em estudos de Kayser et al. (2001) e Santos et al. (2014) tiveram suas estruturas desenhadas no *software* ChemDraw Ultra 12.0 e foram salvas no formato MDL Molfile (.mol). Em seguida, a otimização da estrutura 3D foi realizada no *software* ChemSketch, por método de mecânica molecular.

Figura 9 – Estruturas químicas da afidicolina (**1**) e derivados afidicolanos (**2-14**).



Fonte: Autora (2022).

### 4.2 Predição da similaridade estrutural

A análise da similaridade estrutural entre os derivados e a afidicolina foi realizada no servidor *web* BindingDB DataBase (<https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>), através da seção “*Do Virtual Screening*”. Primeiramente a molécula pivô foi adicionada e, em seguida, os derivados foram salvos e carregados em um único arquivo no formato SDF. A similaridade foi



calculada pelo método “*Maximum similarity to any active*”, e o resultado expresso como índice de similaridade de Tanimoto.

### 4.3 Triagem virtual inversa

#### 4.3.1 Pesquisa de alvos de *Leishmania* spp.

Para a pesquisa de alvos de *Leishmania* spp., foi utilizado o banco de dados Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>). Preferencialmente, os alvos que possuíam ligantes co-cristalizados foram selecionados e, em seguida, os esses ligantes foram comparados com a molécula de afidicolina em relação à similaridade estérica e eletrônica (50%est./50%ele.) através do *software* BIOVIA Discovery Studio® v. 20.1.0, de acordo com metodologia descrita por Cruz et al. (2018). Os alvos cujos ligantes tiveram valores de *molecular overlay* superiores a 0,5 comparados com a afidicolina, foram selecionados para as etapas seguintes.

#### 4.3.2 Preparo dos ligantes co-cristalizados e alvos para *docking* molecular

Os ligantes co-cristalizados foram extraídos do arquivo “.pdb” e otimizados no *software* ChemScketch (ver item 4.1 *Seleção e preparo das moléculas*). No *software* Discovery Studio, os alvos selecionados tiveram as moléculas de água, ligantes co-cristalizados e cofatores excluídos do arquivo “.pdb”. As coordenadas *xyz* dos ligantes co-cristalizados foram utilizadas para a composição do *grid center* na próxima etapa. As moléculas foram salvas no formato “.pdb”.

#### 4.3.3 Re-*docking*

Para realizar os cálculos de re-*docking*, foi utilizado o servidor *web* DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2/>), com os parâmetros para os ligantes: *Rotatable bonds Enable All* e “*Add hydrogens disabled*”. As coordenadas do *grid center* foram determinadas de acordo com as coordenadas *xyz* do ligante co-cristalizado (de referência), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Receptores triados, coordenadas *xyz* do centro do Grid e tamanho do Grid Box utilizados nos ensaios de *Docking* molecular.

Receptor	Coordenadas do centro do Grid	Tamanho do Grid Box
MAPK ( <i>L. major</i> ) PDB ID: 3UIB	X= 5,5905	20x
	Y= 30,1680	20y
	Z= 39,2342	20z
NMT-01 ( <i>L. major</i> ) PDB ID: 4CGL	X= 1,8921	20x
	Y= 48,4279	20y
	Z= 59,1623	20z
NMT-02 ( <i>L. major</i> ) PDB ID: 4CYN	X= 4,2279	20x
	Y= 48,0411	20y
	Z= 59,6157	20z
NMT-03 ( <i>L. major</i> ) PDB ID: 5A28	X= 3,5234	20x
	Y= 50,5583	20y
	Z= 61,6428	20z
NMT-04 ( <i>L. major</i> ) PDB ID: 6QDE	X= 6,3521	20x
	Y= 48,8952	20y
	Z= 60,5808	20z
MetRS ( <i>L. major</i> ) PDB ID: 6SWX	X= -34,7956	20x
	Y= -38,9933	20y
	Z= 27,759240	20z

Fonte: Autora (2022).

O *grid size* foi padronizado em 20x20x20 e *discretization* 0,25. A precisão do algoritmo foi determinada pelos seguintes valores: *Number of evaluations* (n= 1.000.000), *Population size* (n= 750), *Inicial seed* (-1985), *Number of runs* (n=24) e *softening the MMFF94S Buf-14-7 potential* de 0,35. Os arquivos foram então enviados ao servidor para a realização do ancoramento. Posteriormente, os resultados do *docking* molecular foram analisados para *RMSD to cluster conformers* igual a 2 e *Number of binding modes* igual a 10. Por fim, as posições de *docking* foram comparadas com a conformação do ligante co-cristalizado com a proteína. Os alvos cujas poses de re-*docking* e cristalizada apresentaram diferença menor que 2 Å foram priorizados para a etapa seguinte.

#### 4.3.4 *Docking* molecular da afidicolina e derivados

Os cálculos de *docking* molecular da afidicolina com os alvos macromoleculares selecionados na etapa anterior foram realizados no DockThor (GUEDES; KREMPSEK; DARDENNE, 2017) utilizando os mesmos parâmetros estabelecidos nos cálculos de re-*docking*.

De acordo com metodologia apresentada por V da Costa et al. (2019), testes estatísticos foram aplicados para fins comparação da seletividade das moléculas pelos alvos avaliados. Assim, os melhores valores de afinidade de ligação ( $n=7$ ) foram submetidos ao *software* GraphPad Prism 8.0.1 para a realização dos testes ANOVA-*one way* seguido do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Nesta etapa, a miltefosina foi utilizada como controle negativo, por não apresentar atividade farmacológica reconhecida sobre os alvos elencados, enquanto os ligantes co-cristalizados foram utilizados como controles positivos.

#### 4.4 Geração do modelo farmacofórico

A obtenção do padrão farmacofórico das estruturas selecionadas (ver Figura 9) se deu pelo alinhamento da molécula pivô (**1**) com os derivados (**2-14**). As estruturas salvas no formato SDF foram carregadas para o *software* Discovery Studio, onde foram sobrepostas na ordem de similaridade à afidicolina. As moléculas foram salvas em um único arquivo “Mol2” e submetidas ao servidor *web* PharmaGist para alinhamento flexível múltiplo dos ligantes (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>).

No PharmaGist foram analisadas as seguintes características farmacofóricas: átomos (ATM), características espaciais (CE), aromáticos (ARO), hidrofóbicos (HID), grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) e grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBD). Ao final, foi gerada uma página *web* elencando os modelos farmacofóricos de maior pontuação compartilhados por um número específico de moléculas, e um arquivo de saída com o candidato a farmacóforo 3D de maior pontuação (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008). O modelo farmacofórico que apresentou o melhor *score* e que contemplou todas as moléculas alinhadas foi utilizado nas etapas seguintes.

#### 4.5 Avaliação do modelo farmacofórico

As características farmacofóricas mencionadas anteriormente foram utilizadas para avaliação do modelo farmacofórico através de métodos estatísticos para comprovação do alinhamento das estruturas. O método de correlação linear de Pearson foi utilizado para mostrar as características farmacofóricas e a relação com a similaridade estrutural da molécula pivô. A medida desse coeficiente varia de -1 a +1. O coeficiente igual a 0 indica que não relação linear;

de 0,2 a 0,4 uma correlação fraca; 0,4 a 0,7 uma correlação moderada; 0,7 a 0,9 correlação forte; =1 ou -1 indica uma correlação perfeita. Na análise foi considerado também o valor de significância de  $p \leq 0,05$  para demonstrar se a correlação entre as variáveis é estatisticamente significativa.

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) executada no *software* Minitab 19.2020.1.0, foi utilizada para avaliar a similaridade ou diferenças entre os descritores farmacofóricos, bem como do conjunto de moléculas estudado. A distância euclidiana e a correlação de Pearson foram empregados para medição da similaridade.

#### 4.6 Triagem virtual por padrão farmacofórico

O melhor modelo farmacóforo obtido no PharmaGist foi utilizado como entrada no servidor *web* Pharmit (<http://pharmit.csb.pitt.edu/>) para a busca de moléculas comerciais no banco de dados MolPort (<https://www.molport.com/shop/index>).

O servidor permite a criação de filtros de propriedade fármaco-similar para refinar os resultados da triagem virtual. Assim, o *software* Osiris DataWarrior foi utilizado para calcular o peso molecular (PM), coeficiente de partição (Log P), grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBD), número de ligações rotacionáveis (NRB) e área de superfície polar topológica (TPSA) da afidicolina e derivados afidicolanos. O menor e o maior valor obtido para cada uma das propriedades foram utilizados para a construção do filtro.

#### 4.7 Predição da similaridade estrutural dos novos *hits*

Os novos *hits* encontrados nessa etapa foram submetidos à plataforma Binding DB para avaliação da similaridade estrutural. As moléculas que apresentaram similaridade  $> 0,3$  à afidicolina foram selecionadas para a avaliação toxicológica, de acordo com ponto de corte estabelecido por Araújo et al. (2020).

#### 4.8 Predição da toxicidade e farmacocinética

A toxicidade dos novos *hits* foi avaliada em termos de alertas estruturais de toxicidade pelo *software* Derek Nexus®, incluindo hepatotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, cardiotoxicidade, mutagenicidade, proliferação de peroxissomos e fosfolipidose em humanos, ratos e camundongos.

Os compostos que não apresentaram alertas de toxicidade tiveram seu perfil farmacocinético avaliado pelo servidor *web* PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). Os parâmetros farmacocinéticos analisados consistiram em: permeabilidade em linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano ( $P_{\text{Caco-2}}$ ), percentual de absorção intestinal humana (AIH%), permeabilidade às células Madin-Darby Canine Kidney ( $P_{\text{MDCK}}$ ), percentual de ligação às proteínas plasmáticas (LPP %), coeficiente de partição cérebro-sangue (BHE) e inibição da glicoproteína P (P-gp). Também foi realizada a predição para a afidicolina e derivados afidicolanos e ligantes co-cristalizados para fins de comparação. A miltefosina foi utilizada como controle comercial, pois é o único fármaco leishmanicida utilizado por via oral.

#### 4.9 Predição da solubilidade em água

Os *hits* sem alertas estruturais de toxicidade e com os melhores perfis farmacocinéticos foram submetidos à predição do coeficiente de solubilidade em água (Log S), realizada no servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) através dos métodos ESOL (DELANEY, 2004), Ali (ALI et al., 2012) e SILICOS-IT (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Posteriormente, a média dos valores previstos pelos três métodos foi calculada, seguida da classificação quanto à solubilidade: insolúvel, muito pouco solúvel, moderadamente solúvel, solúvel, muito solúvel e altamente solúvel. Somente as moléculas com melhor solubilidade do que a miltefosina foram selecionadas nesta etapa.

#### 4.10 Predição da viabilidade sintética de ligantes

As estruturas dos ligantes selecionados na etapa anterior foram submetidas ao servidor SwissADME para a predição da acessibilidade sintética. Esse servidor organiza os resultados em *scores* de 1 a 10, sendo que quanto mais próximo de 1, mais fácil uma substância

poderá ser sintetizada, enquanto que mais próximo de 10, mais difícil será para sintetizar essa substância (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Apenas os *hits* com *scores* de acessibilidade sintética inferiores ao da miltefosina foram priorizados para a etapa seguinte.

#### 4.11 Docking molecular dos novos *hits*

A fim de avaliar a energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) das novas moléculas aos receptores destacados neste estudo, foi realizada outra etapa de *docking* molecular utilizando os mesmos critérios descritos na seção 3.3.3 (*Re-docking*). Cada um dos *hits* selecionados nas etapas descritas anteriormente, foram ancorados às cavidades de ligação dos alvos de *L. major* eleitos neste trabalho.

A análise estatística descrita no item 4.3.4 (*Docking* molecular da afidicolina e derivados) foi empregada para avaliar as afinidades de ligação dos novos *hits* com os alvos avaliados utilizando ANOVA-*one way* e teste de Tukey, bem como para determinar a seletividade de um mesmo *hit* sobre diferentes alvos biológicos utilizando ANOVA-*two way* seguido do teste de Sidak ( $p \leq 0,05$ ).

Além disso, a seletividade dos novos *hits* foi avaliada através da Equação 2:

$$IS = \frac{\Delta G_{\text{Alvo A}}}{\Delta G_{\text{Alvo B}}} \quad (2)$$

onde  $\Delta G$  é o valor de afinidade de ligação de uma molécula ancorada em um alvo A em razão do ancoramento em um alvo B.

#### 4.12 Predição da atividade biológica

A predição da atividade biológica *in silico* dos ligantes promissores foi avaliada via PASS Online (<http://way2drug.com/passonline/predict.php>). Esse servidor fornece a probabilidade que uma molécula apresenta para determinada atividade biológica ( $P_a$ ), em detrimento da probabilidade que a mesma molécula tem em ser inativa para uma dada atividade farmacológica ( $P_i$ ). No presente estudo, foram considerados satisfatórios valores de  $P_a > 0,3$ .

O esquema geral que sumariza as etapas metodológicas deste trabalho é apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Esquema geral das etapas metodológicas do estudo *in silico*.

Fonte: Autora (2022).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem virtual inversa

A busca por alvos macromoleculares na base de dados PDB resultou em 209 estruturas cristalográficas de *L. major*. Desse total, 175 possuíam ligantes co-cristalizados, sendo então priorizadas para as próximas etapas. Após a inspeção visual dos ligantes co-cristalizados e a realização do cálculo da similaridade estérica e eletrônica (50%est./50%ele.), utilizando a afidicolina como molécula pivô, o número de estruturas cristalográficas foi reduzido a 38, uma vez que o ponto de corte estabelecido foi a similaridade estereoelétrica superior a 0,5. De acordo com o método de “pesca de alvos” proposto por Wang et al. (2013) um valor de coeficiente de similaridade de Tanimoto superior a 0,5 é considerado um limite adequado para excluir alvos irrelevantes ou falsos positivos. A ferramenta PTS (do inglês *pharmaceutical target seeker*) prevê alvos para uma molécula através da sobreposição da sua estrutura com estruturas de ligantes 3D de alvos macromoleculares, valores abaixo de 0,6 indicam uma baixa similaridade de forma (DING et al., 2017)

As 38 estruturas proteicas resultantes foram ancoradas com seus ligantes co-cristalizadas para validar a conformação e a orientação dos ligantes no sítio ativo das enzimas. Posteriormente, o desvio médio quadrático (do inglês “*Root Mean Square Deviation*” – RMSD) foi calculado considerando as poses dos ligantes de referência obtidas pelo ensaio de *re-docking* e aquelas provenientes da resolução da estrutura cristalográfica. O modo de interação entre o ligante e o receptor obtido por técnicas de cristalografia de raio-X é tido como a possível conformação ativa do ligante, por esse motivo, as estruturas cristalográficas são imprescindíveis para técnicas SBVS. O cálculo de *re-docking* avalia a capacidade do método em reproduzir a orientação e o modo de ligação do posicionamento cristalográfico experimental. Assim, essa reprodução é dita bem sucedida quando o valor de RMSD está abaixo de 2,0 Å (WARREN et al., 2006; E LOHNING et al., 2017).

A partir dos critérios supracitados, apenas 6 estruturas cristalográficas representando três classes proteicas distintas, foram selecionadas: MAP-quinase (MAPK), N-miristoil-transferase (NMT) e Metionil tRNA sintetase (MetRS), como apresentado na Tabela 3 e na Figura 11.



Tabela 3 – Estruturas cristalográficas selecionadas com base na similaridade eletrostática e valores de RMSD.

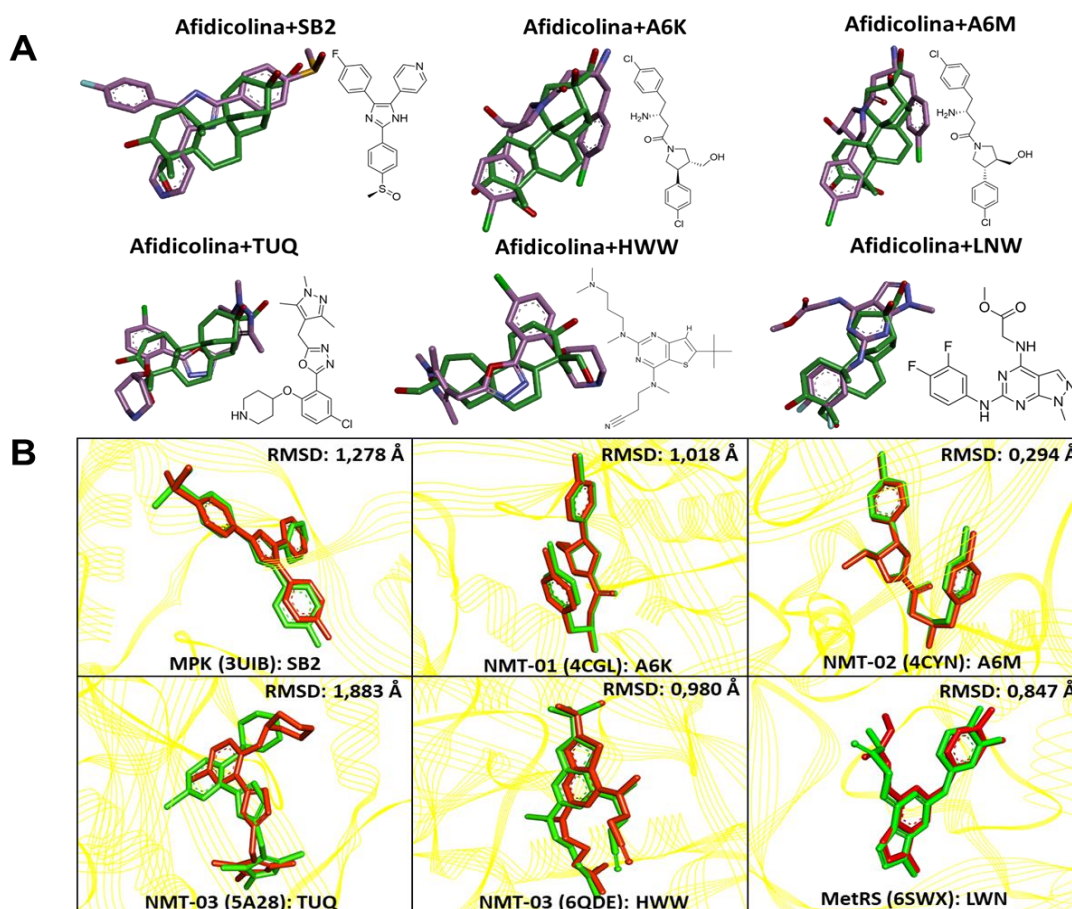
Código PDB	Estrutura cristalográfica		Similaridade de sobreposição		Redocking	
	Res (Å)	Classe proteica	Código Ligante	50est/ 50ele*	$\Delta G$ (kcal/mol) <sup>#</sup>	RMSD (Å)
3UIB	2,65	Map quinase (MAPK)	SB2	0,515	-9,117	1,278
4CGL	1,48	N-miristoiltransferase (NMT-01)	A6K	0,600	-10,008	1,018
4CYN	1,40	N-miristoiltransferase (NMT-02)	A6M	0,549	-9,895	0,294
5A28	1,48	N-miristoiltransferase (NMT-03)	TUQ	0,569	-9,580	1,883
6QDE	1,45	N-miristoiltransferase (NMT-04)	HWW	0,524	-8,514	0,980
6SWX	1,95	Metionil tRNA sintetase (MetRS)	LWN	0,547	-9,876	0,847

Fonte: Autora (2022). \*Valor de similaridade eletrônica (50%) e estérica (50%) entre o ligante co-cristalizado e a afidicolina. <sup>#</sup>Valor de energia de ligação.

Os valores de similaridade estérica/eletrônica, revelam que **A6K** [(3R)-3-azanyl-4-(4-clorofenil)-1-[(3S, 4R)-3-(4-clorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-1-il] butan-1-ona] mostrou o maior valor de similaridade 2D à afidicolina (0,600), seguido de **TUQ** [4-(4-Cloro-2-{5-[(trimetil-1h-pirazol-4-il)metil]-1,3,4-oxadiazol-2-il}fenoxi)piperidina] com 0,569 e **A6M** [(3R)-3-amino-4-(4-clorofenil)-1-[(3R,4S)-3-(4-clorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]butan-1-ona], com 0,549.

Fatores estéricos como volume, tamanho e forma influenciam como uma molécula pode se aproximar e interagir com um sítio de ligação. Dessa forma, o volume do substituinte pode ajudar a orientar a molécula a interagir adequadamente ou impedir a interação no sítio ativo. Por outro lado, os fatores eletrônicos dos substituintes têm efeito na ionização ou polaridade de um ligante, podendo prever a facilidade com que o ligante pode permear barreiras biológicas ou a afinidade com um sítio de ligação (PATRICK, 2013). A maior similaridade estereoeletrônica com a afidicolina observada para as moléculas descritas acima pode ser resultante do volume semelhante e da presença de grupos polares sobrepostos.

Figura 11 – (A) Similaridade eletrônica (50%) e estérica (50%) entre ligantes nativos dos alvos selecionados e a afidicolina. Molécula de afidicolina em verde e ligantes co-cristalizados em roxo. (B) Re-docking dos ligantes nativos dos alvos selecionados. Em verde pose experimental e em vermelho pose prevista *in silico*.



Fonte: Autora (2022).

## 5.2 Docking molecular da afidicolina e derivados

Para a realização da etapa de ancoragem molecular com a afidicolina e os derivados afidicolanos, o sítio de ligação foi determinado a partir das poses cristalográficas dos respectivos ligantes complexados.

A Tabela 4 mostra os valores de afinidade de ligação ( $\Delta G$ ) observados para as moléculas e alvos analisados. Observa-se que os melhores valores de afinidade de ligação foram encontrados para as enzimas NMT, especialmente NMT-03 (Código PDB: 5A28) com  $-9,250$  kcal/mol quando ancorado com a afidicolina, e média geral de  $-9,349$  kcal/mol, considerando os derivados afidicolanos, seguida de NMT-01 ( $-9,207$  Kcal/mol) e NMT-02 ( $-9,029$  Kcal/mol). Valores menos negativos de afinidade de ligação foram observados no ancoramento da afidicolina e derivados com o alvo MetRS (Código PDB: 6SWX), com média de  $-7,931$  kcal/mol.

Já o valor médio de afinidade de ligação com MAPK (PDB: 3UIB) foi de -8,193 kcal/mol. Quanto mais baixo (mais negativo) é o valor de energia do encaixe, maior a probabilidade de ligação forte entre o ligante a proteína (GALATI et al., 2021).

Tabela 4 – Cálculo de *docking* molecular da afidicolina (1) e derivados (2-14) com alvos parasitários.

