

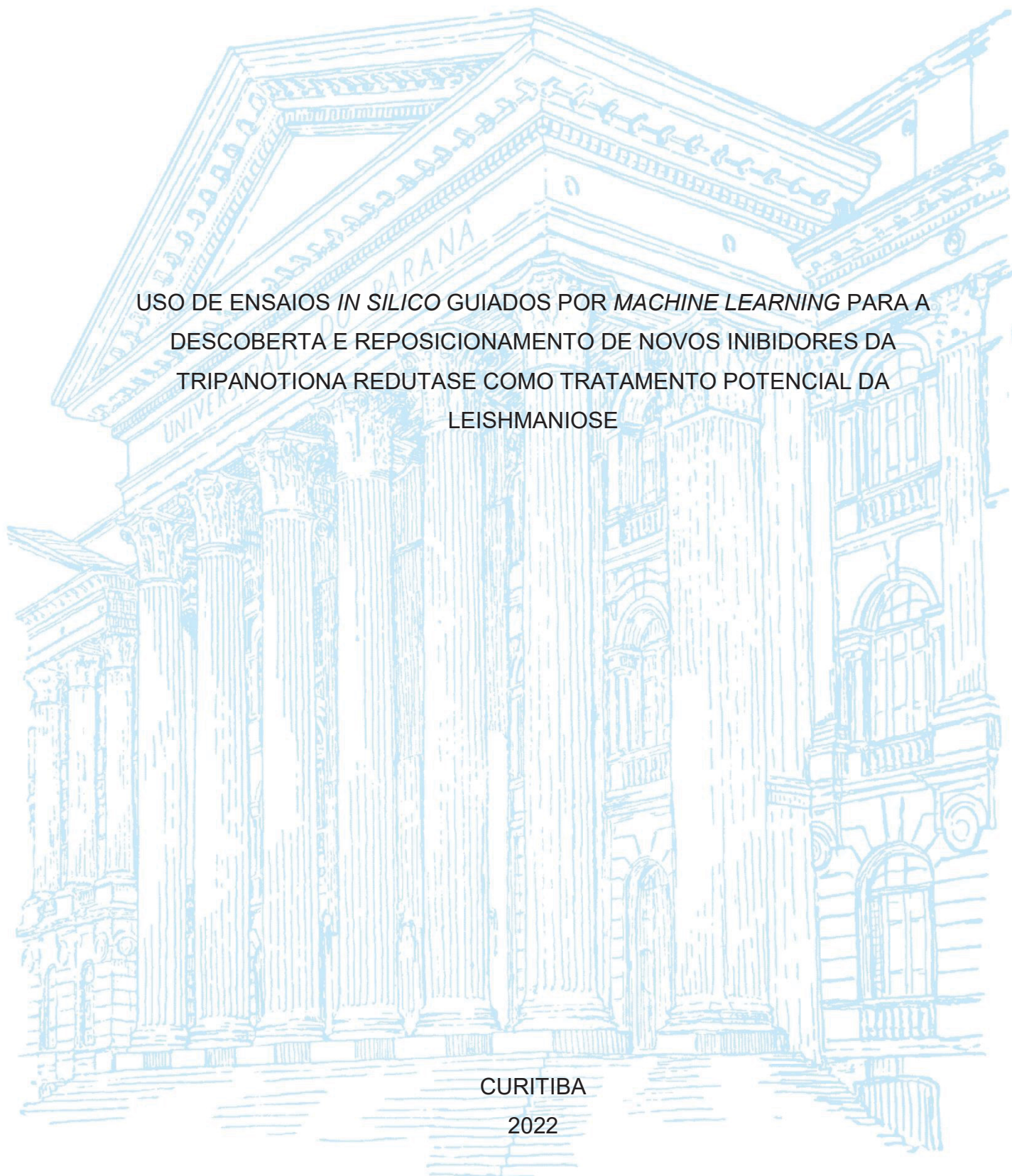
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAÍS SALVADOR DO AMARAL