Molécula	Afinidade de ligação (Kcal/mol)					
	MAPK (3UIB*)	NMT-01 (4CGL*)	NMT-02 (4CYN*)	NMT-03 (5A28*)	NMT-4 (6QDE*)	MetRS (6SWX*)
1	-8,825	-9,075	-9,175	-9,250	-8,538	-7,762
2	-7,471	-9,174	-9,245	-9,074	-8,724	-8,052
3	-8,900	-9,131	-9,198	-9,453	-9,393	-7,720
4	-8,002	-9,089	-8,903	-9,048	-8,548	-7,857
5	-8,468	-9,054	-8,270	-9,247	-8,668	-7,995
6	-7,475	-8,957	-8,932	-9,188	-8,577	-7,622
7	-7,561	-8,968	-8,119	-9,184	-7,806	-7,821
8	-8,265	-9,320	-9,183	-9,098	-9,075	-7,561
9	-7,713	-9,299	-9,036	-9,590	-9,109	-7,982
10	-7,306	-8,848	-9,047	-9,525	-9,449	-7,573
11	-8,778	-9,506	-9,196	-9,347	-8,203	-8,248
12	-8,586	-9,370	-8,786	-9,603	-9,052	-8,537
13	-8,182	-9,566	-9,735	-9,673	-9,195	-7,784
14	-9,173	-9,546	-9,585	-9,612	-9,109	-8,526
Média	-8,193	-9,207	-9,029	-9,349	-8,818	-7,931

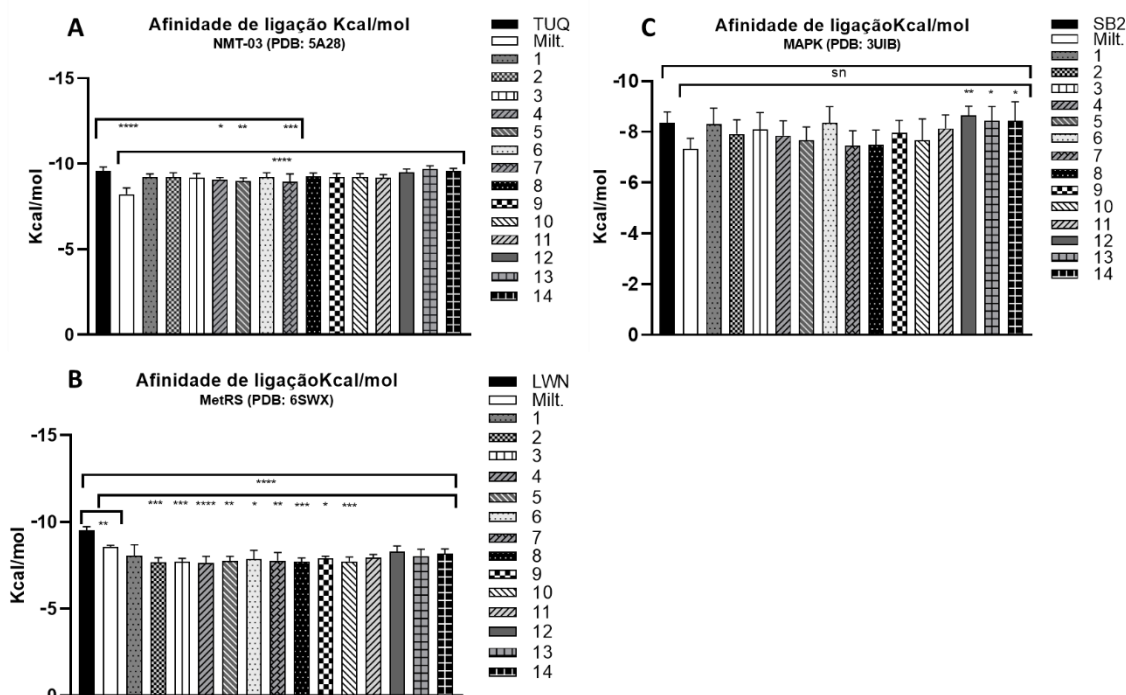
Fonte: Autora (2022). \*Código PDB.

Considerando que mais de uma estrutura cristalográfica de NMT foi elencada na triagem inversa, apenas a estrutura NMT-03 (Código PDB: 5A28) e os respectivos valores de coordenadas *xyz* foram priorizados para as etapas seguintes, devido à melhor média de afinidade de ligação. A fim de contemplar outros alvos associados a diferentes processos fisiopatológicos nos parasitas, estruturas cristalográficas correspondentes às enzimas MAPK e MetRS, mesmo com menores valores de afinidade de ligação, também foram consideradas para a seleção de novos *hits*.

A Figura 12 apresenta o gráfico dos resultados com os valores de afinidade de ligação de 1 e derivados com NMT, MetRS e MAPK, em comparação com os respectivos ligantes co-cristalizados e a miltefosina. Quando ancorados ao sítio de ligação de NMT-03 se observa que a afidicolina e a maioria dos derivados, com exceção de 4, 5 e 7, demonstrou valores de  $\Delta G$  comparáveis ao ligante co-cristalizado, no entanto, não suficientemente superiores ao do controle negativo, miltefosina. No *docking* molecular ao sítio de ligação de MetRS observa-se

que todos os ligantes mostraram valores de  $\Delta G$  significativamente menos negativos ao apresentado pelo ligante de referência (LWN) e mais negativos que o da miltefosina. Já em MAPK se verifica que não há diferença estatística dos ligantes com o controle positivo, e que apenas as moléculas 12, 13 e 14 exibiram valores de  $\Delta G$  significativamente menores que o controle negativo.

Figura 12 – Análise estatística dos resultados de *docking* molecular de **1** e derivados (**2-14**) com (A) ao sítio de ligação de NMT-03 (A), MetRS (B) e MAPK (C), em comparação com os ligantes de referência TUQ, LWN e SB2, respectivamente e miltefosina.



Fonte: Autora (2022). \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $0,0003 \leq p \leq 0,005$ ; \*\* $0,0010 \leq p \leq 0,0058$ ; \* $0,0136 \leq p \leq 0,0466$ .

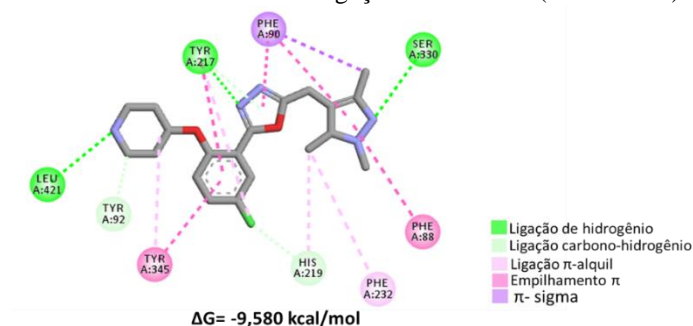
Em relação à atividade de terpenos sobre enzimas selecionadas neste trabalho, a literatura descreve apenas resultados *in silico* utilizando cálculos de *docking* molecular. Ogungbe e Setzer (2013) ancoraram diversos terpenóides derivados de plantas a potenciais alvos de *Leishmania* spp. Nesse estudo, os monoterpenóides e sesquiterpenóides mostraram maior seletividade de acoplamento sobre MetRS, enquanto que a maioria dos diterpenóides avaliados exibiram maior seletividade sobre glicerol-3-fosfato desidrogenase e, de forma razoável, a NMT. Em triagem virtual baseada em estrutura realizada por Bernal e Barreira (2014), sesquiterpenóides do tipo agarofurano exibiram maior seletividade para NMT e pteridina redutase-1.

### 5.2.1 N-miristoil transferase (PDB: 5A28)

A NMT é um alvo essencial para a viabilidade de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp., além disso, é um dos poucos alvos de tripanosomatídeos validados farmacologicamente (CORPAS-LOPEZ et al., 2018). Nesses parasitas, a enzima catalisa a adição de ácido mirístico (miristoil-CoA) (C14:0) na glicina N-terminal de proteínas específicas antes e após a síntese total de cadeias polipeptídicas (eventos co e pós-traducional, respectivamente). Assim, a importância da enzima nesses parasitas está supostamente associada à localização celular correta e à função biológica adequada dessas proteínas, as quais estão envolvidas em diversos processos celulares como tráfego de proteínas vesiculares, transdução de sinal e interações proteína-proteína. Em *L. major* o gene que codifica a NMT é expresso em todos os estágios do parasita, a enzima, por sua vez, localiza-se tanto na membrana como no citoplasma, o que a torna um alvo adequado para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas (PRICE et al., 2003; CORPAS-LOPEZ et al., 2018)

Rackham et al. (2015) propuseram diversas modificações estruturais de um composto protótipo benzotiofeno buscando desenvolver inibidores seletivos de NMT. O protótipo foi descoberto como um inibidor eficiente de NMT de *Plasmodium falciparum* (*Pf*NMT) e seletivo sobre NMT de *L. donovani* (*Ld*NMT). Dessa série de análogos, o isômero de oxadiazol (TUQ) exibiu alta afinidade e  $K_i$  de 10 nM sobre *Ld*NMT. A resolução do complexo com *Lm*NMT (NMT de *L. major*) por cristalografia de raio-x revelou que TUQ realiza ligação de hidrogênio com o carboxilato do resíduo de Leu421 e Ser330, interação mediada por água com Tyr92 e interações  $\pi$ - $\pi$  com Phe90 (Figura 13). Outros estudos apontam a importância da interação de inibidores de *Lm*NMT quimicamente distintos (tienopirimidina, piperidinilindol, aminoacilpirrolidina e bifenil) com cadeias laterais aromáticas de Tyr217 e Tyr345 (BRANNIGAN et al., 2014). O estudo *in silico* realizado por Ogungbe e Setzer (2013) que avaliou diversas classes de terpenóides sobre alvos de *Leishmania* spp. apontou que o diterpeno do tipo cassano, considerado o mais seletivo para NMT do conjunto de moléculas avaliadas, realizou extensas interações com “Ala204, Asp83, Asp84, Glu82, Gly205, Phe88, Phe90, Tyr217, Tyr345, Val81 e Val206”.

Figura 13 – Ligante co-cristalizado ancorado ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28).

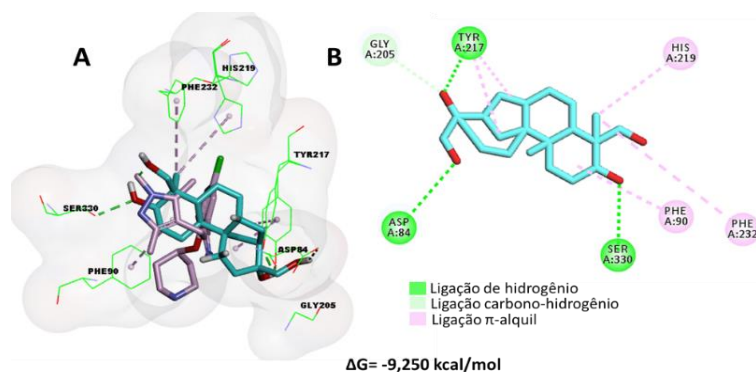


Fonte: Autora (2022).

Embora a afidicolina e TUQ apresentem similaridade estérica e eletrônica superior a 0,5, os estudos de *docking* molecular mostraram que a complementaridade de ambos ao sítio ativo de NMT é consideravelmente diferente. Isso pode ser explicado pela diferença de graus de liberdade observados entre as duas moléculas. Enquanto o ligante co-cristalizado é bastante flexível, a afidicolina com apenas duas ligações rotacionáveis não é capaz de realizar grandes mudanças conformacionais, deixando apenas as suas hidroxilas ligadas às posições C3 e C18 do anel A, e C16 e C17 do anel D, com maior liberdade conformacional.

Por outro lado, observou-se que o acoplamento da afidicolina com NMT-03 preservou algumas interações com resíduos-chave de aminoácidos envolvidos no reconhecimento do ligante de referência pelo sítio de ligação de NMT. Ao comparar a pose mais energeticamente favorável da afidicolina, obtida pelo ancoramento molecular, com a pose cristalográfica de TUQ, foi observado que o anel A da afidicolina se sobrepõe ao anel pirazol do ligante de referência (Figura 14). Por esse motivo, a afidicolina manteve uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Ser330 na β-folha da cadeia A de NMT-03, através da OH na posição C-3. Além disso, a afidicolina conseguiu manter uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Tyr217 e outra adicional com Asp84, através das OHs ligadas em C16 e C17, respectivamente. Não foi observada nenhuma interação de OH-C18, tida como importante para a atividade sobre tripanosomatídeos em triagens *in vitro*. A metila livre (C19) realiza interação π-alquil com a cadeia lateral aromática de His219 e Phe232, bem como o anel A com o resíduo de Phe90.

Figura 14 – (A) Comparação da interação do ligante nativo (roxo) e a afidicolina (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D dos aminoácidos envolvidos na interação da afidicolina com NMT-03.



Fonte: Autora (2022).

No afidicolano 2 (Apêndice 1), observa-se complementaridade semelhante à da afidicolina. No entanto, OH-C18 realiza ligação de hidrogênio adicional com Ser330, enquanto que OH-C3 realiza ligação covalente com a cadeia lateral aromática de Phe88. A porção C10 e o anel B realizam interação  $\pi$ -alquil com Phe90. A OH em C11 realiza ligação de hidrogênio com Asp396, o qual participa de interações com tienopirimidina de TUQ (BRANNIGAN et al., 2014). O derivado 3 (Apêndice 1), por outro lado, tem os anéis C e D em sobreposição ao anel pirazol de TUQ, o que explica a realização de ligações de hidrogênio de OH-C16 às hidroxilas de Ser330 e Tyr345. A OH na posição 2C do anel A permitiu ligação de hidrogênio com Glu82. A ausência de hidroxilação em C16 permitiu à metila realizar interações hidrofóbicas com Phe88, Phe232 e com a cadeia lateral saturada de Leu341, esse padrão de interação também foi observado no derivado 6.

No derivado 4 (Apêndice 2), o padrão de sobreposição é semelhante ao derivado 3, inferindo-se que nesses derivados a hidroxilação em duas posições do anel D pode contribuir para a orientação da molécula no sítio ativo. Com isso, esse afidicolano manteve a ligação de hidrogênio com Ser330, no entanto, possivelmente devido à ausência da metila nesse anel, não houve formação com a cadeia lateral saturada de Leu341 (Apêndice 2).

O derivado 5 apresenta predominantemente interações hidrofóbicas, destacando apenas uma ligação de hidrogênio com o grupo amino de Tyr217, o mesmo ocorre no derivado 7. Este último é quimicamente distinto aos demais, em C18 no anel A, ao invés de uma OH há a presença de um grupo carboxil. Embora o anel D se sobreponha ao anel pirazol de TUQ, a hidroxila em C16 não foi capaz de formar ligação com o resíduo de Ser330, porém, realizou

ligação de hidrogênio com Tyr345 e Asn376. Nota-se também a formação de ligação de hidrogênio da carbonila do grupo carboxil com Tyr217. No derivado 8 a ciclização do anel A com um grupo oxetano parece ter dificultado a formação de uma ligação de hidrogênio através do átomo de oxigênio do heterociclo, as interações observadas com esse derivado são predominantemente hidrofóbicas (Apêndice 3).

No derivado 9, o epóxido presente no anel D manteve a ligação de hidrogênio com Ser330. O derivado 10, considerado inativo contra *L. major*, porém moderadamente ativo contra formas amastigotas e promastigotas de *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2014) exibe como principal diferença a presença de uma oxima ligada em C3. Nos estudos de *docking* molecular, a OH da oxima não realizou nenhuma interação com o sítio ativo de NMT-03. Embora a contribuição de interações hidrofóbicas tenha sido muito menor quando comparado aos demais derivados, a  $\Delta G$  foi muito próxima à calculada no acoplamento do ligante co-cristalizado. Nos estudos de Kayser et al. (2001) o derivado 11 (17-glicinato de afidicolina) apresentou resultados promissores sobre as formas promastigotas de *L. major*. Embora esse derivado tenha apresentado afinidade de ligação consideravelmente alta com NMT, as interações identificadas são apenas entre Tyr217, His219 e Phe232 (Apêndice 4).

Os derivados 12, 13 e 14 mostraram novamente que a ciclização do anel A ou D pode prejudicar a ocorrência de ligação de hidrogênio. As interações hidrofóbicas são majoritárias, tendo destaque os resíduos de Phe90, Tyr217, Phe232 e Tyr345 (Apêndice 5).

### 5.2.2 Metionil tRNA sintetase (PDB: 6SWX)

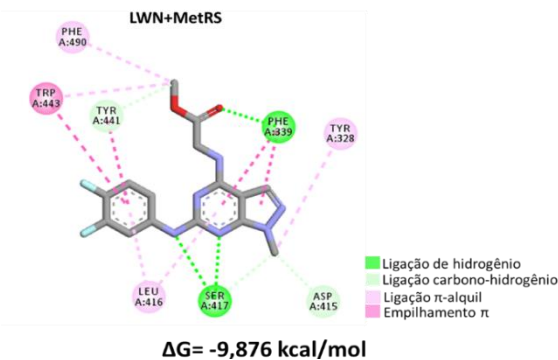
A enzima metionil-tRNA sintetase (MetRS) é um alvo quimicamente validado em *Trypanosoma brucei* e *L. donovani* (TORRIE et al., 2017). Essa enzima está envolvida na síntese de proteínas ao catalisar a produção de metionil-tRNA que se liga aos códons AUG nos ribossomos durante a fase de tradução, permitindo a incorporação de metionina nas proteínas que serão sintetizadas (TORRIE et al., 2020). Em virtude de ser uma enzima altamente conservada nos cinetoplastídeos, a MetRS vem sendo utilizada como um alvo farmacológico promissor na busca de *hits* com atividade leishmanicida (LARSON et al., 2011; OGUNGBE; NG; SETZER, 2013).

Os inibidores conhecidos da MetRS competem pelo sítio de ligação com a metionina. Torrie et al. (2020) avaliaram a atividade de diferentes pirazolopirimidinas sobre a MetRS



de *L. donovani* e verificaram que compostos dessa classe podem ser ligar a um novo sítio alos-térico. O ligante co-cristalizado identificado por LWN se liga através de seu grupo difluoroben-zil a uma “bolsa hidrofóbica formada por cadeias laterais de Leu416, Ile418, Tyr441, Trp443, Leu444, Leu447, Phe490, Tyr494 e Phe498, já a região pirazolopirimidina se liga entre Phe339, Phe414 e Tyr328”. Os grupos NH e carbonil de Ser417 interagem com nitrogênios da pirimi-dina formando ligações de hidrogênio. Outra interação também pode ser observada entre o ace-tato de metila de LWN e Phe339 (Figura 15).

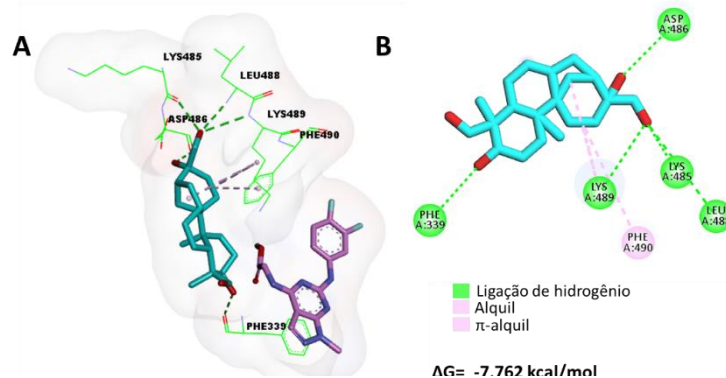
Figura 15 – Ligante co-cristalizado ancorado ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX).



Fonte: Autora (2022).

Diferentemente do que ocorre com NMT-03, a afidicolina não apresenta nenhuma sobreposição com o ligante de referência, ao contrário de LWN, parece se acomodar na porção hidrofílica do sítio ativo. Com isso, realiza extensas ligações de hidrogênio, mantendo uma ligação da OH ligada em C3 com Phe339 e outras adicionais em OH-C16 com Asp486 e em OH-C17 com Lys485, Leu488 e Lys489. Na região hidrofóbica do sítio ativo, a afidicolina conservou uma ligação com Phe490 interagindo com os anéis C e D (Figura 16).

Figura 16 – (A) Comparação da interação do ligante co-cristalizado (roxo) e a afidicolina (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D dos aminoácidos envolvidos na interação da afidicolina com MetRS.



Fonte: Autora (2022).

Em relação aos derivados afidicolanos foi observada uma variação dos aminoácidos e das suas posições de interação. Quase metade dos afidicolanos (2, 3, 7, 10 e 11) exibiram interação com Phe339 através de ligação de hidrogênio. Enquanto que no derivado 10 essa interação ocorreu no anel A em OH-C18, nos demais foi observada no anel D em OH-C16 e em OH-C17 apenas para o derivado 2. Outros resíduos em comum entre os derivados foram Asn344 (derivados 4, 5, 8, 10 e 14) e Asp486 (2, 3, 5, 7 e 11), ambos efetuando ligações de hidrogênio. Somente no derivado 4 a interação com Asn344 foi verificada no anel A em OH-C3, nos demais essa interação ocorreu em OH-C16. Por outro lado, todas as interações com Asp486 ocorreram somente nas posições OH-C3 e OH-C18. No derivado 7 a ligação de hidrogênio foi formada com a porção de ácido carboxílico ligada ao C18. As interações hidrofóbicas na afidicolina e derivados foram observadas nos anéis A, B, C e D, com uma maior extensão no anel D, envolvendo principalmente as cadeias laterais de Lys489 e o anel aromático de Phe490, mediante interações alquil e  $\pi$ -alquil (Apêndices 6-18).

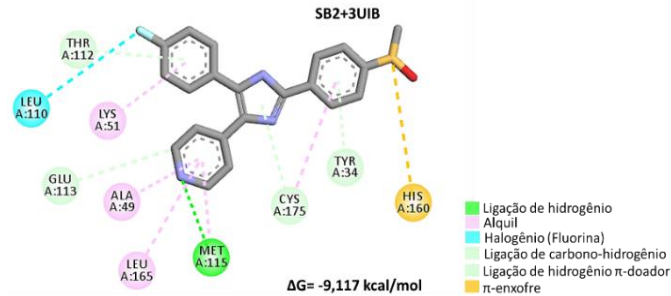
### 5.2.3 Map-quinase (PDB: 3UIB)

As proteínas ativadas por mitógenos (do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) são proteínas quinases que fosforilam seus próprios resíduos de serina e treonina e encontrados em seus substratos, a fim de ativar ou desativar alvos biológicos (PETI; PAGE, 2013). Essas proteínas são altamente conservadas em eucariotos e são responsáveis pela modulação de diversos eventos de sinalização intracelular, como proliferação, diferenciação, apoptose e resposta ao estresse (PLOTNIKOV et al., 2011). No gênero *Leishmania* há ao menos 17 tipos de MAPK, as quais estão envolvidas no sensoramento ambiental e biogênese de flagelos, regulando as vias de resposta adaptativa dos parasitas (PLOTNIKOV et al., 2011).

O estudo de Horjales et al. (2012) que elucidou a estrutura cristalográfica de MAPK10 de *L. major* em complexo com SB203580 (PDB ID: 3UIB) mostrou que embora os resíduos de catálise das map-quinases sejam bem conservados nos eucariotos, em tripanossomatídeos há diferenças no sítio ativo. A interação de SB2 com *Lm*MAPK10 é estabelecida, sobretudo, por interações de van der Waals, sendo observada apenas uma ligação de hidrogênio do ligante com o resíduo de Met115. Resíduos como Tyr34 dentro da alça P (resíduos 30-34) se movem fechando a fenda de ligação de SB2 e a cadeia lateral de Asp176 contribui para a acomodação do ligante no sítio ativo (HORJALES et al.; 2012) (Figura 17). Tanto a afidicolina,

como os derivados afidicolanos, com exceção do derivado 14 ( $\Delta G = -9,173$ ), apresentaram valores menos negativos de afinidade de ligação em relação ao ligante complexado.

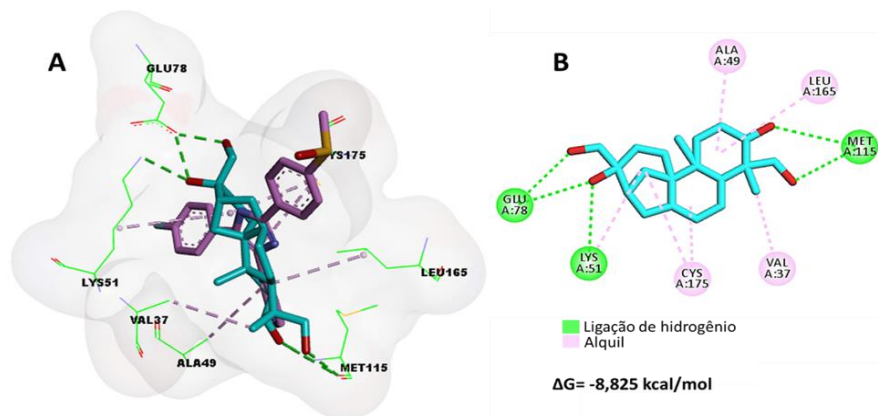
Figura 17– Ligante co-cristalizado ancorado ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB).



Fonte: Autora (2022).

Na Figura 18 é possível observar que a afidicolina se sobrepõe pelo anel A à piperidina de SB2, bem como os anéis C e D ao anel imidazol do ligante nativo. Isso explica porque a afidicolina manteve a ligação de hidrogênio com Met115 através das hidroxilas em C3 e C18, bem como as interações hidrofóbicas com Ala49 e Leu165. A maior rigidez de afidicolina permitiu que a molécula realizasse interações com outros aminoácidos do sítio ativo, incluindo duas ligações de hidrogênio com Lys51 e Glu78 através das hidroxilas no anel D e com Val37 e Cys175 por meio de interação hidrofóbica.

Figura 18 – (A) Comparação da interação do ligante co-cristalizado (roxo) e a afidicolina (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) Diagrama 2D dos aminoácidos envolvidos na interação da afidicolina com MAPK.



Fonte: Autora (2022).

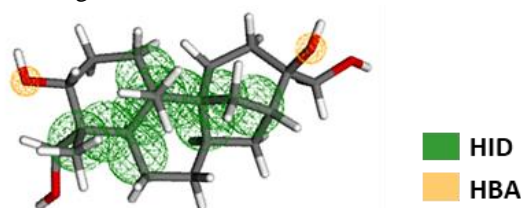
Por outro lado, o afidicolano 2 não se sobrepôs ao ligante nativo, assumindo um conjunto de interações variadas, exceto Met115 ligado à OH-C10. De forma similar à afidicolina a conformação mais energeticamente favorável do derivado 3 permitiu a sobreposição do anel A com a piperidina de SB2. No entanto, a ligação de hidrogênio com Met115 envolveu a única hidroxila no anel D, já no anel A em OH-C1 a interação ocorreu com o grupo carbonil de Glu113. Outras interações importantes já mencionadas com Ala49 e Leu165, foram observadas para esse derivado.

Para os demais afidicolanos, não houve mudanças relevantes em relação às interações com os resíduos de aminoácidos. Em geral, as ligações de hidrogênio ocorreram, sobretudo, com Asp118 em OH-C3 (derivado 6, 9 e 11), OH-C16 (derivado 5, 8 e 10) e OH-C18 (derivado 4, 5, 6 e 9). Destaque para 11 e 14, cujos acoplamentos com MAPK obtiveram os valores de afinidade de ligação mais baixos com -8,778 kcal/mol e -9,173 kcal/mol, respectivamente. A porção amino do grupo glicina em 11 foi ancorada em um resíduo de Asp176 e mesmo o anel A não possuindo complementaridade semelhante à de SB2 ao sítio ativo, a OH em C18 manteve a interação com Met115 e com alguns dos resíduos apolares descritos por Horjales et al. (2012). Em 14 são observadas majoritariamente interações hidrofóbicas com o sítio de MAPK, sendo o único derivado a manter a interação polar com Met115 e com os resíduos apolares do ligante de referência. Um achado relevante dessa etapa é que todos os ligantes que mostraram algum ponto de sobreposição com SB2, de forma a ocupar regiões em comum do sítio ativo, apresentaram melhores valores de afinidade de ligação (Apêndices 19-23).

### 5.3 Geração do modelo farmacofórico

Para a predição do farmacóforo no servidor PharmaGist, foram selecionados 13 derivados afidicolanos (ver Figura 9) com atividade biológica *in vitro* descrita para *Leishmania* spp. (KAYSER et al., 2001; SANTOS et al., 2014) sendo a afidicolina utilizada como molécula pivô. A melhor pontuação de sobreposição calculada para o conjunto de moléculas foi de 24,739, estando próximo a pontuações descritas em outros trabalhos (SILVA et al., 2015; PADILHA et al., 2016). Esse modelo resultou em um alinhamento com 12 propriedades farmacofóricas: 10 características hidrofóbicas (HID) e duas aceptoras de ligação de hidrogênio (HBA) (Figura 19).

Figura 19 – Modelo farmacofórico gerado com o servidor PharmaGist.



Fonte: Autora (2022).

### 5.3.1 Avaliação do modelo farmacofórico

Além do alinhamento, o Pharmagist também fornece valores individuais das seguintes propriedades farmacofóricas: número de átomos (ATM), características espaciais (CE), grupos hidrofóbicos (HID), grupos doadores (HBD) e aceptores de ligação de hidrogênio (HBA). A partir desses dados, foi construída uma matriz levando em consideração a similaridade de Tanimoto, para avaliar se as propriedades supracitadas se correlacionam entre si e à variável de interesse. Ferreira et al. (2019) utilizaram valores de  $pIC_{50}$  indicados para a construção de modelo QSAR, porém no presente estudo os valores de coeficiente de Tanimoto foram escolhidos ao invés de resultados de atividade biológica, devido às diferentes condições experimentais dos estudos que forneceram as moléculas aqui analisadas. Assim, o método estatístico de correlação de Pearson foi utilizado para fazer essa correlação, em adaptação à metodologia proposta por Santos et al. (2015). Além disso, o  $p$  valor foi calculado para avaliar as correlações que deveriam ser consideradas na análise (Tabela 5).

Tabela 5 – Descritores farmacofóricos previstos no servidor *web* PharmaGist.

Molécula	ATM	CE	HID	HBD	HBA	Tanimoto
1	58	23	19	4	4	1,000
2	59	22	17	5	5	1,000
3	57	23	20	3	3	0,886
4	54	22	19	3	3	0,867
5	55	22	19	2	3	0,830
6	56	24	22	2	2	0,734
7	57	26	22	1	3	0,647
8	55	22	19	2	3	0,587
9	55	22	19	2	3	0,580
10	59	24	19	5	4	0,554
11	65	25	19	4	6	0,500

12	66	25	21	0	4	0,461
13	66	25	21	0	4	0,457
14	64	25	22	1	3	0,450
CE	0,700	-	-	-	-	-
*	0,005	-	-	-	-	-
HID	0,302	0,741	-	-	-	-
*	0,295	0,002	-	-	-	-
HBD	-0,298	-0,431	-0,744	-	-	-
*	0,302	0,124	0,002	-	-	-
HBA	0,587	0,179	-0,493	0,439	-	-
*	0,027	0,541	0,073	0,116	-	-
Tanimoto	-0,603	-0,621	-0,499	0,553	-0,084	-
*	0,022	0,018	0,070	0,040	0,775	-

Fonte: Autora (2022). ATM= Átomos; CE= Características Espaciais; HID= Hidrofóbico; HBA= Grupos aceitadores de ligação de hidrogênio; HBD= Grupos doadores de ligação de hidrogênio \* $p$ = Valor da correlação de Pearson.

Observa-se que os valores de coeficiente de correlação estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$  e.g. probabilidade menor ou igual a 5%) entre as características farmacofóricas (ATM, CE, HID, HBD e HBA) mostraram valores positivos e negativos. Uma correlação diretamente proporcional forte (valor positivo entre 0,7-0,9) foi observada entre HID-CE (0,741;  $p = 0,002$ ). Duas correlações positivas moderadas (valor positivo entre 0,4 e 0,7) foram observadas entre os pares ATM-CE (0,700;  $p = 0,005$ ) e ATM-HBA (0,587;  $p = 0,027$ ). Enquanto que uma correlação negativa forte foi observada entre o par HBD-HID (-0,744;  $p = 0,002$ ).

Os valores de similaridade de Tanimoto dos derivados (**2-14**) em relação à molécula pivô (**1**), variaram de 0,457 a 1,000. O valor do índice de Tanimoto se encontra entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior é a relação estrutural com a molécula de referência. Das três características farmacofóricas correlacionadas ao índice de Tanimoto ( $p \leq 0,05$ ), duas foram inversamente proporcionais, sendo elas ATM (-0,603;  $p = 0,022$ ) e CE (-0,621;  $p = 0,018$ ). Somente a correlação Tanimoto-HBD foi considerada positiva moderada (0,553;  $p = 0,018$ ). As características HID e HBA, resultantes do alinhamento do conjunto de moléculas (Figura 19), apresentaram correlação inversamente proporcional ao índice de Tanimoto, no entanto, não foi considerada estatisticamente significativa.

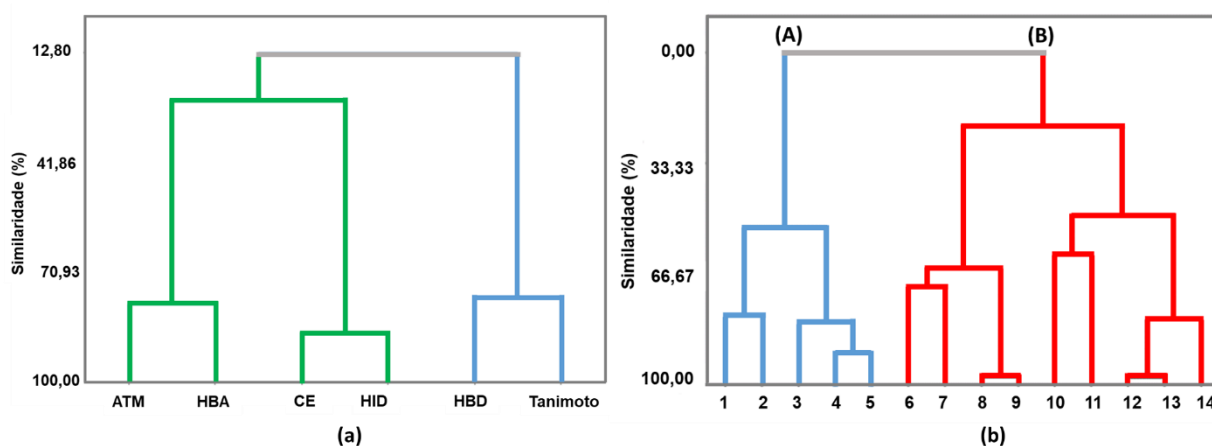
A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) corroborou com os resultados encontrados na correlação de Pearson, mostrando HBD como a variável dependente mais importante (Figura

20a). Os grupos doadores de ligação de hidrogênio são grupos funcionais que possuem um heteroátomo (N, O, F) eletronegativo ligado a um H, fornecendo o hidrogênio com carga parcial positiva para a ligação (PATRICK, 2013).

Considerando os resultados da correlação de Pearson e o fato do modelo farmacofórico possuir apenas duas características (HID e HBA), o modelo gerado no PharmaGist foi selecionado para as demais etapas. A presença de grupos hidrofóbicos nos ligantes é importante no reconhecimento molecular, especialmente em alvos biológicos cujo sítio de ligação é formado por aminoácidos apolares, como é o caso de MetRS. Além disso, grupos como OH podem atuar tanto como doadores como aceptores de ligação de hidrogênio, sendo os últimos definidos como grupos capazes de aceitar um átomo de hidrogênio para estabelecer uma interação (PATRICK, 2013).

A atividade antiparasitária da afidicolina parece ser dependente das OH livres em C-3 e C-18 em espécies de *Leishmania*, além disso, qualquer modificação do anel A na posição C-3, como introdução de grupos funcionais ou remoção da OH, a atividade sobre *T. cruzi* é reduzida. Com relação aos derivados, a atividade leishmanicida das moléculas mais ativas está muito relacionada à estrutura primária da afidicolina (KAYSER et al., 2001; SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

Figura 20 – (a) Dendograma de análise de agrupamento hierárquico (HCA) da correlação entre características farmacofóricas e índice de Tanimoto. (b) Dendograma (HCA) das estruturas classificadas como mais similares em azul (A) menos similares em vermelho (B).



Fonte: Autora (2022).

Além disso, esse método permitiu classificar, partindo das características farmacofóricas, as moléculas em mais similares e menos similares à afidicolina (Figura 20b). O maior

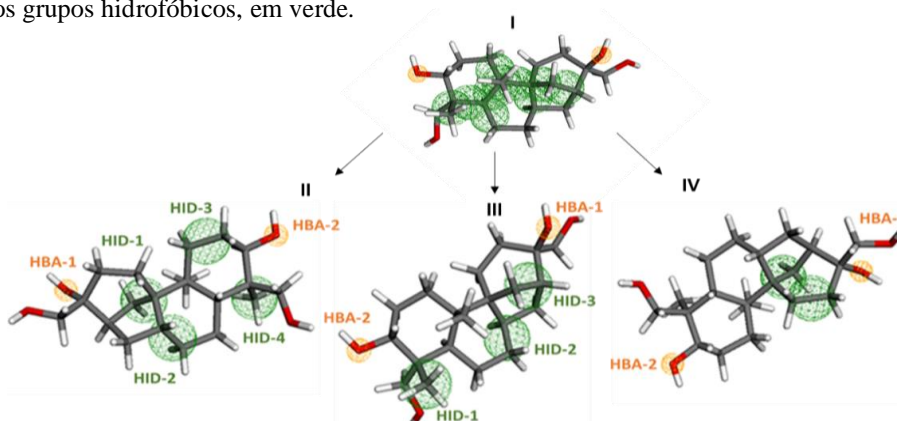
*cluster* identificado em azul, agrupou as moléculas ditas mais similares (1-5) e, no menor *cluster*, em vermelho, estão as moléculas menos similares (6-14). As moléculas 1 e 2 são altamente similares, tendo apenas mudanças estereoquímicas e a presença de um grupo hidroxil ligado em C10 no derivado 2. No segundo grupo, constituído pelos derivados 3, 4 e 5, nota-se uma maior similaridade estrutural entre os ligantes 4 e 5 que apresentam o mesmo padrão de substituição em C3 e C18, exceto pela presença de um epóxido entre C16 e C17 no afidicolano 5.

Esses pontos se refletem nas características farmacofóricas, por exemplo, 1 e 2 apresentaram valores muito similares de todos os aspectos farmacofóricos mostrados na Tabela 7, enquanto que 4 e 5 exibiram o mesmo número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio e de características farmacofóricas. A similaridade começa a diminuir a partir do derivado 6, este mantém as hidroxilas apenas em C3 e C16. Porém entre os derivados 8 e 9 e 12 e 13 são observadas características farmacofóricas idênticas, apesar das diferenças estruturais.

#### 5.4 Hipótese farmacofórica e triagem virtual

O grande número de características hidrofóbicas resultantes do alinhamento das moléculas impossibilitou que fossem encontrados novos *hits* no servidor Pharmit. Desse modo, a triagem virtual levou em consideração hipóteses farmacofóricas apresentadas na Figura 21, que foram obtidas pela inspeção visual das interações moleculares de **1** com as estruturas cristalográficas encontradas na triagem virtual inversa. Ferreira et al. (2019) tiveram sucesso com esse refinamento, uma vez que as hipóteses selecionadas apresentaram as características relevantes para a complementaridade com o receptor estudado.

Figura 21 – Hipóteses farmacofóricas. (I) modelo farmacofórico inicial; (II) modelo farmacofórico com base e interação MPK, (III) NMT-03 e (IV) MetRS. Os grupos aceptores de ligação de hidrogênio estão representados na cor laranja e os grupos hidrofóbicos, em verde.



Fonte: Autora (2022).



De acordo com as interações observadas entre a afidicolina e os alvos MAPK e NMT-03, cinco características farmacofóricas foram definidas: dois grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) e quatro grupos hidrofóbicos (HID); enquanto que para MetRS, os mesmos grupos HBA foram mantidos e apenas dois grupos HID foram utilizados para a construção do modelo, como é observado na Tabela 6, juntamente com os respectivos valores de coordenadas *xyz*.

Tabela 6 - Coordenadas *xyz* dos grupos farmacofóricos utilizados na triagem de novos *hits*.

Farmacóforo MAPK (PDB: 3UIB)				
Coordenadas	x	y	Z	Raio
HBA-1	21,86	-4,38	-0,76	0,5
HBA-2	16,23	-11,54	-2,21	0,5
HID-1	20,96	-7,63	-1,19	1,0
HID-2	22,08	-9,38	-1,82	1,0
HID-3	17,81	-8,97	-2,58	1,0
HID-4	18,69	-11,96	-0,27	1,0
Farmacóforo NMT-03 (PDB: 5A28)				
HBA-1	21,86	-4,38	-0,76	0,5
HBA-2	16,23	-11,54	-2,21	0,5
HID-1	21,83	-6,98	-0,83	1,0
HID-2	21,35	-8,40	-2,07	1,0
HID-3	17,81	-8,97	-2,58	1,0
HID-4	18,69	-11,96	-0,27	1,0
Farmacóforo MetRS (PDB: 6SWX)				
HBA-1	21,86	-4,38	-0,76	0,5
HBA-2	16,23	-11,54	-2,21	0,5
HID-1	21,83	-6,98	-0,83	1,0
HID-2	20,60	-6,25	-2,79	1,0

Fonte: Autora (2022).

A fim de reduzir o número de *hits* encontrados na triagem virtual foi aplicado um filtro de propriedades fármaco-similar (do inglês *drug-like*), utilizando como propriedades físico-químicas o peso molecular (PM), número de ligações rotacionáveis (NRB), coeficiente de partição (Log P), área de superfície polar topológica (TPSA), grupos aromáticos (ARO) e grupos aceptores (HBA) e doadores (HBD) de ligação de hidrogênio. Os valores das propriedades físico-químicas, calculadas para afidicolina e os 13 derivados, estão listados na Tabela 7.

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas utilizadas nos filtros de máximos e mínimos.

Molécula	PM (Da)	NRB	Log P	TPSA (Å)	ARO	HBA	HBD
1	338,48	2	1,89	80,92	0	4	4
2	354,48	2	1,03	101,15	0	5	5
3	322,48	1	2,81	60,69	0	3	3
4	308,46	1	2,51	60,69	0	3	3
5	320,47	1	2,53	52,99	0	3	2
6	306,48	0	3,74	40,46	0	2	2
7	334,49	2	3,77	57,53	0	3	2
8	320,47	1	2,53	49,69	0	3	2
9	320,47	1	2,52	52,99	0	3	2
10	351,48	2	2,65	93,28	0	5	4
11	395,53	5	1,05	113,01	0	6	4
12	390,56	0	3,78	36,92	0	4	0
13	390,56	0	3,78	36,92	0	4	0
14	362,55	0	4,07	38,69	0	3	1
Mínimo	306,48	0	1,03	36,92	0	2	0
Máximo	395,53	5	4,07	113,01	0	6	5

Fonte: Autora (2022).

Desse modo, os intervalos dos filtros foram definidos como o menor e o maior valor de cada propriedade calculada. Observa-se que tanto **1** como os derivados afidicolanos não violaram os limites estabelecidos por Lipinski ( $PM \leq 500$  Da,  $\text{Log P} < 5$ ,  $HBA \leq 10$ ,  $HBD \leq 5$ ) e Veber ( $TPSA \leq 150$  Å,  $NRB \leq 10$ ) (LIPINSKI et al., 1997; VEBER et al., 2002). Segundo esses autores, os pontos de corte estabelecidos para as propriedades supracitadas são comuns em fármacos administrados por via oral.

A utilização da afidicolina como fármaco por via oral é limitada pela sua baixa solubilidade em água e rápida depuração por enzimas metabolizadoras de fármacos. Além disso, modificações estruturais para a geração de derivados mais hidrossolúveis podem comprometer a atividade biológica, tendo como exemplo o 17-glicinato de afidicolina (derivado 11) (BARANOVSKIY et al., 2014). Por esses motivos, *hits* estruturalmente semelhantes à afidicolina devem apresentar maior biodisponibilidade oral, melhor solubilidade em água e acessibilidade sintética.

A triagem virtual realizada no banco de dados MolPort® através do servidor *web* Pharmit encontrou apenas 9 ligantes com base no ancoramento com MAPK (PDB: 3UIB), 1183 e 2000 ligantes considerando as interações com NMT-03 (PDB: 5A28) e MetRS (PDB: 6SWX), respectivamente. Um segundo refinamento foi aplicado para reduzir o número de moléculas

com base na similaridade de Tanimoto. Após essa etapa, somente 3, 316 e 460 ligantes para MAPK, NMT-03 e MetRS, respectivamente, mostraram similaridade estrutural superior a 0,3 em relação à afidicolina.

### 5.5 Predição da toxicidade e farmacocinética da afidicolina e derivados

A predição no *software* DEREK revelou que apenas os derivados 6, 8 e 14 não apresentaram alertas de toxicidade (Apêndice 24). A afidicolina e a maioria dos afidicolanos apresentaram alertas estruturais de carcinogenicidade e proliferação de peroxissomos. Os derivados 5 e 9, substituídos com epóxido, também apresentaram outros *endpoints* de toxicidade como sensibilização da pele, toxicidade no desenvolvimento e irritação ocular. Já os derivados 12 e 13 com subunidades 1,3-dioxano e 1,3 dioxociclopentano, respectivamente, mostraram dano cromossômico, mutagenicidade, genotoxicidade e sensibilização da pele.

Em um ensaio clínico de fase I realizado com o 17-glicinato de afidicolina (derivado 11), pacientes relataram dor e irritação dose-dependente na pele ao redor da infusão endovenosa da molécula. Um paciente do mesmo estudo apresentou bradicardia sem bloqueio atrioventricular e tontura 12 h após infusão de alta dose do 17-glicinato de afidicolina. Outros efeitos tóxicos como leucopenia leve e aumento reversível de marcadores de lesão hepática, também foram observados (SESSA et al., 1991) o que corrobora com a busca realizada de novas entidades químicas consideradas mais seguras.

A Tabela 8 resume os resultados de predição farmacocinética, em termos de absorção e distribuição, da afidicolina (**1**) e derivados (**2-14**). Considerando a regra de Lipinski todas as moléculas de partida apresentam lipofilicidade adequada ( $\text{Log } P < 5$ ), com variação de 0,43 (derivado 2) a 3,76 (derivado 7), valores abaixo daquele apresentado pela miltefosina, único fármaco aprovado para o tratamento da leishmaniose administrado por via oral.

Tabela 8 – Predição do perfil farmacocinético de **1** e derivados (**2-14**).

Molécula	Absorção				Distribuição		
	Log P [a]	P <sub>Caco-2</sub> [b]	HIA (%) [c]	P <sub>MDCCK</sub> [d]	P-gp [e]	LPP (%) [f]	BHE <sup>[g]</sup>
1	1,53	6,92	78,87	81,49	Não	91,55	1,14
2	0,43	5,45	63,82	1,79	Não	66,51	0,30
3	2,28	21,33	87,21	176,9	Sim	91,26	2,85
4	2,21	7,28	86,54	117,35	Sim	97,42	2,73
5	2,30	20,03	91,71	125,81	Sim	94,01	2,66

6	3,51	19,79	92,01	184,46	Sim	100,00	6,73
7	3,76	18,59	95,62	213,78	Sim	100,00	1,03
8	2,30	17,76	91,75	308,03	Não	99,00	2,80
9	2,22	22,46	91,71	115,77	Sim	88,30	2,52
10	2,22	22,46	91,71	115,77	Sim	88,30	2,52
11	2,32	18,89	78,02	4,27	Sim	72,21	0,13
12	2,32	18,89	78,02	4,27	Sim	72,21	0,13
13	2,88	56,98	98,45	3,22	Não	88,85	0,39
14	3,15	52,96	95,66	0,56	Sim	92,16	2,30
MIL <sup>[a]</sup>	4,87	21,70	98,08	43,42	Sim	86,18	0,13
ANF-B <sup>[b]</sup>	-0,16	14,13	4,68	0,04	Sim	39,01	0,03

Fonte: Autora (2022). \*Inibição da glicoproteína-P; <sup>[a]</sup>Miltefosina; <sup>[b]</sup>Anfotericina B. <sup>[a]</sup>Lipofilicidade, <sup>[b]</sup>Permeabilidade em células Caco-2 (nm/s), <sup>[c]</sup>Percentual de absorção intestinal humana, <sup>[d]</sup>Permeabilidade em células MDCK (nm/s), <sup>[e]</sup>Inibição da glicoproteína-P, <sup>[f]</sup>Percentual de ligação às proteínas plasmáticas, <sup>[g]</sup>Permeação à barreira hematoencefálica.