USO DE ENSAIOS *IN SILICO* GUIADOS POR *MACHINE LEARNING* PARA A  
DESCOBERTA E REPOSICIONAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA  
TRIPANOTIONA REDUTASE COMO TRATAMENTO POTENCIAL DA  
LEISHMANIOSE

CURITIBA

2022



LAÍS SALVADOR DO AMARAL

USO DE ENSAIOS *IN SILICO* GUIADOS POR *MACHINE LEARNING* PARA A  
DESCOBERTA E REPOSICIONAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA  
TRIPANOTIONA REDUTASE COMO TRATAMENTO POTENCIAL DA  
LEISHMANIOSE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2022

Amaral, Laís Salvador do

Uso de ensaios *in silico* guiados por *machine learning* para a descoberta e reposicionamento de novos inibidores da tripanotona redutase como tratamento potencial da *leishmaniose* [recurso eletrônico] / Laís Salvador do Amaral – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

1. Preparações farmacêuticas. 2. *Leishmaniose*. 3. Terapêutica. 4. *Machine learning*. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LAÍS SALVADOR DO AMARAL** intitulada: **USO DE ENSAIOS IN SILICO GUIADOS POR MACHINE LEARNING PARA A DESCOBERTA E REPOSICIONAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA TRIPANOTIONA REDUTASE COMO TRATAMENTO POTENCIAL DA LEISHMANIOSE**, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO PONTAROLO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Junho de 2022.

ROBERTO PONTAROLO

Presidente da Banca Examinadora

MARIANA MILLAN FACHI

Avaliador Externo (HOSPITAL PEQUENO PRINCIPE)

JAQUELINE CARNEIRO

Avaliador Externo ( UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)



## AGRADECIMENTOS

No ponto 733 do livro Sulco, São Josemaria Escrivá diz: “Tivestes a grande sorte de encontrar verdadeiros mestres, amigos autênticos, que te ensinaram sem reservas tudo quanto quiseste saber; não necessitaste de artimanhas para lhes ‘roubar’ a sua ciência, porque te indicaram o caminho mais fácil, ainda que a eles lhes tivesse custado muito trabalho e sofrimento descobri-lo”. Agradeço imensamente por haverem me indicado o caminho:

aos meus pais e meu irmão — Marcos, Bernardete e Daniel — que formaram minha consciência, me ensinaram a tomar decisões e me apoiaram ao longo de toda esta trajetória;

ao meu esposo — Gustavo — que há 8 anos torna meu caminho mais amável e fácil;

à minha cunhada e amiga — Fernanda Kouketsu — que pelo seu exemplo de pós graduanda, esposa e mãe, me arrastou até aqui;

aos meus amigos — Dara, Diogo, Sabrina, Emily e Evellyn — companheiros de caminhada desde a graduação, que fizeram cada dia mais feliz;

ao meu amigo — Msc. Alexandre Cobre — que nunca mediu esforços para me ensinar sua ciência, que tenho certeza lhe custou muito trabalho descobrir. Obrigada pela sua generosidade!

ao meu orientador — Professor Dr. Roberto Pontarolo — que me entusiasmou desde o primeiro ano da graduação e abriu as portas do mestrado para mim;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, que apoiou a realização deste trabalho;

à nosso Senhor — *te Deum laudamus: te Dóminum confitémur* — que me chamou desde antes do meu nascimento e sonhou com o meu caminho.

**Estuda. Estuda com empenho. Se tens de ser sal e luz, necessitas de ciência, de idoneidade. Ou julgas que, por seres preguiçoso e comodista, hás de receber ciência infusa?**

São Josemaria Escrivá, Caminho, 340.