Os valores do coeficiente de permeabilidade de monocamadas de células de adenocarcinoma ( $P_{\text{Caco-2}}$ ), absorção oral humana (IAH%) e permeabilidade das células *Madin-Darby Canine Kidney* ( $P_{\text{MDCK}}$ ) são utilizados para a predição da absorção intestinal de ligantes de interesse (ASWATHY et al., 2018). A predição da permeabilidade em células Caco-2 é classificada como baixa, média e alta quando os valores correspondem a  $<4$  nm/s, 4-70 nm/s e  $>70$  nm/s, respectivamente (WASEEM et al., 2017). Todas as moléculas apresentaram permeabilidade moderada em células Caco-2, o menor valor é atribuído ao derivado 2 (5,45 nm/s) e o maior, ao derivado 13 (56,98 nm/s). Do mesmo modo, a permeabilidade em células MDCK pode ser classificada em baixa ( $<25$  nm/s), média (25-500 nm/s) e alta ( $>500$  nm/s) (PATEL et al., 2018). As moléculas 2, 11, 12, 13 e 14 apresentaram valores de  $P_{\text{MDCK}}$  abaixo de 25 nm/s, já as demais foram consideradas moderadamente permeáveis. Em termos de absorção intestinal humana (HIA%), a maioria das moléculas foi classificada como altamente absorvida ( $\text{HIA} > 70\%$ ), com o maior valor exibido pela molécula 13 (98,45 %). Já o derivado 2 foi o único que apresentou absorção média ( $20\% < \text{HIA} < 70\%$ ) com 63,82%.

A distribuição de fármacos é um parâmetro farmacocinético requerido para avaliar o padrão de distribuição entre os diversos compartimentos corporais que depende de vários fatores, como a permeabilidade através de barreiras teciduais, ligação dentro dos compartimentos, partição pelo pH e partição óleo:água (RANG et al., 2015). Os aspectos investigados *in silico* neste estudo foram a predição da permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE), ligação a proteínas plasmáticas (LPP%) e inibição da glicoproteína-P (P-gP).

A ligação a proteínas plasmáticas (LPP%) pode influenciar fortemente a eficácia de fármacos. Essas proteínas servem como carreadores de fármacos que facilitam o seu acesso ao

sítio ativo, reduzindo efeitos adversos. Por outro lado, uma extensa LPP% pode resultar em diminuição do *clearance*, causar interações farmacológicas ao deslocar outros fármacos dos sítios ativos dessas proteínas e, assim, contribuir com a toxicidade (LAMBRINIDIS; VALLI-ANATOU; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2015; RANG et al., 2015). A avaliação de ligação a proteínas plasmáticas (LPP%) revelou que das 14 moléculas investigadas seis (2, 9, 10, 11, 12 e 13) exibiram baixa capacidade de ligação a essas proteínas (LPP<90%) (ROMAN et al, 2019).

A glicoproteína-P humana (P-gP) é uma família de transportadores de xenobióticos dependente de ATP que influencia a distribuição e eliminação de muitos fármacos. Assim, a P-gP tem um papel relevante na farmacocinética, eficácia e segurança de moléculas, uma vez que participa da limitação da absorção oral e da penetração no sistema nervoso central (SNC), na facilitação da excreção biliar e renal, bem como, confere resistência a uma variedade de fármacos pelo efluxo celular (BIKADI et al., 2011).

Os compostos que têm capacidade de modulação sobre esses transportadores levam à acumulação intracelular de seus substratos pela redução de seu efluxo. Através de estudos de biologia molecular, Wang et al. (2003) demonstraram que fármacos com  $\text{Log } P > 2,92$ , com cadeia superior a 18 átomos e ao menos um nitrogênio terciário apresentam maior probabilidade de inibir a P-gp (WANG; KUO; LIEN; LIEN, 2003). Um estudo mais recente mostrou que a distinção entre inibidores e não inibidores de P-gP é influenciada pelas características hidrofóbicas da molécula como coeficiente de partição e presença de grupos aromáticos, possivelmente devido ao perfil hidrofóbico do sítio ativo da proteína. Além disso, moléculas volumosas com PM superior a 300 Da teriam maior probabilidade de atuarem como inibidores de P-gP (KLEP-SCH; VASANTHANATHAN; ECKER, 2014).

A predição *in silico* da permeação pela barreira hematoencefálica (BHE) fornece indicativo importante se a molécula pode ou não cruzar esse compartimento. O ligante apresenta alta absorção no SNC se o valor de permeação da BHE é maior que 2, enquanto que valores entre 2 e 0,1 e menores que 0,1 representam média e baixa permeação no SNC, respectivamente. Moléculas que não tenham como alvo o SNC devem apresentar permeação à BHE limitada, a fim de evitar efeitos adversos de ação central (ASWATHY et al., 2018).

A permeação de fármacos no SNC depende de propriedades físico-químicas como Log P, grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, PM, TPSA e ser substrato ou não de P-gP (MODA; CARRARA; ANDRICOPULO, 2012). Os valores previstos de permeação da BHE para afidicolina e os derivados 1, 2, 7, 11, 12 e 13 são classificados em permeação

intermediária, com o menor valor observado (0,13) para as moléculas 12 e 13. Enquanto que as moléculas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 14 foram classificadas como altamente absorvidas pelo SNC. A maioria desse grupo de moléculas foi prevista como inibidora de P-gP e apresentou os maiores valores de Log P.

## 5.6 Predição da toxicidade e farmacocinética dos novos *hits*

As moléculas que apresentaram o alerta “plausível” para os *endpoints* mencionados foram excluídas da etapa subsequente. Todas as 3 moléculas triadas para MAPK apresentaram quanto à relação estrutura-toxicidade alertas para carcinogenicidade e proliferação de peroxissomos. Das 316 moléculas triadas para NMT-03, somente 137 foram isentas de alertas de toxicidade, e das 460 encontradas para Met-RS, apenas 167 não foram previstas como moléculas potencialmente tóxicas.

Através da predição do perfil farmacocinético dos novos *hits*, apenas 4 moléculas foram triadas pelo modelo farmacofórico de NMT-03 e 14, pelo modelo de MetRS. A Tabela 9 resume os resultados de predição farmacocinética, em termos de absorção e distribuição dos novos *hits* encontrados para NMT-03.

Tabela 9 - Predição do perfil farmacocinético dos *hits* encontrados para NMT-03.

NMT-03 (PDB: 5A28)							
Molécula	Log P [a]	P <sub>Caco-2</sub> [b]	HIA (%) [c]	P <sub>MDCK</sub> [d]	P-gp [e]	LPP (%) [f]	BHE <sup>[g]</sup>
MP-002-911-081	2,15	18,86	87,83	85,79	Não	87,40	0,19
MP-002-911-105	1,53	18,50	96,00	35,10	Não	72,70	0,03
MP-002-911-112	2,15	18,86	87,83	85,79	Não	87,40	0,19
MP-002-527-121	1,61	15,20	92,27	52,12	Não	72,10	0,93
TUQ	1,98	28,34	94,53	0,81	Não	45,95	0,04
Miltefosina	4,87	21,70	98,08	43,42	Sim	86,17	0,13

Fonte: Autora (2022). <sup>[a]</sup>Lipofilicidade, <sup>[b]</sup>Permeabilidade em células Caco-2 (nm/s), <sup>[c]</sup>Percentual de absorção intestinal humana, <sup>[d]</sup>Permeabilidade em células MDCK (nm/s), <sup>[e]</sup>Inibição da glicoproteína-P, <sup>[f]</sup>Percentual de ligação às proteínas plasmáticas, <sup>[g]</sup>Permeação à barreira hematoencefálica.

Todas as moléculas encontradas apresentam lipofilicidade adequada (Log P<5), com valores entre 1,53 e 2,15, com menor hidrofobicidade que a miltefosina (Log P=4,87). Os ligantes encontrados para NMT-03 mostraram valores moderados de P<sub>Caco-2</sub> (4-70 nm/s) variando de 15,20 nm/s (MP-002-527-121) a 18,86 nm/s (MP-002-911-081 e MP-002-911-112) e de P<sub>MDCK</sub> (25-500 nm/s), variando de 87,83 nm/s (MP-002-911-081 e MP-002-911-112) a

96,00 nm/s (MP-002-911-105). Além disso, todos eles mostraram alto percentual de AIH, ou seja, acima de 70%, variando de 87,85% a 96%. Todas as moléculas selecionadas foram previstas como não inibidoras da P-gP, corroborando com estudos de Wang et al. (2003) de que moléculas com Log P < 2,92 teriam menor probabilidade de serem substratos de P-gP (ver Tabela 9).

Resultados semelhantes foram obtidos para os ligantes encontrados pelo modelo farmacofórico de MetRS (Tabela 10).

Tabela 10 - Predição do perfil farmacocinético dos *hits* encontrados para MetRS.

MetRS (PDB: 6SW)							
Molécula	Log P [a]	P <sub>Caco-2</sub> [b]	HIA (%) [c]	P <sub>MDCK</sub> [d]	P-gp [e]	LPP (%) [f]	BHE [g]
MP-044-725-922	1,53	19,67	82,99	41,24	Não	65,16	1,71
MP-035-706-274	1,53	19,67	82,99	41,24	Não	65,16	1,71
MP-047-145-221	1,53	19,67	82,99	41,24	Não	65,16	1,71
MP-002-911-112*	2,15	18,86	87,83	85,79	Não	87,41	0,19
MP-002-911-081*	2,15	18,86	87,83	85,79	Não	87,41	0,19
MP-021-804-706	1,94	21,12	85,69	211,57	Não	84,34	0,78
MP-002-507-460	1,65	17,75	92,29	46,32	Não	73,77	0,12
MP-002-528-375	1,65	17,75	92,29	46,32	Não	73,77	0,12
MP-002-911-105*	1,53	18,50	96,00	35,10	Não	72,70	0,03
MP-047-585-353	2,60	20,64	80,32	283,55	Não	90,57	0,31
MP-030-042-290	1,83	5,28	91,78	72,24	Não	86,26	1,5
MP-047-772-550	2,26	16,03	85,52	52,61	Não	86,97	0,28
MP-002-527-121*	1,61	15,2	92,27	52,12	Não	72,10	0,93
MP-035-705-940	2,05	19,53	80,41	101,49	Não	88,00	0,18
LWN	2,50	17,59	94,17	3,99	Não	74,77	0,03
Miltefosina	4,87	21,70	98,08	43,42	Sim	86,17	0,13

Fonte: Autora (2022). \*Ligantes em comum aos triados pelo modelo farmacofórico de NMT-03. <sup>[a]</sup>Lipofilicidade, <sup>[b]</sup>Permeabilidade em células Caco-2 (nm/s), <sup>[c]</sup>Percentual de absorção intestinal humana, <sup>[d]</sup>Permeabilidade em células MDCK (nm/s), <sup>[e]</sup>Inibição da glicoproteína-P, <sup>[f]</sup>Percentual de ligação às proteínas plasmáticas, <sup>[g]</sup>Permeação à barreira hematoencefálica.

Os valores de Log P variaram de 1,53 a 2,60; a permeabilidade em Caco-2 variou de 5,28 nm/s (MP-030-042-290) a 21,12 nm/s (MP-021-804-706); todas as moléculas apresentaram altos valores de HIA% (>70%); em relação à permeabilidade em MDCK, os ligantes mostraram valores intermediários de 35,10 nm/s (MP-002-911-105) a 283,55 nm/s (MP-047-585-353).

## 5.7 Predição da solubilidade em água dos novos *hits*

No que diz respeito à permeação em membranas biológicas, fármacos que possuem maior coeficiente de partição (Log P), tendem a ter maior taxa de permeação. No entanto, considerando a via de administração oral, o fármaco precisa ser liberado de sua forma farmacêutica e se dissolver em meio biológico, e isso é favorecido pela solubilidade relativa de uma substância não ionizada em água (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Assim, como critério de seleção dos ligantes mais promissores, foi utilizada a plataforma SwissADME para predição da hidrossolubilidade através dos métodos computacionais ESOL, ALI e SILICOS-IT. De forma geral, esses modelos realizam a predição da solubilidade aquosa através de Relação Estrutura-Propriedade Quantitativa (do inglês *Quantitative Structure-Property Relationships*, QSPR). O método ESOL (do inglês *Estimated SOLubility*) é um modelo que considera como descritores o peso molecular, Log P, número de ligações rotacionáveis e a proporção de átomos pesados associados diretamente a um sistema aromático (DELANEY, 2004). O modelo de Ali incorpora nas equações QSPR o Log P, o ponto de fusão da molécula e a área de superfície polar topológica (TPSA) (ALI et al., 2012). Por outro lado, o SILICOS-IT é um método baseado na contribuição de fragmentos modulados pela raiz quadrada do peso molecular (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Por fim, o *score* de solubilidade de cada método é dado em função do logaritmo decimal da solubilidade molar em água (Log S). Os Apêndices 25 e 26 contêm os valores de propriedades físico-químicas das moléculas encontradas para NMT-03 e MetRS, respectivamente.

A partir desses valores, a escala de Log S é categorizada em: insolúvel  $<-10$  <muito pouco solúvel  $<-6$  <moderadamente solúvel  $<-4$  <solúvel  $<-2$  <muito solúvel  $<0$  <altamente solúvel (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). No presente trabalho, a categoria atribuída a cada molécula é referente à média calculada dos *scores* dos três métodos de predição.

Dessa forma, os *hits* retratados na Tabela 11 foram classificados em sua maioria como solúveis (Log S de -3,64 a -3,79), tendo apenas a molécula MP-002-527-121 (Log S = -4,88) classificada como moderadamente solúvel. Nota-se que todos os ligantes mostraram melhor perfil de solubilidade que a molécula comercial miltefosina (Log S = -6,85), classificada



como muito pouco solúvel. O resultado de solubilidade da miltefosina está em conformidade com a literatura, cujo valor de Log S é igual a -6,30 (DRUGBANK, 2022).

Tabela 11 – Valores de Solubilidade em água preditos (Log S) dos compostos promissores, dos ligantes co-cristalizados e comercial.

Molécula	Log S (ESOL)	Log S <sub>(Ali)</sub>	Log S <sub>SI- LICOS-IT)</sub>	Média	Classe
MP-044-725-922	-2,43	-2,68	-1,94	-2,35	Solúvel
MP-035-706-274	-2,43	-2,68	-1,94	-2,35	Solúvel
MP-047-145-221	-2,43	-2,68	-1,94	-2,35	Solúvel
MP-002-911-112*	-3,93	-4,31	-2,67	-3,64	Solúvel
MP-002-911-081*	-3,93	-4,31	-2,67	-3,64	Solúvel
MP-003-959-279	-3,90	-4,10	-3,58	-3,86	Solúvel
MP-042-646-622	-3,90	-4,10	-3,58	-3,86	Solúvel
MP-002-517-277	-3,79	-3,91	-3,58	-3,76	Solúvel
MP-021-804-706	-2,63	-3,26	-1,39	-2,43	Solúvel
MP-002-507-460	-3,38	-3,49	-3,22	-3,36	Solúvel
MP-002-528-375	-3,38	-3,49	-3,22	-3,36	Solúvel
MP-002-911-105*	-3,44	-3,41	-4,51	-3,79	Solúvel
MP-047-585-353	-3,67	-4,52	-2,61	-3,60	Solúvel
MP-030-042-290	-3,81	-3,98	-3,44	-3,74	Solúvel
MP-047-772-550	-2,39	-3,17	-1,52	-2,36	Solúvel
MP-002-527-121*	-5,66	-5,65	-3,34	-4,88	Moderadamente solúvel
MP-035-705-940	-3,03	-3,26	-2,68	-2,99	Solúvel
TUQ <sup>[a]</sup>	-4,25	-4,33	-6,39	-4,99	Moderadamente solúvel
LWN <sup>[b]</sup>	-3,62	-4,12	-5,35	-4,36	Moderadamente solúvel
Miltefosina <sup>[c]</sup>	-5,32	-8,03	-7,20	-6,85	Muito pouco solúvel

Fonte: Autora (2022). \*Ligantes em comum aos triados pelo modelo farmacóforo de NMT-03; <sup>[a]</sup> e <sup>[b]</sup> ligante co-cristalizado ao sítio de NMT-03 e MetRS, respectivamente; <sup>[c]</sup> fármaco antiparasitário comercial.

Tendo em vista que os valores de Log S dos ligantes se mostraram satisfatórios em comparação ao da miltefosina (controle positivo), todas as moléculas foram selecionadas para a etapa descrita a seguir.

## 5.8 Predição da acessibilidade sintética dos novos *hits*

A predição da acessibilidade sintética (AS) é um fator relevante na priorização de ligantes promissores. O método empregado pelo SwissADME infere que fragmentos mais frequentes no banco de dados têm maior acessibilidade sintética, por outro lado, os fragmentos mais raros são associados a uma síntese difícil. Em uma molécula as contribuições de cada

fragmento são somadas e corrigidas em termos que descrevem tamanho e complexidade estrutural (macrociclos ou centros quirais, por exemplo). Por conseguinte, o *score* de AS gerado varia de 1 (molécula muito fácil de sintetizar) a 10 (molécula muito difícil de sintetizar) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

A Tabela 12 apresenta os resultados de acessibilidade sintética, e revela que esses valores estiveram entre 3,75 (exibido por MP-021-804-706) e 5,79. Nota-se que os ligantes MP-002-911-112, MP-002-911-081, MP-047-585-353, MP-030-042-290 e MP-035-705-940 mostram *scores* de acessibilidade sintética superiores ao da miltefosina (AS= 4,67), inferindo que tais compostos teriam maior dificuldade de síntese que um fármaco aprovado.

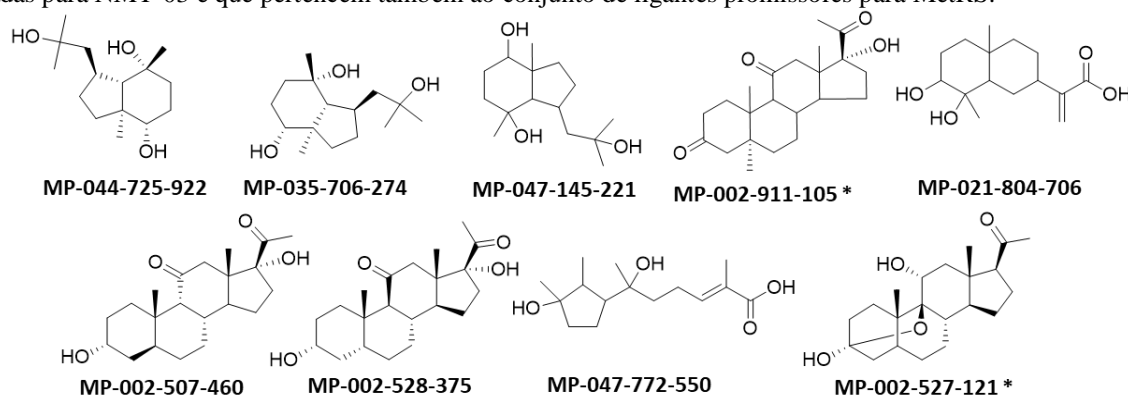
Tabela 12 - Valores de acessibilidade sintética compostos promissores, dos ligantes co-cristalizados e comercial.

Molécula	Acessibilidade sintética
MP-044-725-922	4,06
MP-035-706-274	4,06
MP-047-145-221	4,06
MP-002-911-112*	4,81
MP-002-911-081*	4,81
MP-021-804-706	3,75
MP-002-507460	4,47
MP-002-528-375	4,47
MP-002-911-105*	4,43
MP-047-585-353	5,11
MP-030-042-290	5,79
MP-047-772-550	4,21
MP-002-527-121*	4,21
MP-035-705-940	5,33
TUQ <sup>[a]</sup>	4,61
LWN <sup>[b]</sup>	2,83
Miltefosina <sup>[c]</sup>	4,67

Fonte: Autora (2022). \*Ligantes em comum aos triados pelo modelo farmacóforo de NMT-03 e MetRS; <sup>[a]</sup> e <sup>[b]</sup> ligante co-cristalizado ao sítio de NMT-03 e MetRS, respectivamente; <sup>[c]</sup> fármaco antiparasitário comercial.

Assim, adotando esse ponto de corte, somente as moléculas MP-044-725-922, MP-035-706-274, MP-047-145-221, MP-021-804-706, MP-002-507460, MP-002-528-375, MP-002-911-105, MP-047-772-550 e MP-002-527-121 (Figura 22) foram consideradas adequadas ao *docking* molecular com NMT-03 e MetRS.

Figura 22 – Moléculas aptas ao estudo de *docking* molecular. Em asterisco (\*) se encontram as únicas moléculas triadas para NMT-03 e que pertencem também ao conjunto de ligantes promissores para MetRS.



Fonte: Autora (2022).

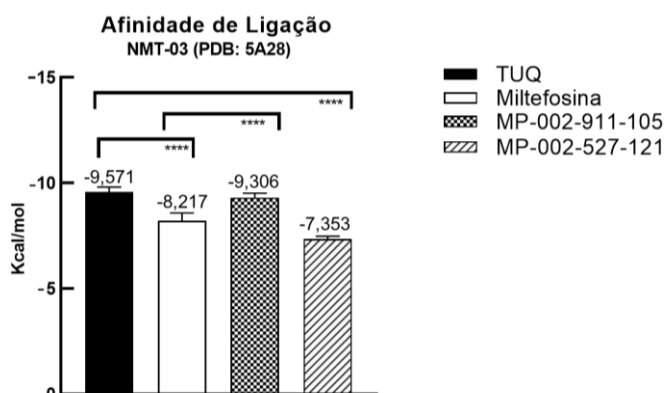
### 5.9 Docking molecular dos novos hits

Visando prever a conformação preferencial dos ligantes no sítio ativo de NMT-03 e MetRS, bem como estimar a energia livre de ligação dos complexos formados, foi realizado o estudo de *docking* molecular.

Os resultados mostraram que os valores de afinidade de ligação entre os ligantes MP-002-911-105 (-9,306 Kcal/mol) e MP-002-527-121 (-7,353 Kcal/mol) ao sítio ativo de NMT-03 foram menos negativos que àquele resultante do complexo formado entre a enzima e o ligante nativo (-9,571 Kcal/mol). Contudo, apenas MP-002-527-121 exibiu diferença estatisticamente significativa. O valor de afinidade de ligação de MP-002-911-105 foi significativamente mais negativo àquele resultante do ancoramento da miltefosina ao sítio de ligação de NMT-03 (-8,217 Kcal/mol). A miltefosina não tem atividade biológica reconhecida sobre NMT de parasitas do gênero *Leishmania*, o que justifica a sua escolha como controle negativo para os estudos de *docking* molecular. Novamente, apenas MP-002-527-121 mostrou maior afinidade de ligação, ou seja, valor mais positivo que a miltefosina (-8,217 Kcal/mol), indicando haver menor reconhecimento molecular e complementaridade estrutural.

O gráfico de barras apresentado na Figura 23 revela a análise estatística pela aplicação de ANOVA *One-Way*, seguida do teste de Tukey da média dos sete melhores valores de afinidade de ligação das moléculas estudadas.

Figura 23 – Resultado de afinidade de ligação dos compostos com *Lm*NMT (NMT-03). O teste ANOVA e de Tukey confirmaram que a diferença de valores de afinidade de ligação de TUQ (controle positivo) e MP-002-911-105 é significativa em relação ao controle negativo (miltefosina). Diferença de afinidade de ligação confirmada entre TUQ e MP-002-527-121.

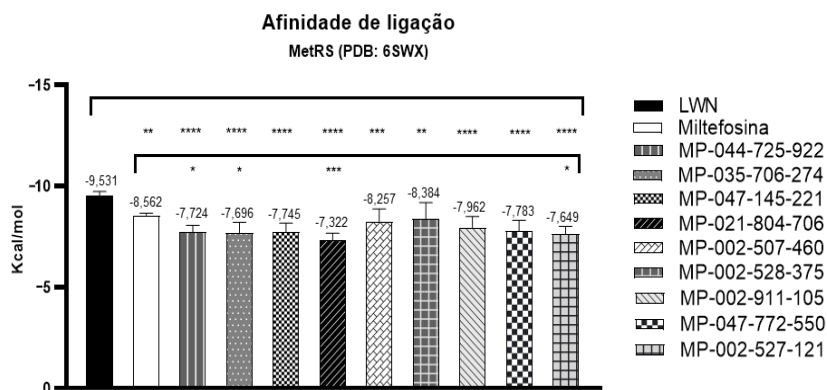


Fonte: Autora (2022). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

No *docking* molecular em MetRS (PDB: 6SWX), nota-se valores médios de afinidade de ligação entre -8,384 (MP-002-528-375) a -7,322 Kcal/mol (MP-021-804-706). Igualmente, esses valores se mostraram menos negativos que àquele obtido pelo ancoramento do ligante co-cristalizado (-9,531 Kcal/mol), notando-se pela avaliação estatística que essas diferenças são bastante significativas (ver Figura 24).

Ao contrário do que foi observado no *docking* anterior, apenas os ligantes MP-002-507-460 e MP-002-528-375 exibiram valores médios de afinidade de ligação mais negativos que o da miltefosina (-8,217 Kcal/mol), contudo não são estatisticamente significativos. A miltefosina não possui atividade conhecida sobre MetRS de tripanosomatídeos e, por essa razão, infere-se que os ligantes estudados podem não ser ativos em ensaios *in vitro* sobre a enzima.

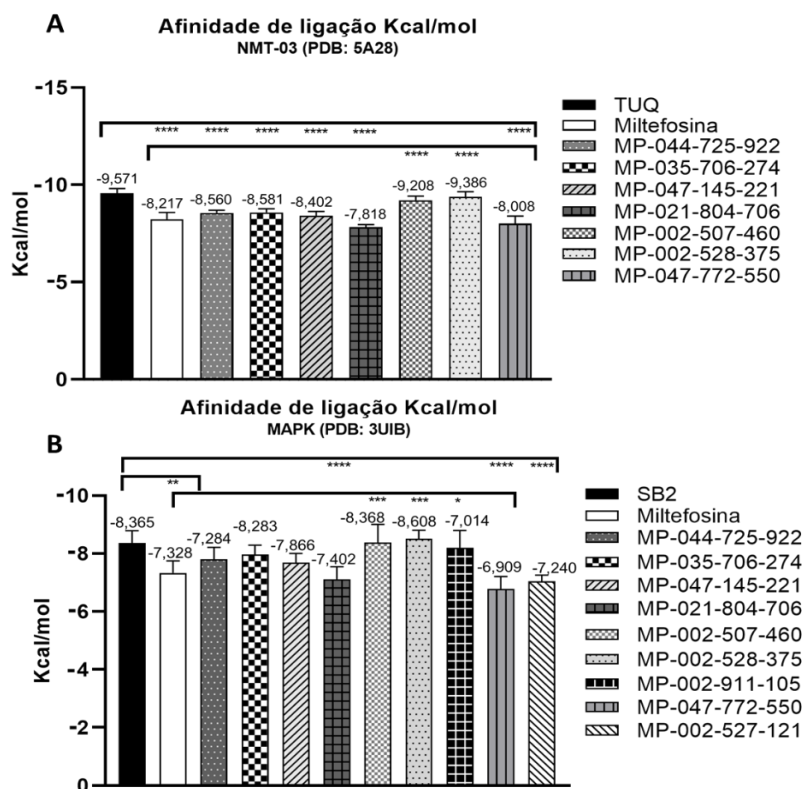
Figura 24 – Resultados de afinidade de ligação dos compostos com *Lm*MetRS. Teste de Tukey confirmou diferença significativa entre LWN e miltefosina (\*\* $p = 0,006$ ), bem como de LWN com todas as moléculas analisadas.



Fonte: Autora (2022). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $0,0002 \leq p \leq 0,0003$ ; \*\*  $p = 0,0018$

A fim de avaliar se os ligantes encontrados pelo modelo farmacofórico baseado nas interações de afidicolina com MetRS poderiam apresentar melhores valores de afinidade sobre outro receptor, as moléculas foram então ancoradas aos sítios ativos de NMT-03 e MAPK (Figura 25).

Figura 25 – Avaliação estatística das afinidades de ligação dos compostos com NMT-03 (A) e MAPK (B).

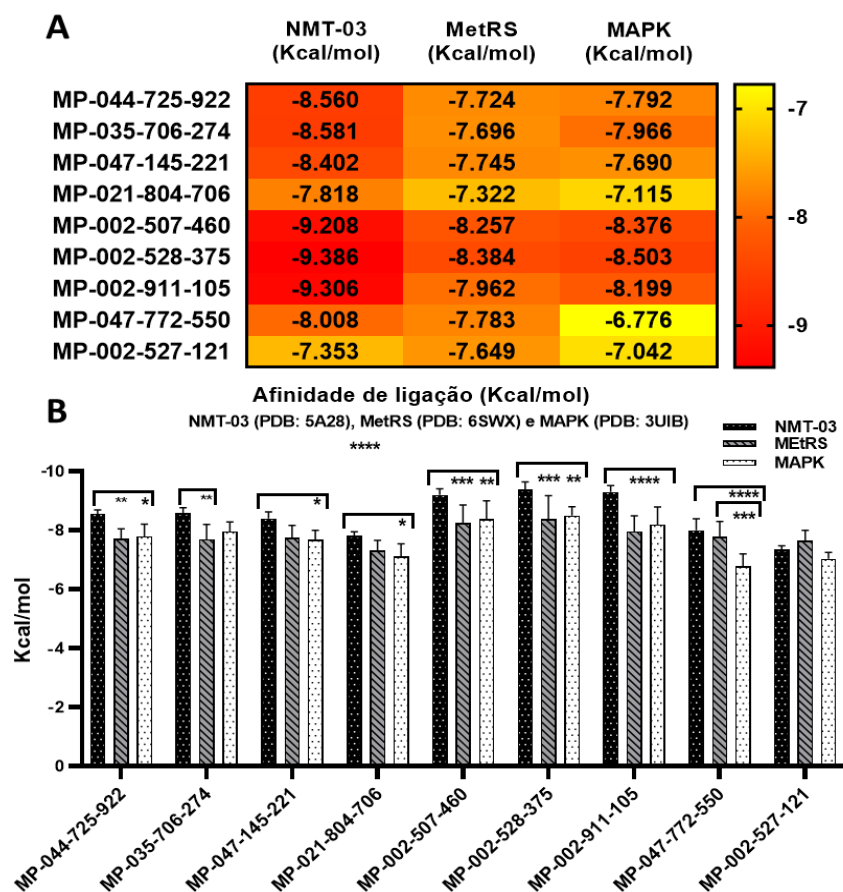


Fonte: Autora (2022). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $0,0001 \leq p \leq 0,0009$ ; \*\*  $p = 0,0011$ ; \*  $p = 0,0121$ .

Quando as moléculas foram ancoradas em NMT-03, somente os compostos MP-002-507-460 e MP-002-528-375 mostraram valores de  $\Delta G$  comparáveis ao ligante de referência e menores que do controle negativo. O mesmo comportamento foi observado nos resultados de *docking* com MAPK, adicionando a molécula MP-002-911-105 entre os complexos com melhor pontuação de energia livre de ligação.

A Figura 26a mostra as diferenças de afinidade de ligação por meio de um mapa de calor (*heatmap*), mostrando que os menores valores de  $\Delta G$ , em tons de laranja e vermelho, são apresentados pelos complexos ligantes-NMT, enquanto que os maiores são exibidos pelo ancoramento com MAPK em tons de amarelo e laranja.

Figura 26 - (A): *Heatmap* dos valores médios de afinidade de ligação ( $n=7$ ) comparados entre *LmNMT* e *LmMetRS*. As células em amarelo claro representam os valores menos negativos, enquanto que as células em tons de laranja e vermelho mostram os valores mais negativos de afinidade de ligação. (B) Gráfico de barras comparativo das moléculas triadas com *LmNMT* (NMT-03) e *LmMetRS*.



Fonte: Autora (2022). \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $0,0002 \leq p \leq 0,0008$ ; \*\* $p = 0,0017$

O teste estatístico ANOVA *two-way* confirmou essas diferenças, como apresentado na Figura 27b. Nota-se que somente os complexos alvo-MP-002-527-121 exibiram maior  $\Delta G$  em comparação aos demais, além de não demonstrar variações significativas entre de  $\Delta G$  entre os ancoramentos. Embora os complexos formados entre MP-002-507-460, MP-002-528-375 e MP-002-911-105 com MAPK tenham mostrado resultados relevantes sobre os controles positivo e negativo (Figura 26b), quando avaliado juntamente com NMT-03 e MetRS, a análise estatística evidenciou que os valores de energia livre dos ligantes ancorados a NMT é significativamente menor.

Portanto, considerando os resultados mostrados nas Figuras 24-27, considera-se que do conjunto de 09 moléculas relatadas na Figura 27, somente MP-002-911-105, MP-002-507-460 e MP-002-528-375 foram consideradas inibidores promissores de NMT de *L. major* (*LmNMT*).

A análise da seletividade sob a perspectiva das afinidades de ligação através da razão dos valores de  $\Delta G$  de um mesmo ligante ancorado a dois alvos distintos permitiu também propor medidas de seletividade complementares à análise estatística. A razão de seletividade mostrou que MP-002-911-105, MP-002-507-460 e MP-002-528-375 são em média 1,13 e 1,10 vezes mais seletivos à NMT do que à MetRS e MAPK, respectivamente, enquanto que a seletividade entre  $\Delta G_{\text{MetRS}}/\Delta G_{\text{MAPK}}$  dos ligantes variou de 0,88 a 0,98. Desse modo, foi demonstrado que os complexos com maior afinidade sobre um dado receptor, possuem índice de seletividade superior a 1, corroborando com os resultados descritos anteriormente (Tabela 13).

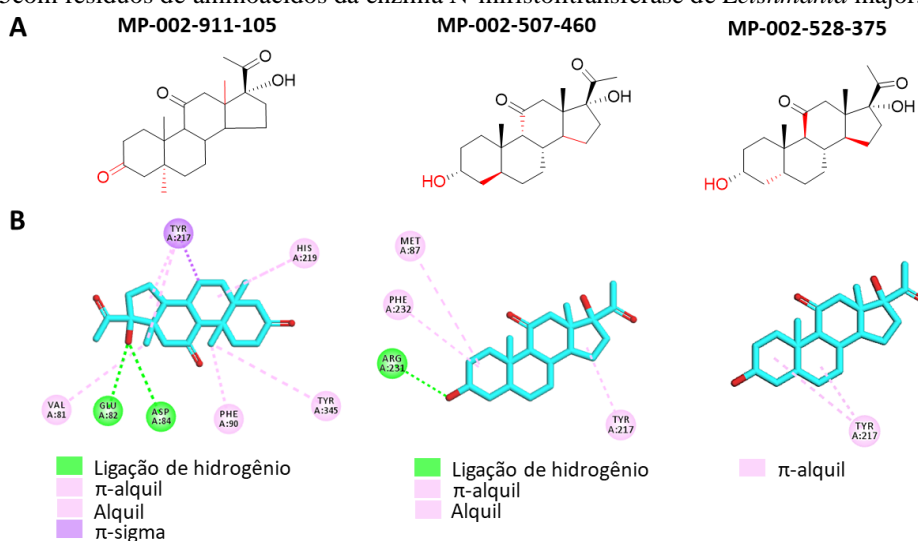
Tabela 13 - Índice de seletividade baseado em valores de afinidades de ligação dos complexos ligante-receptor.

Molécula	Seletividade		
	$\Delta G_{\text{NMT/MetRS}}$	$\Delta G_{\text{NMT/MAPK}}$	$\Delta G_{\text{MetRS/MAPK}}$
MP-002-507-460	1,11	1,09	0,88
MP-002-528-375	1,12	1,10	0,98
MP-002-911-105	1,17	1,13	0,97
Média	1,13	1,10	0,94

Fonte: Autora (2022).

Para visualizar os modos de interação desses complexos ligante-proteína foi utilizado o *software* Discovery Studio (Figura 27).

Figura 27 – (A) Estrutura 2D de MP-002-911-105, MP-002-507-460 e MP-002-528-375. Em vermelho estão destacadas as diferenças estruturais entre as moléculas (B) Interações de MP-002-911-105, MP-002-507-460 e MP-002-528-375 com resíduos de aminoácidos da enzima N-miristoiltransferase de *Leishmania major*.



Fonte: Autora (2022).

Nota-se acima que as moléculas resultantes da triagem são muito semelhantes a diterpenóides tetracíclicos, ou seja, terpenos formados por duas unidades de isopreno contendo grupos funcionais adicionais como o oxigênio (FELIPE et al., 2017).

Diferentemente do sistema biciclooctano apresentado pelos anéis C e D da afidicolina e derivados, essas moléculas são constituídas por um núcleo esteróide, portando semelhança apenas nos anéis A, B e C. É possível observar ainda que há uma grande similaridade estrutural entre as três moléculas, inclusive MP-002-507-460 e MP-002-528-375 são estereoisômeros. O ligante MP-002-911-105, além da estereoquímica, difere dos demais pela carbonila (C=O) ligada em C-3.

O ligante MP-002-911-105 é substituído em C-3 por um átomo de oxigênio e possui uma metila adicional cercada pelos anéis A e B. A orientação desse ligante ao sítio ativo de NMT-03 é divergente em alguns aspectos das moléculas obtidas por triagem virtual apresentadas até aqui. Ao todo, são exibidas cinco interações hidrofóbicas em pontos distintos na molécula, envolvendo um resíduo de Val81 e uma metila entre os anéis C e D, resíduos de Phe90 e Tyr345 em uma das metilas entre os anéis A e B, e Tyr217 nos anéis B, C e D. Duas ligações de hidrogênio são visualizadas entre a OH do anel D e resíduos de Glu82 e Asp84.

Embora a média da energia livre de ligação resultante do ancoramento de MP-002-528-375 com *Lm*NMT (NMT-03) seja superior ao valor médio obtido em MP-002-507-460, a análise da pose de maior pontuação de MP-002-528-375 revelou a presença de poucas interações comparado ao seu isômero. Somente a cadeia aromática da Tyr217 promoveu interação  $\pi$ -alquil com a porção A e B da molécula. Os resultados do ancoramento de MP-002-507-460 mostraram três interações hidrofóbicas envolvendo os aminoácidos Met87 e Phe232 ao anel A, e Tyr217 ao anel D. Apenas uma ligação de hidrogênio foi formada entre a OH em C-3 e um resíduo de Arg231.

### 5.10 Predição do espectro de atividade biológica

O espectro de atividade biológica consiste em uma propriedade qualitativa de uma molécula, que caracteriza as suas propriedades intrínsecas que dependem exclusivamente da estrutura química. Os resultados de predição da atividade biológica utilizando o PASS compreendem uma lista de possíveis atividades indicadas por duas medidas: *Pa* (probabilidade da molécula ser ativa) e *Pi* (probabilidade da molécula ser inativa), desse modo, quanto mais próximo



de 1 for o valor de  $Pa$  e mais próximo de 0 for o valor de  $Pi$ , maior a probabilidade de confirmar a atividade prevista em ensaios experimentais (POROIKOV et al., 2003).

A predição da atividade biológica utilizando o servidor PASS resultou nos dados visualizados na Tabela 14. O composto comercial (miltefosina), como esperado, apresentou uma alta probabilidade de atividade antiprotozoária ( $Pa= 0,926$ ), porém o mesmo não foi observado para o ligante co-cristalizado TUQ, não sendo previsto por esse método *in silico* como uma potencial molécula leishmanicida. Em algumas situações os valores de  $Pa$  podem ser muito baixos ou não ser considerados na lista gerada pelo PASS, especialmente se o ligante de interesse não for estruturalmente semelhante ao conjunto de treinamento, constituindo um caso de alta novidade estrutural (POROIKOV et al., 2003). Segundo a análise realizada pelo servidor, os ligantes de interesse apresentaram probabilidade de atividade sobre *Leishmania* variando de 0,336 a 0,492, muito próximos aos *scores* relatados pela afidicolina e derivados que ficaram entre 0,262 e 0,490.

Tabela 14 - Predição da atividade biológica dos compostos selecionados por triagem virtual, da afidicolina (1) e derivados (2-14).

Molécula	$Pa$	$Pi$
1 <sup>[a], [b]</sup>	0,329	0,083
2 <sup>[a]</sup>	0,329	0,083
3 <sup>[a]</sup>	0,346	0,074
4 <sup>[a]</sup>	0,324	0,085
5 <sup>[a]</sup>	0,279	0,117
6 <sup>[a]</sup>	0,490	0,026
7 <sup>[a]</sup>	0,296	0,104
8 <sup>[a]</sup>	0,262	0,131
9 <sup>[a]</sup>	0,380	0,057
10 <sup>[b]</sup>	-	-
11 <sup>[a]</sup>	0,275	0,12
12 <sup>[a]</sup>	-	-
13 <sup>[a]</sup>	-	-
14 <sup>[a]</sup>	-	-
MP-002-507-460	0,492	0,025
MP-002-911-105	0,336	0,079
TUQ	-	-
Miltefosina	0,926	0,003

Fonte: Autora (2022). <sup>[a]</sup>Kayser et al. (2001); <sup>[b]</sup>Santos et al. (2014).

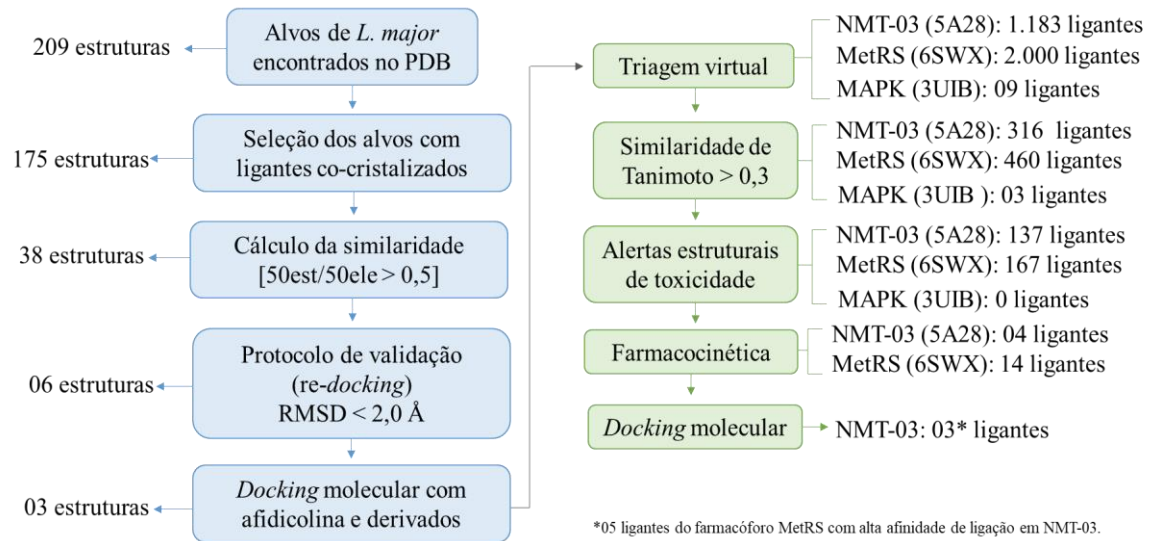
Através da análise visual da estrutura e consulta na literatura, observou-se que as moléculas são análogas de pregnenolona ( $C_{21}H_{32}O_2$ ), um hormônio endógeno resultante da

transformação metabólica do colesterol e precursor de hormônios esteroides, como progestagênicos, androgênicos, glicocorticoides e mineralocorticoides (BARBIERO; BIANCHI; KILSTRUP-NIELSEN, 2021). A pregnenolona ou seus derivados sintéticos vêm sendo estudados em diversos programas de descoberta de novos fármacos, apresentando atividade antimicrobiana (POPOVA et al., 2021), antiglioma (XIAO et al., 2014), antidepressiva (BARBIERO; BIANCHI; KILSTRUP-NIELSEN, 2021) em ensaios pré-clínicos e sobre esquizofrenia em ensaios clínicos (RITSNER; BAWAKNY; KREININ, 2014).

O estudo de Aguilera et al. (2019) que buscou avaliar diferentes esteroides sintetizados a partir do esqueleto de pregnenolona, revelou que um derivado tiossemicarbazona apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* sobre *Leishmania* spp. e *T. cruzi* comparáveis aos fármacos benznidazol, glucantime e miltefosina. Outro estudo conduzido por PORTA et al. (2014) apresentou triazolilesteróis com atividade promissora sobre cepas de *L. donovani*. Sobre enzimas isoladas, a classe dos azaesteróis são inibidores conhecidos de delta (24)-esterol metiltransferase (24-SMT) de fungos, plantas e protozoários. A avaliação realizada por Orenes Lorente et al. (2004), mostra a importância da hidroxila livre na posição C-3 dos azaesteróis, a qual está associada a uma maior atividade sobre 24-SMT de *L. amazonensis* e *T. brucei*.

Em resumo, de acordo com o levantamento teórico realizado ao longo deste trabalho, as moléculas MP-002-911-105 e MP-002-507-460 podem ser eleitas para validação de atividade sobre parasitas de *Leishmania* spp. e sobre a enzima NMT, uma vez que demonstraram melhor perfil toxicológico e farmacocinético e valores de afinidade de ligação no sítio ativo de *LmNMT* (Figura 28).

Figura 28 – Resumo dos principais resultados deste estudo.



Fonte: Autora (2022).

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho envolveu uma combinação de metodologias *in silico* para identificação de potenciais alvos de *Leishmania major* modulados por afidicolina e derivados descritos por Kayser et al. (2001) e Santos et al. (2014).

Apenas alvos complexados com moléculas mais similares à afidicolina foram priorizados, uma vez que a similaridade estrutural é uma propriedade importante para predizer que um composto pode ter perfil biológico semelhante a uma entidade química já conhecida. O protocolo de validação através do re-*docking* foi importante para o refinamento de estruturas cristalográficas com valores de RMSD  $<2 \text{ \AA}$ , selecionando apenas estruturas cujo ancoramento foi confiável. Os resultados mostraram que essa abordagem foi eficiente em selecionar alvos de *L. major* essenciais para a viabilidade dos parasitas, sendo eles N-miristoiltransferase (NMT-03/ PDB: 5A28), metionil tRNA-sintetase (MetRS/ PDB: 6SWX) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK/ PDB: 3UIB).

O modelo farmacofórico construído a partir da afidicolina e derivados permitiu identificar potenciais *hits* direcionados para cada um dos três alvos selecionados na triagem virtual inversa. Através dos filtros aplicados, foram selecionados novos ligantes com melhores propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e com nenhum alerta estrutural de toxicidade.