## RESUMO

A leishmaniose é, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a única doença tropical negligenciada ainda em expansão ao redor do mundo. Apesar disso, a maioria dos medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento dessa doença está associada com problemas de toxicidade, custo, recidivas ou de adesão à terapia, e, portanto, o desenvolvimento de novas moléculas é mandatório. Sabe-se que os métodos convencionais de descoberta de novos fármacos são lentos e onerosos, enquanto que métodos de simulação computacional, chamados de métodos *in silico*, permitem prever rapidamente e com custo menor quais compostos podem ser promissores dentre milhares testados simultaneamente. Assim, com o objetivo de encontrar novas entidades químicas para o tratamento da leishmaniose, foram utilizados nesse estudo métodos *in silico* guiados por *machine learning* tendo como alvo a enzima tripanotiona redutase (TR), presente no parasito *Leishmania* spp. Um total de 8.846 produtos naturais (PNs) disponíveis comercialmente e testados *in vivo* foram obtidos na base de dados ZINC15. Após condução da triagem virtual e *docking* molecular, 61 desses demonstraram ter alta afinidade com a enzima TR (energia de afinidade  $\leq -9$  kcal/mol). Para validar esse resultado, foram utilizados os métodos de *machine learning* de ANN, XGBoost, LREG, SVM, KNN, SIMCA, PCA e PLS-DA, sendo que os dois últimos tiveram sensibilidade, especificidade e acurácia de 100%, 98% e 99%, respectivamente. Em seguida, foram conduzidas análises de *drug-likeness*, farmacocinética e toxicidade. Dos 61 PNs de alta afinidade com o alvo molecular, 31 tiveram bom desempenho na análise de *drug-likeness* e finalmente três (PN43, PN53 e PN48) se mostraram os mais promissores nas análises de farmacocinética e toxicidade. Além dos PNs, foram obtidas 1.576 moléculas já aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) na mesma base de dados. Destas, 30 tiveram alta afinidade de ligação com a enzima TR, sendo que os modelos de PCA e PLS-DA reproduziram esses resultados com 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia. Dentre os 30 fármacos de alta afinidade com a TR encontrados, a ergotamina, dihidroergotamina e doxazosina são os que aparentam ter mais vantagens, considerando a necessidade de fármacos de baixo custo e mais seguros que os disponíveis atualmente para o tratamento da leishmaniose. Em suma, dentre os 10.422 compostos testados nesta pesquisa, foram encontrados seis candidatos a novas entidades químicas: PN43, PN53, PN59, RP1 (ergotamina), RP2 (dihidroergotamina) e RP21 (doxazosina), utilizando-se de métodos *in silico* guiados por *machine learning*. Devido à complexidade e dinâmica dos sistemas biológicos, fazem-se necessários posteriormente estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a possibilidade de uso terapêutico dessas moléculas no tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: simulação computacional; leishmaniose; machine learning; terapêutica.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is, according to the World Health Organization (WHO), the only neglected tropical disease still expanding around the world. Despite this, most of the drugs currently available for the treatment of this disease are associated with problems of toxicity, cost, relapses or adherence to therapy, and therefore, the development of new molecules is mandatory. It is known that conventional methods for discovering new drugs are slow and expensive, while computer simulation methods, called *in silico* methods, allows to quickly and at a lower cost predict which compounds may be promising among thousands tested simultaneously. Thus, in order to find new chemical entities for the treatment of leishmaniasis, *in silico* methods guided by machine learning were used in this study targeting the enzyme trypanothione reductase (TR), present in the parasite *Leishmania* spp. A total of 8,846 commercially available natural products (NPs) tested *in vivo* were obtained from the ZINC15 database. After conducting virtual screening and molecular docking, 61 of these were shown to have high affinity for the TR enzyme (affinity energy  $\leq -9$  kcal/mol). To validate this result, the machine learning methods of ANN, XGBoost, LREG, SVM, KNN, SIMCA, PCA and PLS-DA were used, the last two having sensitivity, specificity and accuracy of 100%, 98% and 99 %, respectively. Then, drug-likeness, pharmacokinetic and toxicity analyzes were conducted. Of the 61 PNs with high affinity with the molecular target, 31 performed well in the drug-likeness analysis and finally three (PN43, PN53 and PN48) were the most promising in the pharmacokinetic and toxicity analysis. In addition to the NPs, 1,576 molecules already approved by the Food and Drug Administration (FDA) were obtained from the same database. Of these, 30 had high binding affinity with the TR enzyme, and the PCA and PLS-DA models reproduced these results with 100% sensitivity, specificity and accuracy. Among the 30 drugs with high affinity for TR found, ergotamine, dihydroergotamine and doxazosin are the ones that seem to have the most advantages, considering the need for low-cost and safer drugs than those currently available for the treatment of leishmaniasis. In short, among the 10,422 compounds tested in this research, six candidates for new chemical entities were found: PN43, PN53, PN59, RP1 (ergotamine), RP2 (dihydroergotamine) and RP21 (doxazosin), using *in silico* methods guided by machine learning. Due to the complexity and dynamics of biological systems, further studies *in vitro* and *in vivo* are necessary to evaluate the possibility of therapeutic use of these molecules in the treatment of leishmaniasis.

Key-words: computer simulation; leishmaniasis; machine learning; therapeutics.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO <i>Leishmania</i> spp. ....	25
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTIBOGLUCONATO DE SÓDIO .....	29
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA .....	30
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ANFOTERICINA B.....	31
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA PENTAMIDINA .....	33
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MILTEFOSINA.....	34
FIGURA 7 – MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMONIAIS PENTAVALENTES .....	45
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO ESTUDO.....	50
FIGURA 9 – ESTRUTURA 3D DO ALVO MOLECULAR (PDB ID 2JK6).....	51
FIGURA 10 – ESTRUTURA DA ENZIMA TR.....	63
FIGURA 11 – PCS DE ACORDO COM O CRITÉRIO DE <i>EIGENVALUE</i> (PNs).....	67
FIGURA 12 – MODELO PCA (PNs).....	68
FIGURA 13 – GRÁFICO DE <i>LOADING</i> (PNs) .....	69
FIGURA 14 – GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> VERSUS RESÍDUOS DE <i>STUDENT</i> (PNs).....	69
FIGURA 15 – GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (PNs).....	71
FIGURA 16 – MODELO PLS-DA COM 6 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS PNs DE ALTA AFINIDADE) .....	72
FIGURA 17 – MODELO PLS-DA COM 6 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS PNs DE BAIXA AFINIDADE).....	73
FIGURA 18 – <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DO PN43.....	79
FIGURA 19 – <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DO PN53.....	80
FIGURA 20 – <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DO PN59.....	81
FIGURA 21 – PCs DE ACORDO COM O CRITÉRIO DE <i>EIGENVALUE</i> (RPs) .....	84
FIGURA 22 – Modelo PCA (RPs).....	85
FIGURA 23 – GRÁFICO DE <i>LOADING</i> (RPs) .....	86
FIGURA 24 – GRÁFICO DE <i>LEVERAGE</i> VERSUS RESÍDUOS DE <i>STUDENT</i> (RPs) .....	86
FIGURA 25 – GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (RPs).....	88

FIGURA 26 – MODELO PLS-DA COM 4 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS RPs DE ALTA AFINIDADE) .....	89
FIGURA 27 – MODELO PLS-DA COM 4 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS RPs DE BAIXA AFINIDADE).....	89
FIGURA 28 – <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DA ERGOTAMINA.....	91
FIGURA 29 – <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DA DIHIDROERGOTAMINA.....	92
FIGURA 30 – <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DA DOXAZOSINA.....	93