Os resultados de *docking* molecular dos afidicolanos e novos *hits* mostraram valores de afinidade de ligação promissores quando ancorados com a *LmNMT*. Dos novos *hits*, apenas duas moléculas (MP-002-507-460 e MP-002-911-105) foram são consideradas promissoras. Esses dois esteroides análogos de pregnenolona mostraram resultados de predição de atividade biológica *in silico* sobre leishmaniose comparáveis à afidicolina e derivados, além de haver na literatura indícios de que esteroides sintéticos podem atuar contra parasitas do gênero *Leishmania* spp.

Este trabalho, portanto, apontou a possibilidade de terpenóides tetracíclicos como a afidicolina e esteroides atuarem sobre N-miristoiltransferase de *L. major*. Porém, a abordagem teórica é insuficiente para afirmar a atividade biológica, somente futuros ensaios *in vitro* de modelos de *Leishmania* spp. podem confirmar a utilidade desses compostos como inibidores de NMT.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-RAZEK, Ahmed S. et al. Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, v. 8, n. 4, p. 470, 2020.

AGUILERA, Elena et al. A nature-inspired design yields a new class of steroids against trypanosomatids. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3800, 2019.

ALI, Jogoth et al. In silico prediction of aqueous solubility using simple QSPR models: the importance of phenol and phenol-like moieties. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 11, p. 2950-2957, 2012.

ALONSO, Hernan; BLIZNYUK, Andrey A.; GREASY, Jill E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal research reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, Vinicius et al. Quimioinformática: uma introdução. **Química Nova**, v. 41, p. 202, 2017.

ANDERSON, Amy C. The process of structure-based drug design. **Chemistry & biology**, v. 10, n. 9, p. 787-797, 2003.

ANDREI, César Cornélio et al. **Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático**. 2012.

ARAÚJO, Pedro HF et al. Identification of potential COX-2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases using molecular modeling approaches. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4183, 2020.

ASWATHY, Lilly et al. Design of novel amyloid  $\beta$  aggregation inhibitors using QSAR, pharmacophore modeling, molecular docking and ADME prediction. **In Silico Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2018.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

BALDI, Pierre; NASR, Ramzi. When is chemical similarity significant? The statistical distribution of chemical similarity scores and its extreme values. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 7, p. 1205-1222, 2010.

BARANOVSKIY, Andrey G. et al. Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 22, p. 14013-14021, 2014.

BARBIERO, Isabella; BIANCHI, Massimiliano; KILSTRUP-NIELSEN, Charlotte. Therapeutic potential of pregnenolone and pregnenolone methyl ether on depressive and CDKL5 deficiency disorders: Focus on microtubule targeting. **Journal of neuroendocrinology**, v. 34, n. 2, p. e13033, 2022.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.

BATOOL, Maria; AHMAD, Bilal; CHOI, Sangdun. A structure-based drug discovery paradigm. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, p. 2783, 2019.

BERGER, Nathan A. et al. Aphidicolin inhibits eukaryotic DNA replication and repair—implications for involvement of DNA polymerase  $\alpha$  in both processes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 89, n. 1, p. 218-225, 1979.

BERNAL, Freddy A.; COY-BARRERA, Ericsson. In-silico analyses of sesquiterpene-related compounds on selected *Leishmania* enzyme-based targets. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5550-5569, 2014.

BIKADI, Zsolt et al. Predicting P-glycoprotein-mediated drug transport based on support vector machine and three-dimensional crystal structure of P-glycoprotein. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25815, 2011.

BISHT, Neema; SINGH, B. K. Role of computer aided drug design in drug development and drug discovery. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 9, n. 4, p. 1405-1415, 2018.

BOGDAN, Christian. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71, n. Suppl 2, p. i60-i66, 2012.

BRANNIGAN, James A. et al. Diverse modes of binding in structures of *Leishmania major* N-myristoyltransferase with selective inhibitors. **IUCrJ**, v. 1, n. 4, p. 250-260, 2014.

BRITTAIN, Harry G. Circular dichroism studies of the self-association of amphotericin B. **Chirality**, v. 6, n. 8, p. 665-669, 1994.

BROOIJMANS, Natasja; KUNTZ, Irwin D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, n. 1, p. 335-373, 2003.

BRUNDRET, K. M. et al. X-Ray crystallographic determination of the structure of the antibiotic aphidicolin: a tetracyclic diterpenoid containing a new ring system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 18, p. 1027-1028, 1972.

BUCKNALL, R. A. et al. Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 294-298, 1973.

CAVASOTTO, Claudio N.; ORRY, W.; ANDREW, J. Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1006-1014, 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Parasites-Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. Acesso em 20 jan. 2020.

CERETO-MASSAGUÉ, Adrià et al. Tools for in silico target fishing. **Methods**, v. 71, p. 98-103, 2015.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel Angel et al. A computational approach using bioinformatics to screening drug targets for *Leishmania infantum* species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

CHEUKA, Peter Mubanga et al. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 2017.

CINATL, Jindrich et al. Aphidicolin selectively kills neuroblastoma cells in vitro. **Cancer letters**, v. 67, n. 2-3, p. 199-206, 1992.

CORPAS-LOPEZ, Victoriano et al. Pharmacological validation of N-myristoyltransferase as a drug target in *Leishmania donovani*. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 111-122, 2018.

COSTA, Jackson Mauricio Lopes. **Epidemiologia das leishmanioses no Brasil**. 2005.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

DELANEY, John S. ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000-1005, 2004.

DING, Peng et al. PTS: a pharmaceutical target seeker. **Database**, v. 2017, 2017.

DOS SANTOS, Kelton LB et al. Identification of Novel Chemical Entities for Adenosine Receptor Type 2A Using Molecular Modeling Approaches. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1245, 2020.

DRUGBANK. **Drugbank Database**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09031>. >Acesso em: 20 fev. 2022.

EDELSON, R. E.; GORYCKI, P. D.; MACDONALD, T. L. The mechanism of aphidicolin bioinactivation by rat liver in vitro systems. **Xenobiotica**, v. 20, n. 3, p. 273-287, 1990.

E LOHNING, Anna et al. A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 18, p. 2023-2040, 2017.

ENGEL, Thomas. Basic overview of chemoinformatics. **Journal of chemical information and modeling**, v. 46, n. 6, p. 2267-2277, 2006.

EWEAS, Ahmad F.; MAGHRABI, Ibrahim A.; NAMARNEH, Ali Ibrahim. Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 6, p. 211-228, 2014.

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, p. 1-7, 2019.

FELIPE, Lorena O. et al. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERREIRA, Rafaela S.; GLAUCIUS, Oliva; ANDRICOPULO, Adriano D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Quim. Nova**, p. 1770-1778, 2011.

FERREIRA, Leonardo G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, Elenilze FB et al. Identification of New Inhibitors with Potential Antitumor Activity from Polypeptide Structures via Hierarchical Virtual Screening. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2943, 2019.

FORLI, W. et al. AutoDock Version 4.2. **J. Med. Chem**, v. 55, p. 623-638, 2012.

FREITAS-JUNIOR, Lucio H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GALATI, Salvatore et al. Recent advances in silico target fishing. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5124, 2021.

GEUSKENS, Maurice et al. An autoradiographic demonstration of nuclear DNA replication by DNA polymerase  $\alpha$  and of mitochondrial DNA synthesis by DNA polymerase  $\gamma$ . **Nucleic acids research**, v. 9, n. 7, p. 1599-1614, 1981.

GIOIA, Dario et al. Dynamic docking: A paradigm shift in computational drug discovery. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 2029, 2017.

GRINTER, Sam Z. et al. An inverse docking approach for identifying new potential anti-cancer targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 6, p. 795-799, 2011.

GUEDES, Isabella A.; KREMPSER, Eduardo; DARDENNE, Laurent E. DockThor 2.0: a free web server for protein-ligand virtual screening. **XIX SBQT-Simpósio Brasileiro de Química Teórica**, 2017.



GUERIN, Philippe J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUIDO, Rafael VC; ANDRICOPULO, Adriano D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos Químicos**, v. 2, n. 4, p. 24-36, 2008.

HERRERA-ACEVEDO, Chonny et al. Identification of Kaurane-type diterpenes as inhibitors of Leishmania pteridine reductase I. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3076, 2021.

HUANG, Hongbin et al. Reverse screening methods to search for the protein targets of chemopreventive compounds. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 138, 2018.

INCEBOZ, Tonay. Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. In: **Current Topics in Neglected Tropical Diseases**. IntechOpen, 2019.

KAGEYAMA, Kazunori et al. Aphidicolin inhibits cell proliferation via the p53-GADD45 $\beta$  pathway in AtT-20 cells. **Endocrine Journal**, p. EJ15-0084, 2015.

KARIMI, Abdollah; ALBORZI, Abdolvahab; AMANATI, Ali. Visceral leishmaniasis: An update and literature review. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. e31612, 2016.

KAYSER, O. et al. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 288-292, 2001.

KLEPSCH, Freya; VASANTHANATHAN, Poongavanam; ECKER, Gerhard F. Ligand and structure-based classification models for prediction of P-glycoprotein inhibitors. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 1, p. 218-229, 2014.

KLEBE, Gerhard. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug discovery today**, v. 11, n. 13-14, p. 580-594, 2006.

KUMAR, Vinay et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book**. Elsevier health sciences, 2014.

LAMBRINIDIS, George; VALLIANATOU, Theodosia; TSANTILI-KAKOULIDOU, Anna. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. **Advanced drug delivery reviews**, v. 86, p. 27-45, 2015.

LARSON, Eric T. et al. Structure of *Leishmania major* methionyl-tRNA synthetase in complex with intermediate products methionyladenylate and pyrophosphate. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 570-582, 2011..

LIONTA, Evanthia et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1923-1938, 2014.

LIU, Xian et al. In Silico target fishing: addressing a “Big Data” problem by ligand-based similarity rankings with data fusion. **Journal of cheminformatics**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2014.

LIU, Zhifeng et al. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 203, p. 139-150, 2018.

LONGIARU, Mathew et al. The effect of aphidicolin on adenovirus DNA synthesis. **Nucleic acids research**, v. 6, n. 10, p. 3369-3386, 1979.

LUQUE-ORTEGA, Juan Román; RIVAS, Luis. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1327-1332, 2007.

LYNE, Paul D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug discovery today**, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MASON, J. S.; GOOD, A. C.; MARTIN, E. J. 3-D pharmacophores in drug discovery. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 7, p. 567-597, 2001.

MELO FILHO, Cleber Camilo de. Identificação de novos compostos bioativos contra tripanosomatídeos a partir de estratégias integradas em química medicinal. 2018.

MENG, Xuan-Yu et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MISHRA, Bhanvi et al. Discovery of a novel DNA polymerase inhibitor and characterization of its antiproliferative properties. **Cancer biology & therapy**, v. 20, n. 4, p. 474-486, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. 2011.

MODA, Tiago L.; CARRARA, Alexandre E.; ANDRICOPULO, Adriano D. A fragment-based approach for the in silico prediction of blood-brain barrier permeation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2191-2196, 2012.

MONTANARI, C. A. Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. **Edusp: São Paulo, Brazil**, 2011.

MOORE, E. M.; LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 151, 2010.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael. Microbiologia medica 8 ed.

NEVES, David P.; LINARDI, P. M.; VITOR, RWA. *Parasitologia humana*. 11<sup>a</sup>. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NO, Joo Hwan. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016.

O'DWYER, Peter J. et al. Antitumor activity and biochemical effects of aphidicolin glycinate (NSC 303812) alone and in combination with cisplatin in vivo. **Cancer research**, v. 54, n. 3, p. 724-729, 1994.

OGUNGBE, Ifedayo Victor; NG, Joseph D.; SETZER, William N. Interactions of antiparasitic alkaloids with *Leishmania* protein targets: a molecular docking analysis. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 15, p. 1777-1799, 2013.

OHASHI, Mochihiko; TAGUCHI, Takahiko; IKEGAMI, Susumu. Aphidicolin: a specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 82, n. 4, p. 1084-1090, 1978.

ORENES LORENTE, Silvia et al. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2937-2950, 2004.

PAHO. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. **Report Leishmaniasis**. 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. **Report Leishmaniasis**. 2019.

PASSERO, Luiz Felipe Domingues et al. In vivo antileishmanial activity of plant-based secondary metabolites. In: **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**. Academic Press, 2013. p. 95-107.

PATEL, Rikin D. et al. MDCKpred: a web-tool to calculate MDCK permeability coefficient of small molecule using membrane-interaction chemical features. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 28, n. 9, p. 685-698, 2018.

PATRICK, Graham L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, 2013.

PEDRALI-NOY, Guido et al. Inhibition of DNA replication and growth of several human and murine neoplastic cells by aphidicolin without detectable effect upon synthesis of immunoglobulins and HLA antigens. **Cancer research**, v. 42, n. 9, p. 3810-3813, 1982.

PÉREZ-PERTEJO, Yolanda et al. Characterization of a methionine adenosyltransferase over-expressing strain in the trypanosomatid *Leishmania donovani*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 1, p. 10-19, 2006.

PETI, Wolfgang; PAGE, Rebecca. Molecular basis of MAP kinase regulation. **Protein science**, v. 22, n. 12, p. 1698-1710, 2013.

PICCIRILLO, Erika; AMARAL, Antonia Tavares do. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PLOTNIKOV, Alexander et al. As cascatas MAPK: componentes de sinalização, funções nucleares e mecanismos de translocação nuclear. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619-1633, 2011.

POLONIO, Tilman; EFFERTH, Thomas. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. **International journal of molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2008.

POPOVA, Teodora P. et al. Antimicrobial Activity of Pregnenolone in vitro. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, n. 1, p. 61-67, 2021.

POROIKOV, Vladimir V. et al. PASS biological activity spectrum predictions in the enhanced open NCI database browser. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 43, n. 1, p. 228-236, 2003.

PORTA, Exequiel OJ et al. Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs. **Steroids**, v. 79, p. 28-36, 2014.

PRICE, Helen P. et al. Myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7206-7214, 2003.

RACKHAM, Mark D. et al. Discovery of high affinity inhibitors of *Leishmania donovani* N-myristoyltransferase. **MedChemComm**, v. 6, n. 10, p. 1761-1766, 2015.

RAMÍREZ, Juan David; GUHL, Felipe. Molecular epidemiology of parasitic diseases: the Chagas disease model. **Epidemiology-Current Perspectives on Research and Practice**, v. 6, p. 95-118, 2012.

RANG, Rang et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

REY, Luís. Leishmania e leishmaníases: Os parasitos. In: REY, Luís. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013b.

RITSNER, Michael S.; BAWAKNY, Hisham; KREININ, Anatoly. Pregnenolone treatment reduces severity of negative symptoms in recent-onset schizophrenia: An 8-week, double-blind, randomized add-on two-center trial. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 68, n. 6, p. 432-440, 2014

ROATT, Bruno Mendes et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-13, 2020.

RODRIGUES, Ricardo P. et al. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

ROGNAN, Didier. Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 3, p. 176-187, 2010.

ROMAN, Diana Larisa et al. Computational assessment of the pharmacological profiles of degradation products of chitosan. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, p. 214, 2019.

SALA, Francesco et al. Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the  $\alpha$ -like DNA polymerase of plant cells. **FEBS letters**, v. 117, n. 1-2, p. 93-98, 1980.

SANDS, Michael; KRON, Michael A.; BROWN, Richard B. Pentamidine: a review. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 625-6344, 1985.

SANTOS, Adriana Oliveira dos et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59-64, 2013.

SANTOS, Gabriela Bianchi. et al. The semisynthetic landscape of aphidicolin: inspiration towards leishmanicidal compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1885-1899, 2014.

SANTOS, Gabriela Bianchi. et al. Semisynthesis of new aphidicolin derivatives with high activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 4, p. 1205-1208, 2016.

SCHNEIDER, Gisbert. Virtual screening: an endless staircase?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 4, p. 273-276, 2010.

SCHNEIDER, Gisbert. From theory to bench experiment by computer-assisted drug design. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 120-124, 2012.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, Dina et al. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl\_2, p. W223-W228, 2008.

SCIOR, Thomas et al. Recognizing pitfalls in virtual screening: a critical review. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 4, p. 867-881, 2012.

SEIDEL, Thomas et al. Applications of the pharmacophore concept in natural product inspired drug design. **Molecular Informatics**, v. 39, n. 11, p. 2000059, 2020.

SESSA, Cristiana et al. Phase I and clinical pharmacological evaluation of aphidicolin glycinolate. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 16, p. 1160-1164, 1991.

SETHI, Aaftaab et al. Molecular docking in modern drug discovery: principles and recent applications. **Drug Discovery and Development-New Advances**, p. 1-21, 2019.

SHILLING, Andrew J. et al. Spongian diterpenoids derived from the Antarctic sponge *Dendrilla antarctica* are potent inhibitors of the *Leishmania* parasite. **Journal of natural products**, v. 83, n. 5, p. 1553-1562, 2020.

SINGH, Bharat; SHARMA, Ram A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.

SINGH, Bhawana et al. Host-directed therapies for parasitic diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 1999-2018, 2019.

SOUSA, Sergio Filipe; FERNANDES, Pedro Alexandrino; RAMOS, Maria Joao. Protein–ligand docking: current status and future challenges. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 15-26, 2006.

SPADARI, Silvio; SALA, Francesco; PEDRALI-NOY, Guido. Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 29-32, 1982.

STARRATT, A. N.; LOSCHIAVO, S. R. The production of aphidicolin by *Nigrospora sphaerica*. **Canadian journal of microbiology**, v. 20, n. 3, p. 416-417, 1974.

SUNDAR, Shyam; CHATTERJEE, Mitali. Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 345, 2006.

SUNDAR, Shyam et al. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481, 2018.

TESSARO, Francesca; SCAPOZZA, Leonardo. How ‘Protein-Docking’ Translates into the New Emerging Field of Docking Small Molecules to Nucleic Acids?. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2749, 2020.

THOMAS, Santana AL et al. Keikipukalides, furanocembrane diterpenes from the Antarctic deep sea octocoral *Plumarella delicatissima*. **Journal of natural products**, v. 81, n. 1, p. 117-123, 2018.

TODESCHINI, Roberto et al. Similarity coefficients for binary chemoinformatics data: overview and extended comparison using simulated and real data sets. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 11, p. 2884-2901, 2012.

TORRES, Pedro HM et al. Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TORRIE, Leah S. et al. Chemical validation of methionyl-tRNA synthetase as a druggable target in *Leishmania donovani*. **ACS infectious diseases**, v. 3, n. 10, p. 718-727, 2017.

TORRIE, Leah S. et al. Discovery of an Allosteric Binding Site in Kinetoplastid Methionyl-tRNA Synthetase. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 1044-1057, 2020.

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, n. 7, p. 91-99, 1997.

V DA COSTA, Glauber et al. Hierarchical virtual screening of potential insecticides inhibitors of acetylcholinesterase and juvenile hormone from temephos. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 61, 2019.

VÁZQUEZ, Javier et al. Merging ligand-based and structure-based methods in drug discovery: An overview of combined virtual screening approaches. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4723, 2020.

VUORINEN, Anna; SCHUSTER, Daniela. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. **Methods**, v. 71, p. 113-134, 2015.

WANG, R. B. et al. Structure–activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 28, n. 3, p. 203-228, 2003.

WANG, Lirong et al. TargetHunter: an in silico target identification tool for predicting therapeutic potential of small organic molecules based on chemogenomic database. **The AAPS journal**, v. 15, n. 2, p. 395-406, 2013.

WANG, Yunling. Introduction to Parasitic Disease. In: **Radiology of Parasitic Diseases**. Springer, Dordrecht, 2017. p. 3-3.

WARREN, Gregory L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5912-5931, 2006.

WASEEM, Durdana et al. Carboxylate derivatives of tributyltin (IV) complexes as anticancer and antileishmanial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-14, 2017.

WHO. World Health Organization. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015**. World Health Organization, 2015.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 15 jan. 2020.

WHO. World Health Organization. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1). Acesso em 15 jan. 2022a.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 15 jan. 2022b.

WILLETT, Peter. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. **Drug discovery today**, v. 11, n. 23-24, p. 1046-1053, 2006.

XIAO, Xiao et al. Pregnenolone, a cholesterol metabolite, induces glioma cell apoptosis via activating extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. **Oncology letters**, v. 8, n. 2, p. 645-650, 2014.

YU, En-Yan; ZHAO, Rui-Yan; WANG, Dong-Sheng. Inhibitory effect of Aphidicolin-a tetracyclic diterpene-on the proliferation and apoptotic induction in human cervical cancer (HeLa) cells. **J BUON**, v. 20, n. 6, p. 1480-1486, 2015.

YUNTA, Maria JR; DIETRICH, Roque Carlos. Tropical and Subtropical Parasitic Diseases: Targets for a New Approach to Virtual Screening. **Molecular informatics**, 2019.

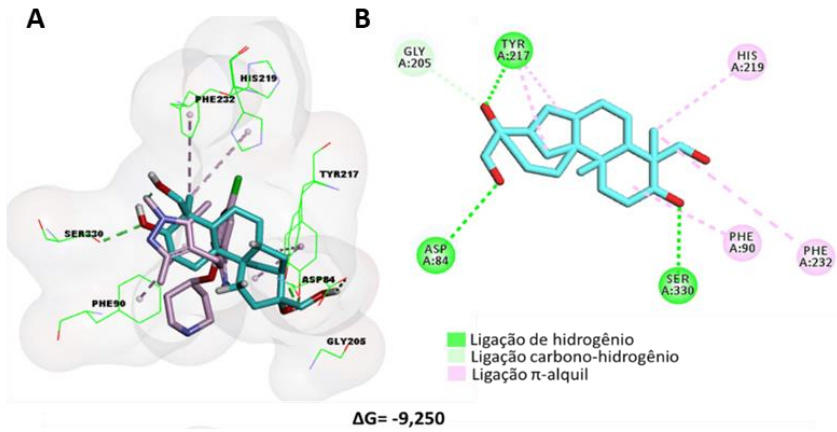
ZHENG, Weifan. **Chemoinformatics approaches to virtual screening**. Royal Society of Chemistry, 2008.



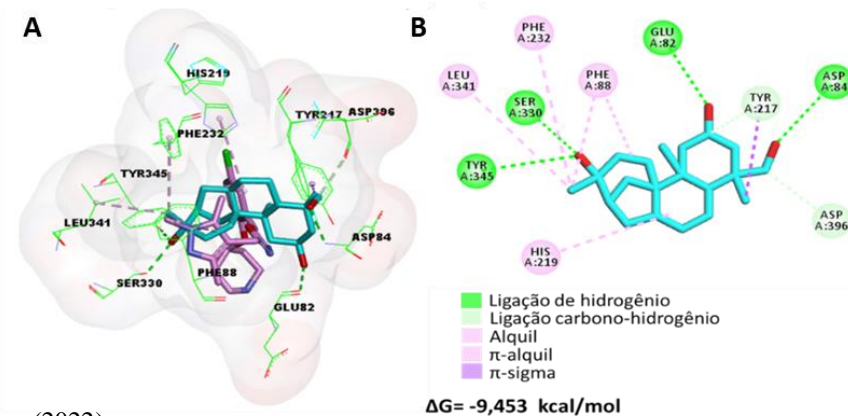
## APÊNDICES

Apêndice 1 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 2 e 3 (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

### Derivado 2+NMT-03



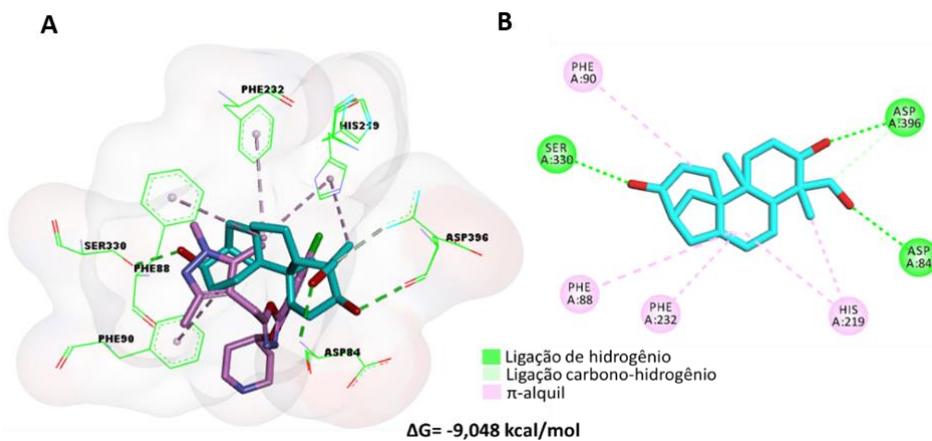
### Derivado 3+NMT-03



Fonte: Autora (2022).