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS DO ALGORITMO GENÉTICO USADOS NA ANÁLISE DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR NO <i>AUTODOCK TOOLS</i> E <i>AUTODOCK VINA</i> .....	55
TABELA 2 – DESCRITORES USADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS LIGANTES DE MENOR E DE MAIOR AFINIDADES COM A TR .....	56
TABELA 3 – RESULTADOS DE TRIAGEM VIRTUAL (OBTIDO POR PYRX) E <i>DOCKING</i> MOLECULAR (OBTIDO POR <i>AUTODOCK TOOLS</i> E <i>AUTODOCK VINA</i> ) DA LIGAÇÃO ENTRE OS 61 PRINCIPAIS PNs E A ENZIMA TR .....	64
TABELA 4 – DESCRITORES UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE ML (PNs).....	66
TABELA 5 – VARIÂNCIA ACUMULADA (PNS) .....	67
TABELA 6 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODELOS DE ML (NPs).....	70
TABELA 7 – ANÁLISE DE <i>DRUG-LIKENESS</i> DOS 61 PRINCIPAIS PNs QUE TIVERAM MELHOR AFINIDADE DE LIGAÇÃO COM A ENZIMA TR .....	73
TABELA 8 – ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DOS 12 PNs LÍDERES .....	76
TABELA 9 – PREDIÇÃO DE TOXICIDADE DOS 12 PNs LÍDERES .....	77
TABELA 10 – TRIAGEM VIRTUAL (OBTIDO POR PYRX) E <i>DOCKING</i> MOLECULAR (OBTIDO POR <i>AUTODOCK TOOLS</i> E <i>AUTODOCK VINA</i> ) DA LIGAÇÃO ENTRE OS 30 PRINCIPAIS RPs E A ENZIMA TR .....	82
TABELA 11 – VALORES MEDIANOS DOS DESCRITOS UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE ML (RPs).....	83
TABELA 12 – VARIÂNCIA ACUMULADA (RPs).....	85
TABELA 13 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODELOS de ML (RPs).....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2D	- Bidimensional
3D	- Tridimensional
ACU	- Acurácia
ADMET	- Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AHR	- Receptor de hidrocarboneto arílico
AIH	- Absorção intestinal humana
Ala	- Alanina
ANN	- Redes neurais artificiais
AR	- Receptor de andrógeno
Arg	- Arginina
AR-LBD	- Domínio de ligação ao ligante de receptor de andrógeno
ASC	- Área sobre a curva
ATAD5	- Proteína 5 contendo domínio da família das ATPase AAA
BHE	- Barreira hematoencefálica
Caco-2	- Células de adenocarcinoma colorretal humano
CADD	- <i>Computer-aided drug design</i>
CL	- <i>Clearence</i> renal
CYP	- Citocromo P450
Cys	- Cisteína
DPR	- Desvio padrão relativo
DTN	- Doença tropical negligenciada
ER	- Receptor do estrogênio $\alpha$
ER-LBD	- Domínio de ligação ao ligante do receptor de estrogênio
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
ESP	- Especificidade
FAD	- Dinucleotídeo de flavina e adenina
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FL	- Fração livre no plasma
FLOG	- <i>Flexible Ligands Orientated on Grid</i>
FN	- Falso negativo
FP	- Falso positivo
Glu	- Ácido glutâmico

Gly	- Glicina
GR	- Glutathione redutase
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HSE	- Elemento de resposta do fator de choque térmico
Hys	- Histidina
IA	- Inteligência artificial
Ile	- Isoleucina
IQ	- Interquartil
KNN	- K-vizinhos mais próximos
LC	- Leishmaniose cutânea
LCD	- Leishmaniose cutânea difusa
LCL	- Leishmaniose cutânea localizada
LCPC	- Leishmaniose cutânea pós-calazar
LD50	- Dose letal mediana
LDA	- Análise discriminante linear
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
Leu	- Leucina
LMC	- Leishmaniose mucocutânea
LPP	- Ligação a proteínas plasmáticas
LREG	- Regressão logística
LV	- Leishmaniose visceral
MDCK	- Células renais caninas Madin-Darby
Met	- Metionina
ML	- <i>Machine learning</i>
MMP	- Potencial de membrana mitocondrial
NADPH	- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAP	- Número de átomos pesados
NAPA	- Número de átomos pesados em anel aromático
NHA	- Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio
NHD	- Número de hidrogênios doadores de ligação de hidrogênio
NLR	- Número de ligações rotacionáveis
Nrf2/ARE	- Elemento de resposta antioxidante eritroide 2 relacionado ao fator 2
NSCLC	- Câncer de pulmão avançado de células não pequenas



OMS	- Organização Mundial da Saúde
PC	- Componentes principais
PCA	- Análise de componentes principais
PDB	- <i>Protein Data Bank</i>
Pgp	- Glicoproteína P
Phe	- Fenilalanina
PLS-DA	- Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PM	- Peso molecular
PN	- Produtos naturais
PPAR- $\gamma$	- Receptor $\gamma$ ativado por proliferadores de peroxissoma
QMF	- Química medicinal farmacêutica
RM	- Refratividade molar
RMSD	- Desvio médio quadrático
RMSEC	- Raiz quadrada de erro médio de calibração
RMSECV	- Raiz quadrada de erro médio de validação cruzada
RMSEP	- Raiz quadrada de erro médio de predição
RMSEP	- Raiz quadrada de erro médio de predição
ROC	- <i>Receiver operating characteristic</i>
RP	- Fármacos para reposicionamento farmacoterapêutico
SEN	- Sensibilidade
SIMCA	- Modelagem independente e flexível por analogia de classe
SMILES	- <i>Simplified molecular input line entry specification</i>
SVM	- Máquina de vetores de suporte
Thr	- Treonina
TPSA	- Área de superfície polar topológica
TR	- Tripanotiona redutase
TS	- Tripanotiona sintetase
Tyr	- Tirosina
Val	- Valina
VD	- Volume de distribuição
VIP	- <i>Variable importance in projection</i>
VN	- Verdadeiro negativo
VP	- Verdadeiro positivo
XGBoost	- <i>eXtreme gradient boosting</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	- Angstroms
$\alpha$	- Alfa
$\beta$	- Beta
$\pi$	- Pi
C	- Carbono
Sb(III)	- Antimônio trivalente
Sb(V)	- Antimônio pentavalente
$T_{1/2}$	- Tempo de meia-vida

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 OBJETIVOS .....	21
1.1.1 Objetivo geral .....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 LEISHMANIOSE .....	22
2.1.1 Epidemiologia.....	22
2.1.2 Biologia.....	23
2.1.3 Fisiopatologia .....	26
2.1.4 Tratamento .....	28
2.1.4.1 Antimoniais pentavalentes.....	28
2.1.4.2 Anfotericina B .....	31
2.1.4.3 Pentamidina.....	32
2.1.4.4 Miltefosina .....	33
2.1.4.5 Terapia combinada.....	34
2.2 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS AUXILIADO POR COMPUTADOR.....	35
2.2.1 Modelos matemáticos.....	36
2.2.1.1 Mecânica molecular.....	36
2.2.1.2 Mecânica quântica.....	36
2.2.2 Métodos de análise conformacional .....	37
2.2.2.1 Minimização de energia.....	37
2.2.2.2 Dinâmica molecular .....	38
2.2.2.3 Rotação de ligações .....	38
2.2.2.4 Método de Monte Carlo e Metropolis.....	38
2.2.2.5 Algoritmos genéticos e evolucionários.....	39
2.2.3 Comparação de estruturas .....	40
2.2.4 <i>Docking</i> molecular .....	40
2.2.4.1 <i>Docking</i> de ligantes flexíveis .....	42
2.2.5 Alvo molecular: a enzima tripanotona redutase .....	42
2.2.5.1 Domínios de ligação da enzima.....	43
2.2.5.2 Mecanismo molecular de redução da tripanotona .....	43
2.2.5.3 Mecanismo molecular de ação dos fármacos antimoniais.....	44