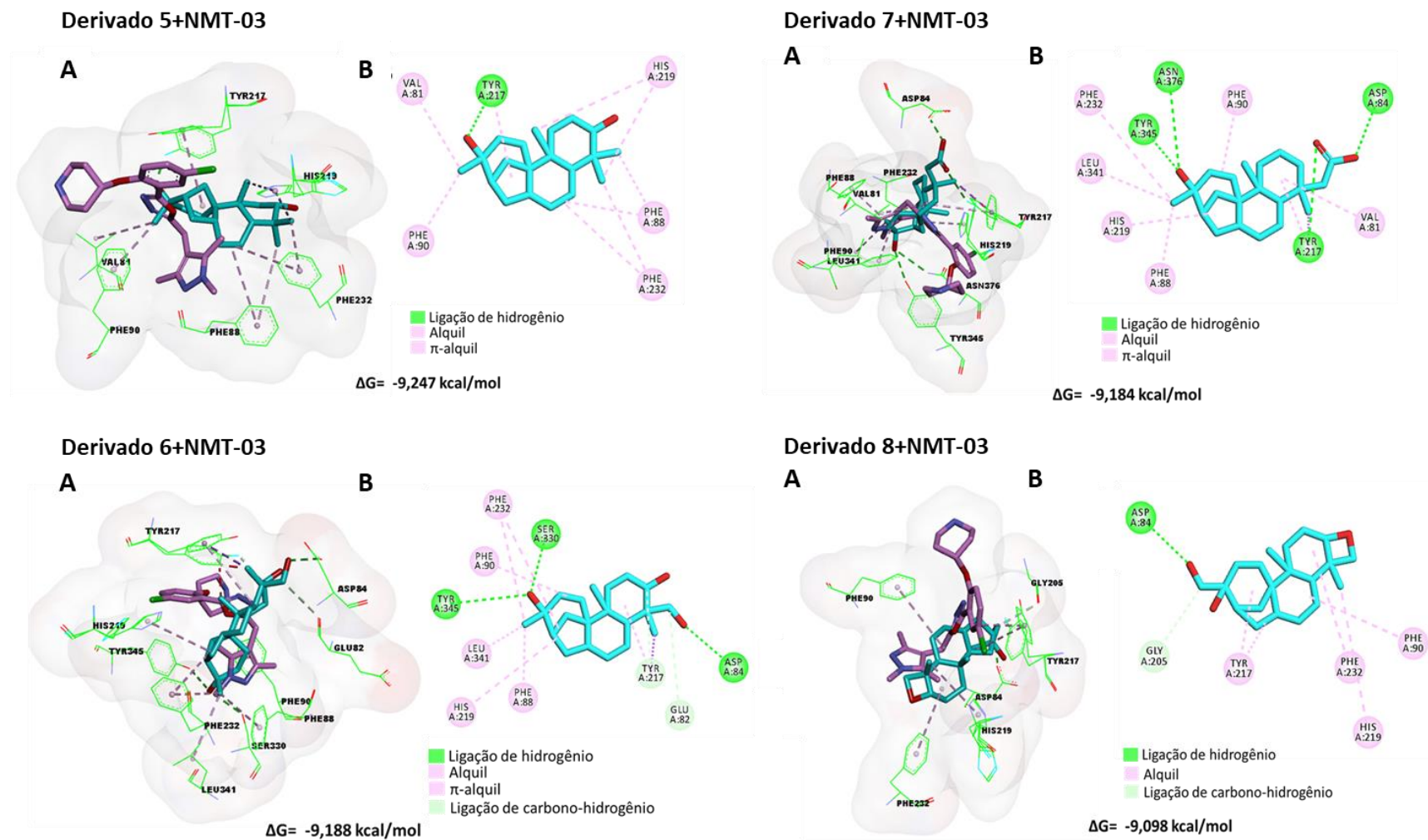
Apêndice 2 (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 4 (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

### Derivado 4+NMT-03



Fonte: Autora (2022).

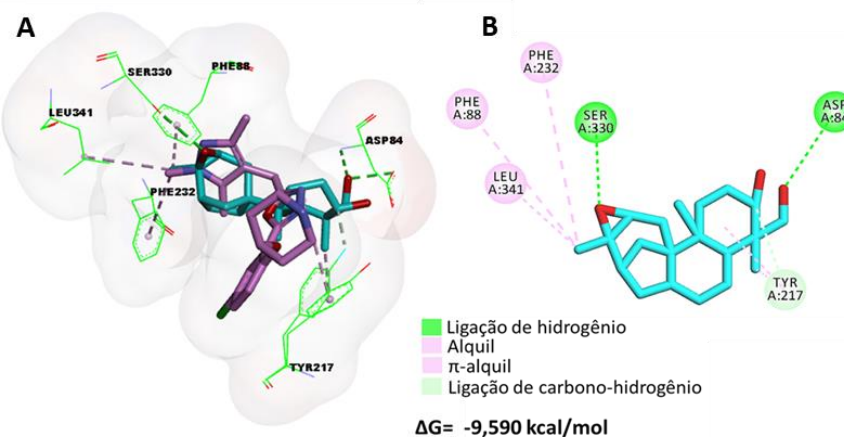
Apêndice 3 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 5, 6, 7 e 8 (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



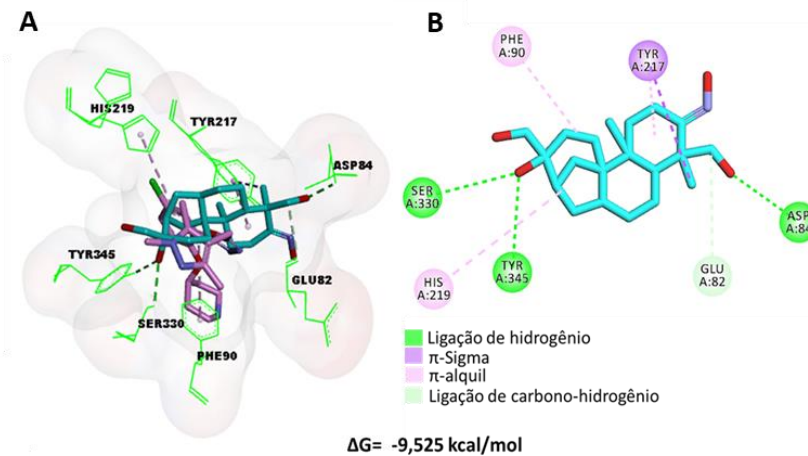
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 4 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 9, 10 e 11 (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

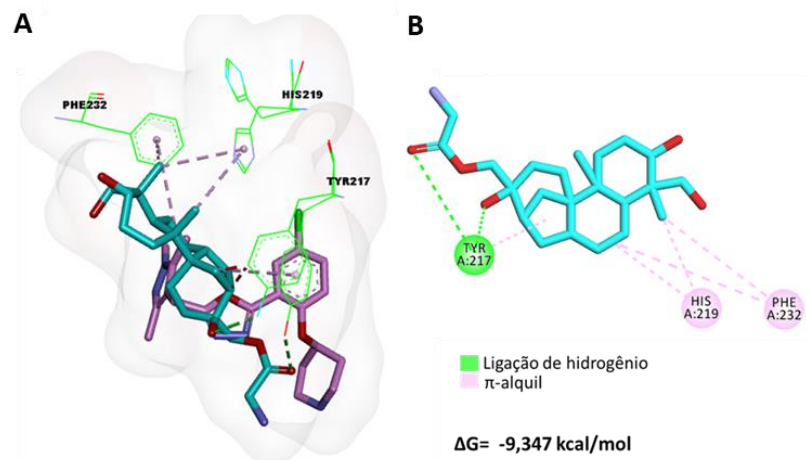
Derivado 9+NMT-03



Derivado 10+NMT-03



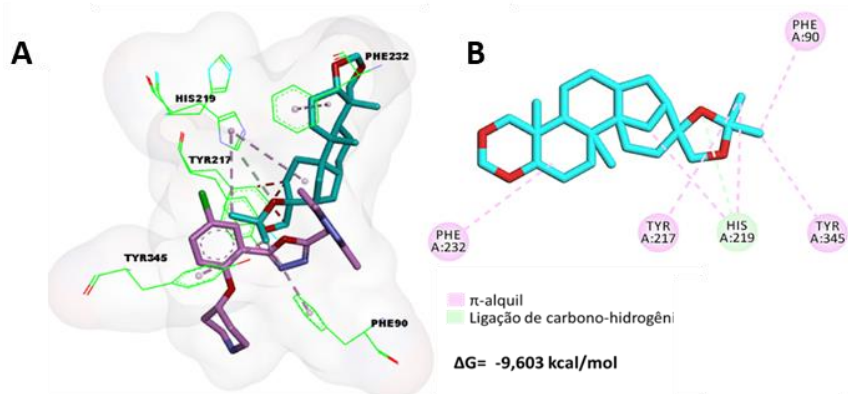
Derivado 11+NMT-03



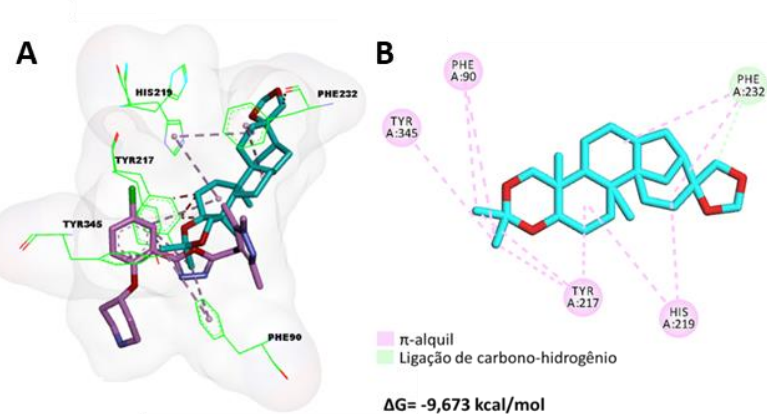
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 5 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 12, 13 e 14 (azul) ao sítio de ligação de NMT-03 (PDB: 5A28). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

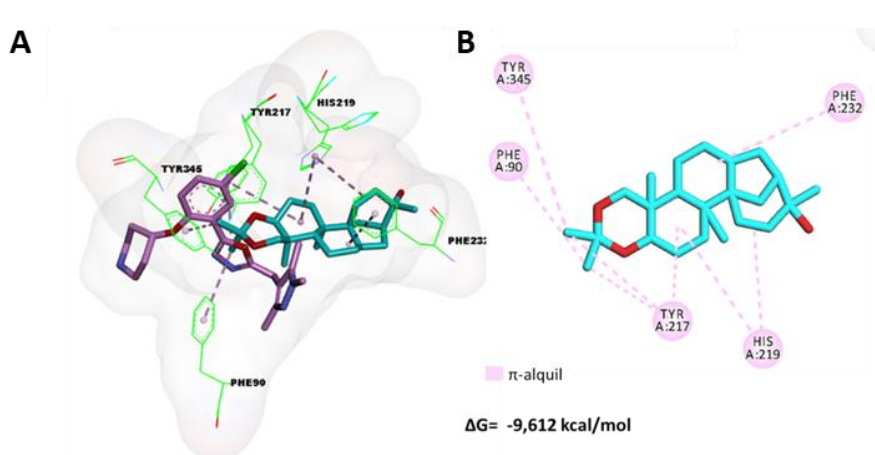
### Derivado 12+NMT-03



### Derivado 13+NMT-03

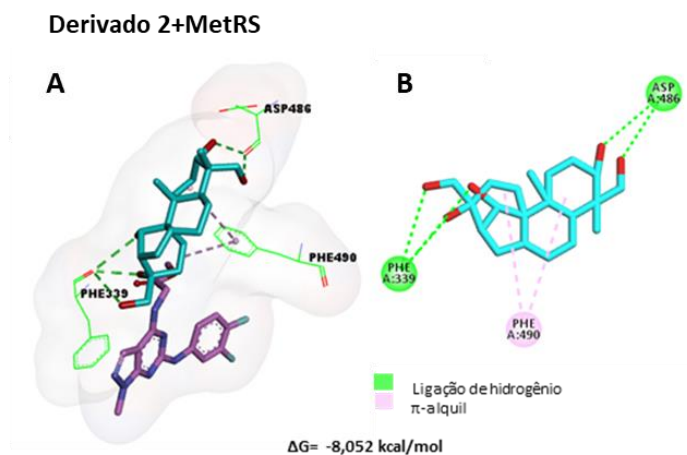


### Derivado 14+NMT-03



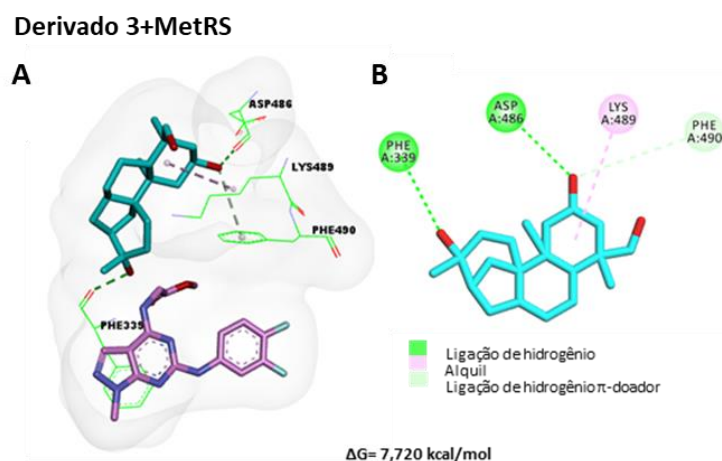
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 6 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 2 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



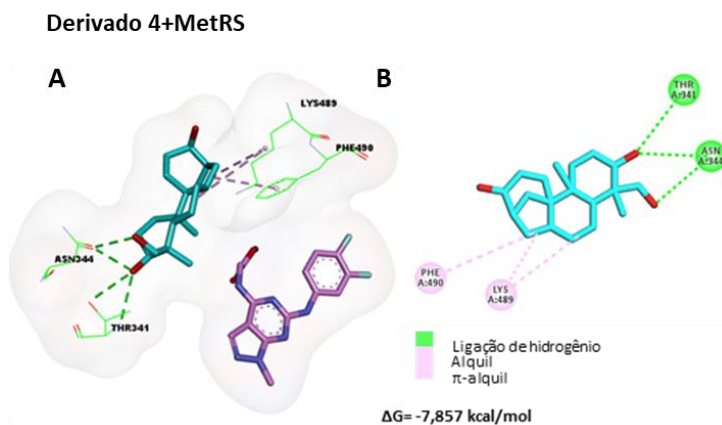
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 7 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 3 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



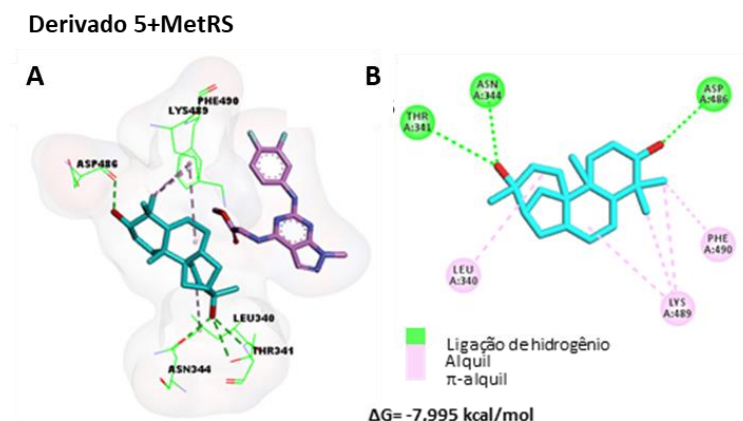
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 8 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 4 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



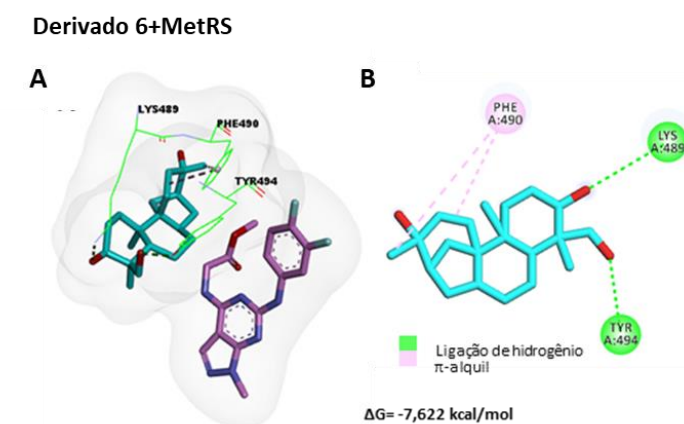
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 9 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 5 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



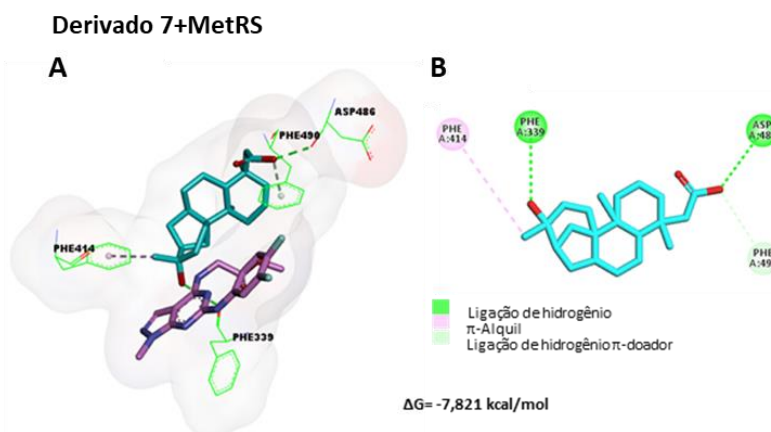
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 10 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 6 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



Fonte: Autora (2022).

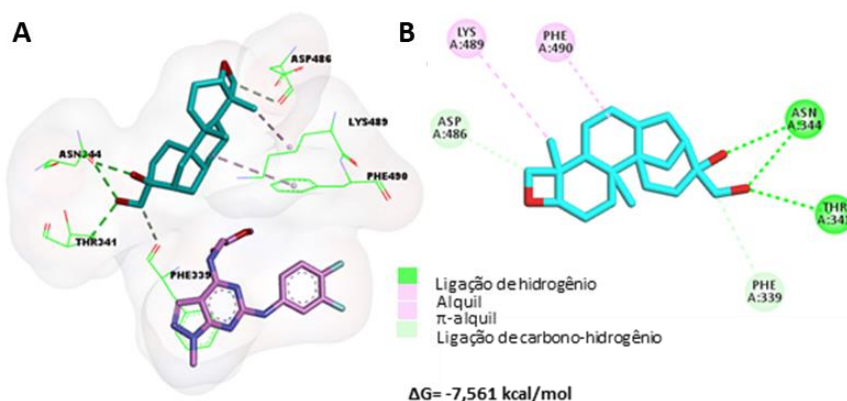
Apêndice 11 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 7 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 12 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 8 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

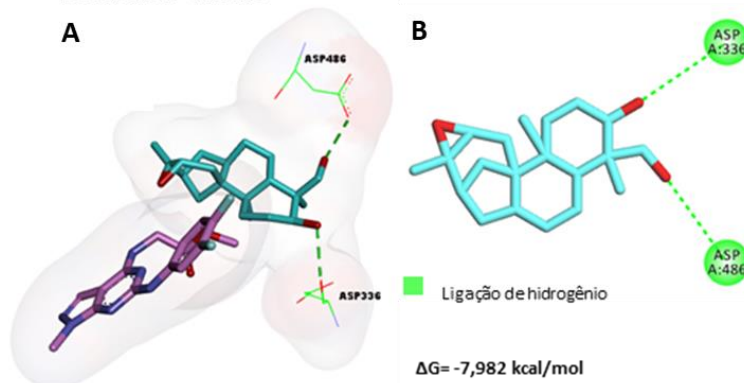
#### Derivado 8+MetRS



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 13 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 9 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

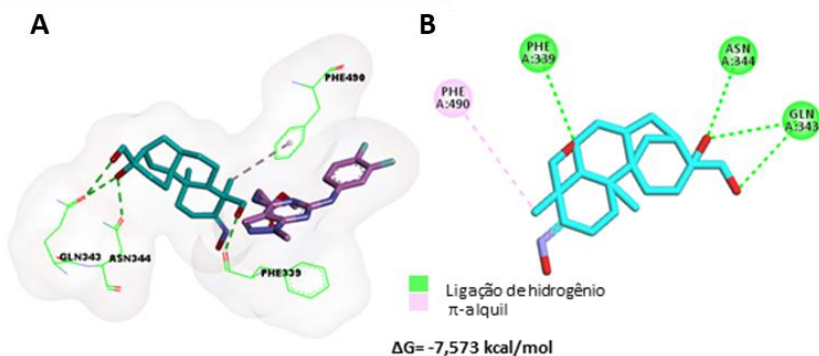
#### Derivado 9+MetRS



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 14 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 10 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

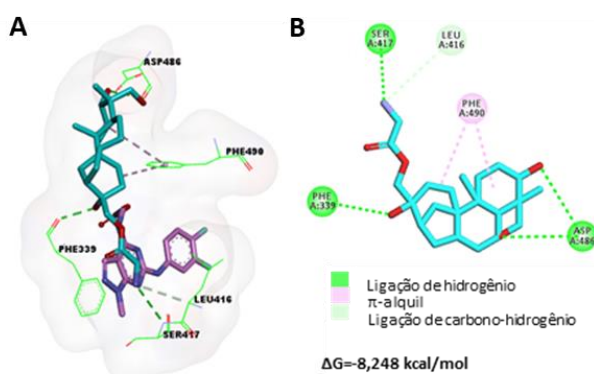
#### Derivado 10+MetRS



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 15 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 11 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

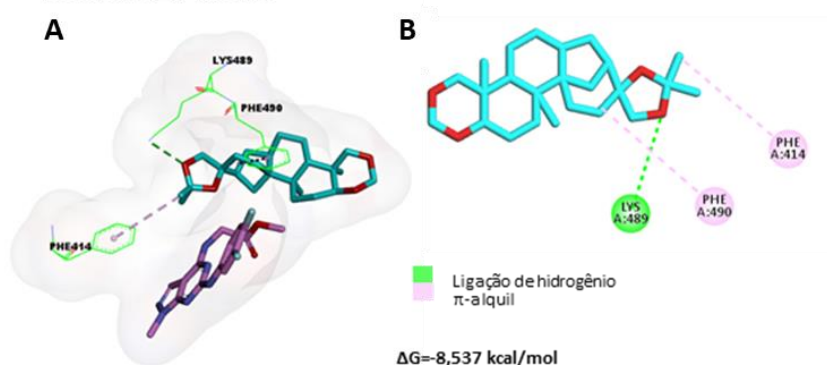
#### Derivado 11+MetRS



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 16 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 12 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

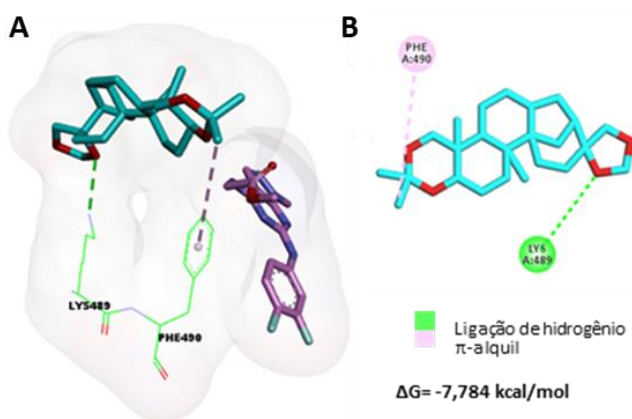
#### Derivado 12+MetRS



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 17 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 13 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

#### Derivado 13+MetRS

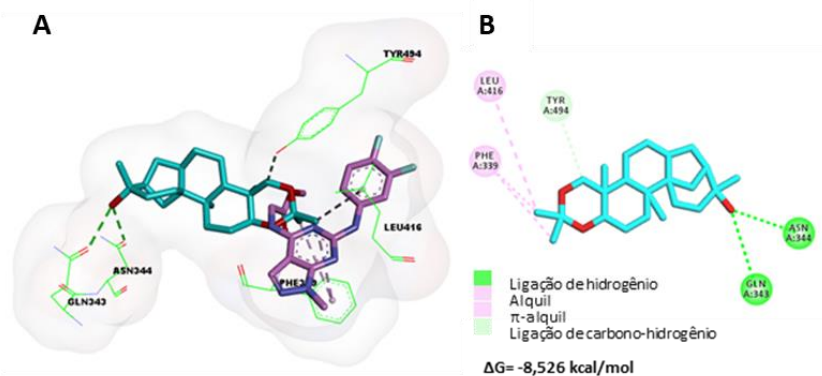


Fonte: Autora (2022).



Apêndice 18 – (A) comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 14 (azul) ao sítio de ligação de MetRS (PDB: 6SWX). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

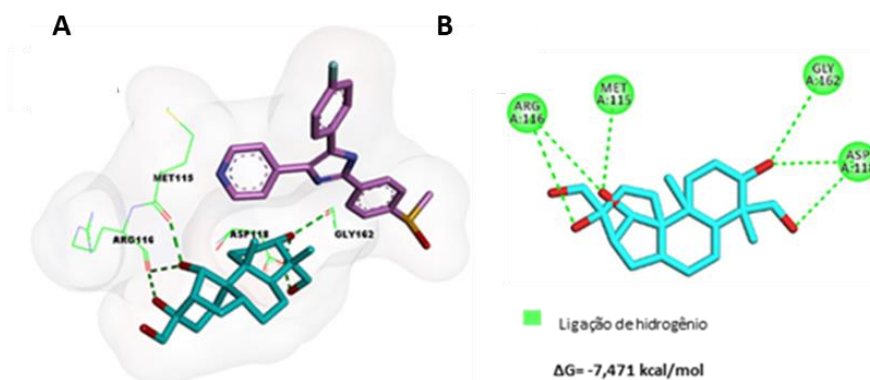
#### Derivado 14+MetRS



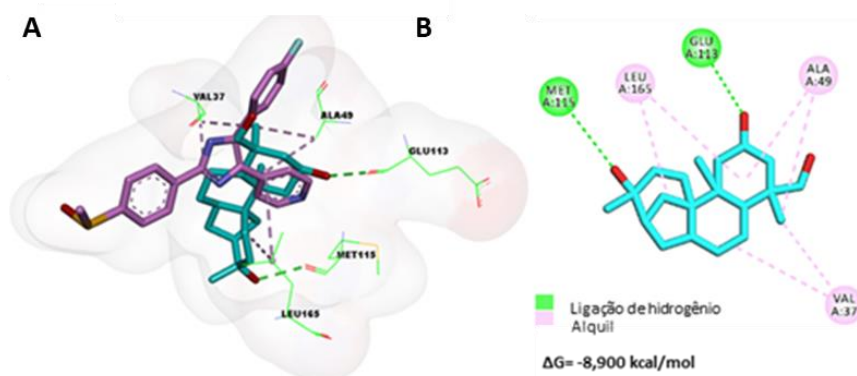
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 19 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 2 e 3 (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

#### Derivado 2+MAPK



#### Derivado 3+MAPK

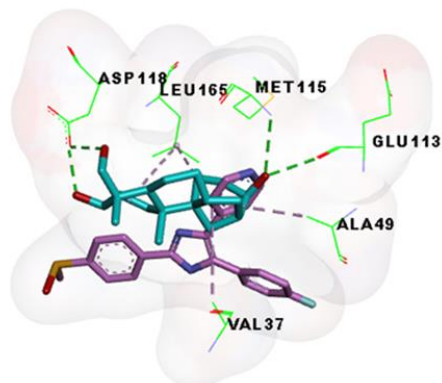


Fonte: Autora (2022).

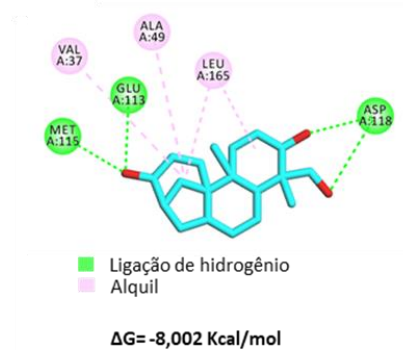
Apêndice 20 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivado 4 (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) Diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

### Derivado 4+MAPK

A



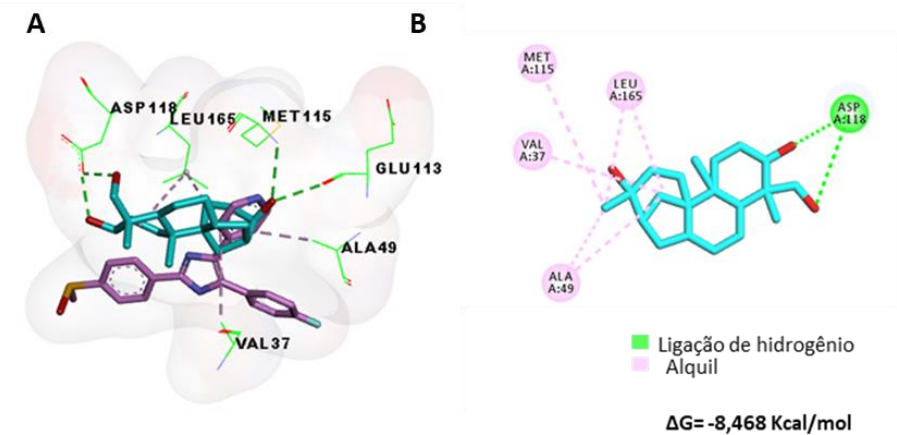
B



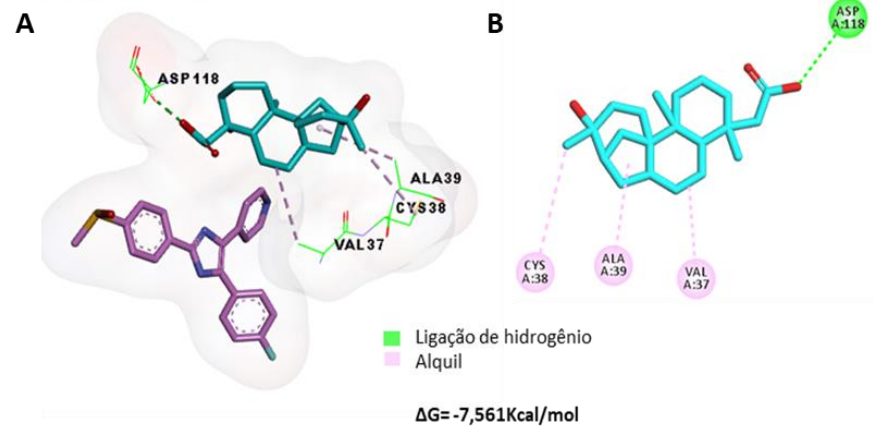
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 21 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 5, 6, 7 e 8 (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

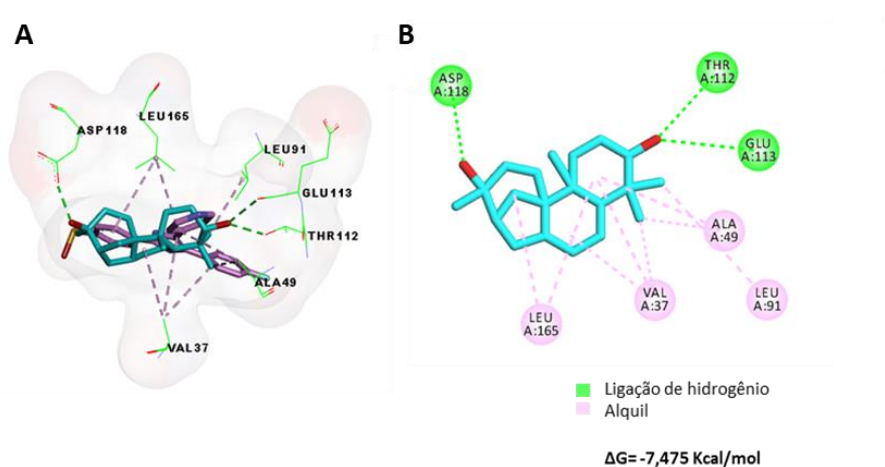
### Derivado 5+MAPK



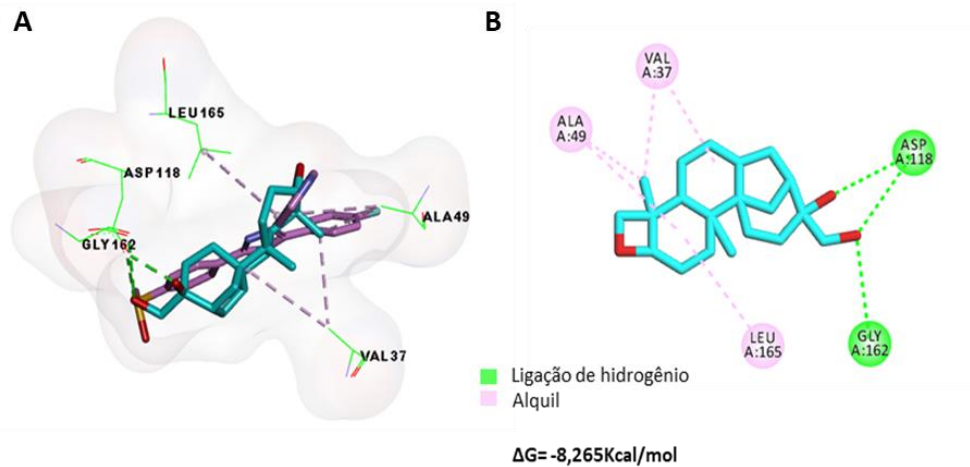
### Derivado 7+MAPK



### Derivado 6+MAPK



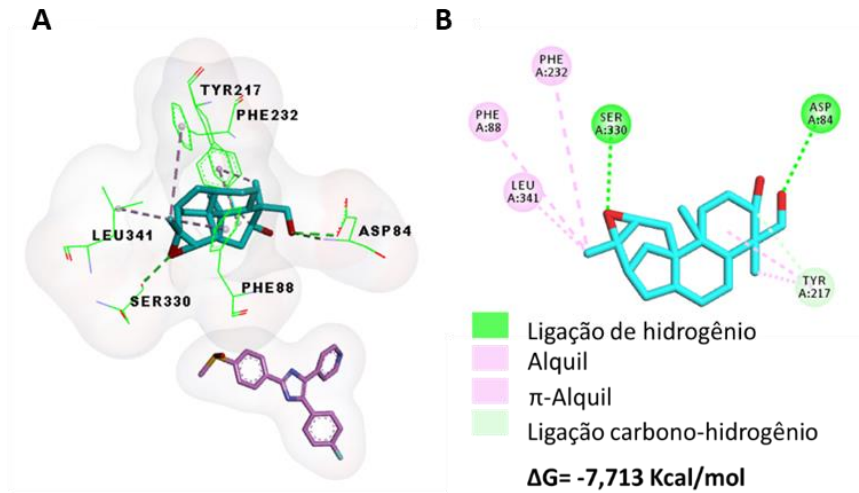
### Derivado 8+MAPK



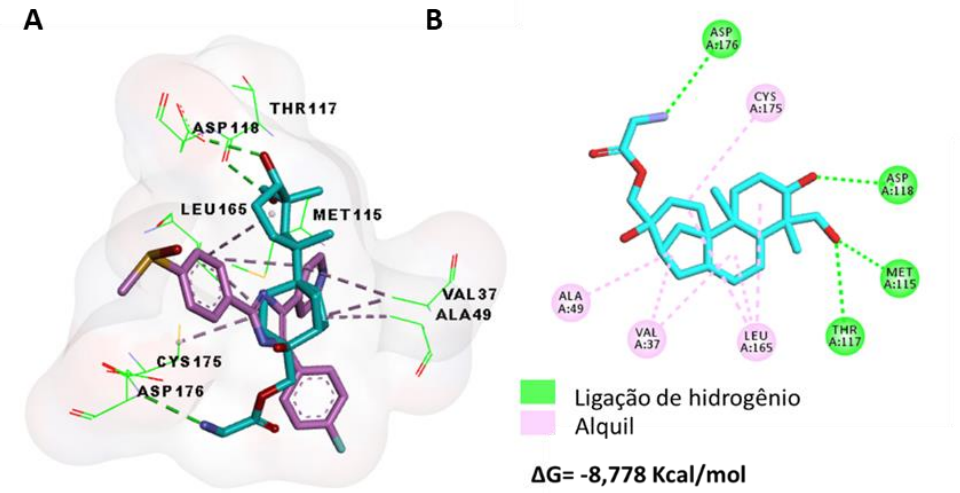
Fonte: Autora (2022).

Apêndice 22 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 9, 10 e 11 (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

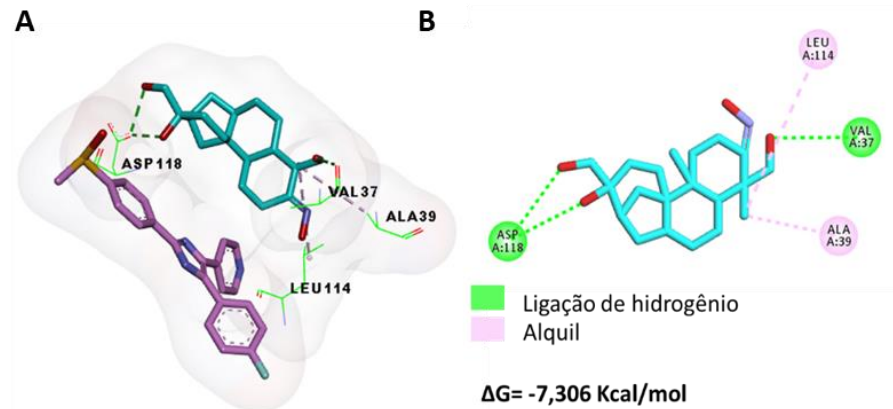
### Derivado 9+MAPK



### Derivado 11+MAPK

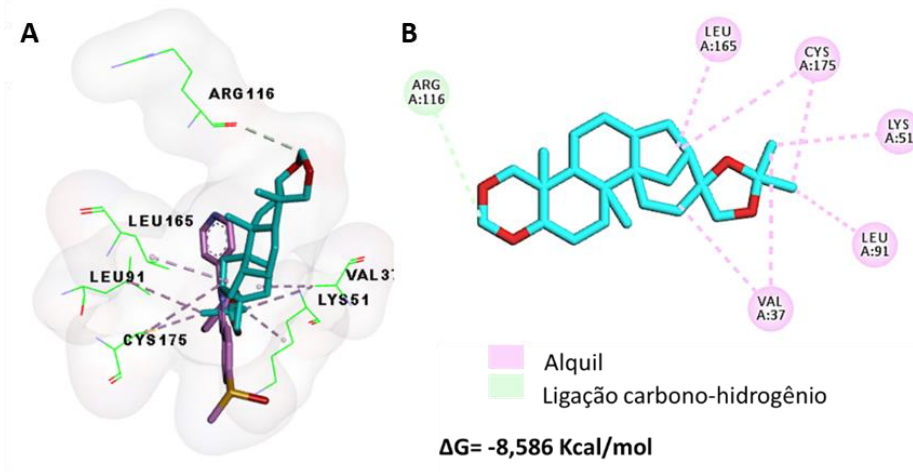


### Derivado 10+MAPK

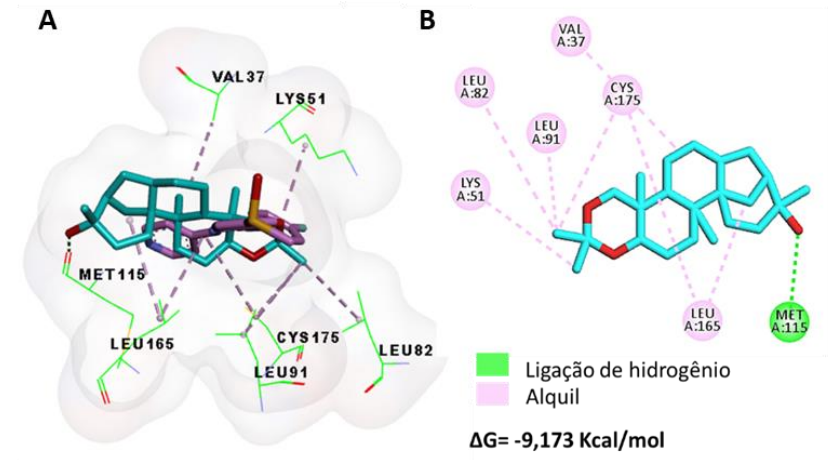


Apêndice 23 – (A) Comparação dos modos de ligação do ligante nativo (roxo) e derivados 12, 13 e 14 (azul) ao sítio de ligação de MAPK (PDB: 3UIB). (B) diagrama 2D das interações com resíduos de aminoácidos.

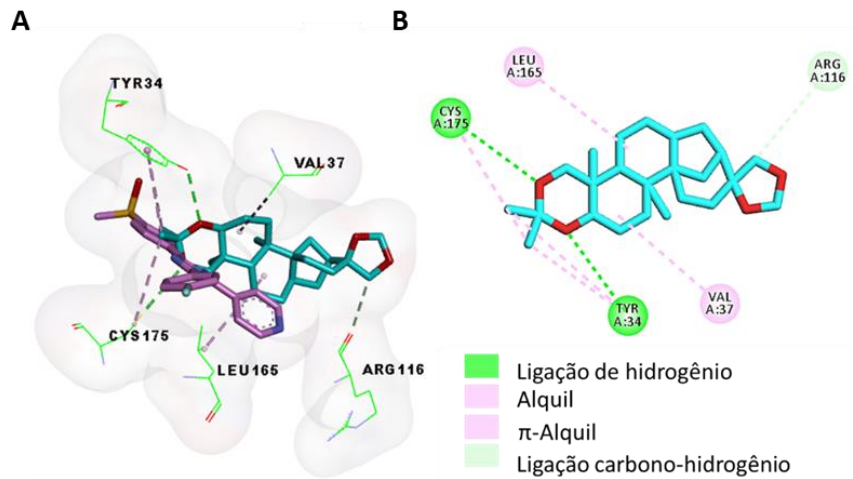
#### Derivado 12+MAPK



#### Derivado 14+MAPK



#### Derivado 13+MAPK



Fonte: Autora (2022).

Apêndice 24 – Predição *in silico* e identificação de grupos toxicofóricos de afidicolina e afidicolanos.

Molécula	Endpoint de toxicidade (humano <sup>[a]</sup> , camundongo <sup>[b]</sup> e rato <sup>[c]</sup> )	Toxicóforo	Probabilidade
1	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup>	Derivados de ácido carboxílico $\alpha$ -dis-substituídos ou precursores	Plausível
2	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup>	Derivados de ácido carboxílico $\alpha$ -dis-substituídos ou precursores	Plausível
3	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup>	Derivados de ácido carboxílico $\alpha$ -dis-substituídos ou precursores	Plausível
4	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup>	Derivados de ácido carboxílico $\alpha$ -dis-substituídos ou precursores	Plausível
5	Carcinogenicidade, toxicidade para o desenvolvimento, proliferação de peroxissomos, sensibilização da pele <sup>[a,b,c]</sup>	Epóxido	Plausível
6	Sem alertas		-
7	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup>	Derivados de ácido carboxílico $\alpha$ -dis-substituídos ou precursores	Plausível
8	Sem alertas		-
9	Carcinogenicidade, toxicidade para o desenvolvimento, irritação dos olhos, proliferação de peroxissomos <sup>[a,b,c]</sup>	Epóxido	Plausível
10	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup> , mutagenicidade <i>in vitro</i> <sup>[a,b,c]</sup>	Oxima	Plausível
11	Carcinogenicidade, proliferação de peroxissomos <sup>[b,c]</sup>	Derivados de ácido carboxílico $\alpha$ -dis-substituídos ou precursores	Plausível
12	Dano cromossômico <i>in vitro</i> , mutagenicidade <i>in vitro</i> , genotoxicidade não específica <i>in vitro</i> , sensibilização da pele <sup>[a,b,c]</sup>	Aldeído alquílico ou precursor	Plausível
13	Dano cromossômico <i>in vitro</i> , mutagenicidade <i>in vitro</i> , genotoxicidade não específica <i>in vitro</i> , sensibilização da pele <sup>[a,b,c]</sup>	Aldeído alquílico ou precursor	Plausível
14	Sem alertas		-
Milt*	Hepatotoxicidade <sup>[a,b,c]</sup>		Plausível

Fonte: Autora (2022).

Apêndice 25 – Propriedades físico-químicas dos *hits* resultantes da triagem do modelo farmacofórico dos afidicolanos ao sítio ativo de NMT-03 (PDB: 5A28).

Molécula	PM (Da)	Log P	HBA	HBD	TPSA (Å)	NRB
MP-002-911-081	364,52	2,57	4	3	77,76	1
MP-002-911-105	360,49	2,92	4	1	71,44	1
MP-002-911-112	364,52	2,57	4	3	77,76	1
MP-002-527-121	348,48	2,44	4	2	66,76	1

Fonte: Autora (2022).

Apêndice 26 – Propriedades físico-químicas dos *hits* resultantes da triagem do modelo farmacofórico dos afidicolanos ao sítio ativo de MetRS (PDB: 6SWX).

Molécula	PM (Da)	Log P	HBA	HBD	TPSA (Å)	NRB
MP-044-725-922	256,38	2,10	3	3	60,69	2
MP-035-706-274	256,38	2,10	3	3	60,69	2
MP-047-145-221	256,38	2,10	3	3	60,69	2
MP-002-911-112	364,52	2,57	4	3	77,76	1
MP-002-911-081	364,52	2,57	4	3	77,76	1
MP-003-959-279	332,48	3,27	3	1	54,37	1
MP-042-646-622	332,48	3,27	3	1	54,37	1
MP-002-517-277	332,48	3,27	3	1	54,37	1
MP-021-804-706	268,35	1,77	4	3	77,76	2
MP-002-507-460	348,48	2,44	4	2	74,6	1
MP-002-528-375	348,481	2,44	4	2	74,6	1
MP-002-911-105	360,492	2,92	4	1	71,44	1
MP-047-585-353	340,502	3,16	4	4	80,92	4
MP-030-042-290	338,486	2,10	4	2	58,92	1
MP-047-772-550	270,367	2,40	4	3	77,76	5
MP-002-527-121	348,481	2,44	4	2	66,76	1
MP-035-705-940	338,486	2,16	4	4	80,92	2

Fonte: Autora (2022).