2.2.6 Predição das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, toxicidade e <i>drug-likeness</i> .....	45
2.2.6.1 Propriedades físico-químicas .....	46
2.2.6.2 <i>Drug-likeness</i> .....	47
2.2.6.3 Propriedades ADMET .....	48
2.2.7 <i>Machine learning</i> .....	48
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
3.1 SELEÇÃO E PREPARO DO ALVO MOLECULAR .....	51
3.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS LIGANTES .....	52
3.2.1 Produtos naturais .....	52
3.2.2 Fármacos para reposicionamento .....	53
3.3 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NA ESTRUTURA DO LIGANTE.....	53
3.3.1 Produtos naturais .....	54
3.3.2 Fármacos para reposicionamento .....	54
3.4 VALIDAÇÃO DA TRIAGEM VIRTUAL .....	54
3.4.1 <i>Docking</i> molecular .....	54
3.5 <i>MACHINE LEARNING</i> .....	55
3.5.1 Pré-processamento dos dados para <i>machine learning</i> .....	56
3.5.2 Análise exploratória dos dados .....	57
3.5.3 Calibração e validação dos modelos de <i>machine learning</i> .....	57
3.5.4 Avaliação do desempenho preditivo dos modelos de <i>machine learning</i> .....	58
3.5.5 Identificação de variáveis importantes dos modelos de <i>machine learning</i> .....	58
3.6 <i>DRUG-LIKENESS</i> .....	59
3.7 PROPRIEDADES ADMET .....	60
3.7.1 Absorção .....	60
3.7.2 Distribuição.....	60
3.7.3 Metabolismo .....	60
3.7.4 Excreção .....	60
3.7.5 Toxicidade .....	61
3.8 ANÁLISE DA QUALIDADE DAS INTERAÇÕES .....	61
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 SELEÇÃO E PREPARO DO ALVO MOLECULAR .....	63
4.2 PRODUTOS NATURAIS.....	64
4.2.1 Triagem virtual e <i>docking</i> molecular .....	64

4.2.2 <i>Machine learning</i> .....	66
4.2.2.1 Análise exploratória .....	67
4.2.2.2 Detecção supervisionada de <i>outlier</i> .....	69
4.2.2.3 Modelos de <i>machine learning</i> .....	70
4.2.2.4 Modelo de análise discriminante por mínimos quadrados parciais.....	70
4.2.3 <i>Drug-likeness</i> .....	73
4.2.4 Propriedades ADMET.....	75
4.2.5 Toxicidade .....	77
4.2.6 Análise da qualidade das interações.....	78
4.3 FÁRMACOS PARA REPOSICIONAMENTO.....	82
4.3.1 Triagem virtual e <i>docking</i> molecular .....	82
4.3.2 <i>Machine learning</i> .....	83
4.3.2.1 Análise exploratória .....	84
4.3.2.2 Detecção supervisionada de <i>outlier</i> .....	86
4.3.2.3 Modelos de <i>machine learning</i> .....	87
4.3.2.4 Modelo de análise discriminante por mínimos quadrados parciais.....	88
4.3.3 Análise da qualidade das interações.....	90
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>100</b>
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	100
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose, doença causada pela infecção com o patógeno *Leishmania* spp., é uma doença tropical negligenciada (DTN). As DTNs são um grupo de 20 doenças que impactam as populações mais pobres, e que tem consequências sociais e econômicas devastadoras (OMS, 2022a). De fato, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021) publicou um plano de metas de prevenção, controle, eliminação e erradicação destas doenças, para ser conduzido de 2021 a 2030.

A leishmaniose é uma doença transmitida pela picada de mosquitos flebotomíneos infectados. A forma promastigota do parasito é inoculada no hospedeiro e fagocitada; passa à forma amastigota intracelularmente e multiplica-se, resultando na leishmaniose cutânea ou visceral. A forma cutânea da doença é a mais comum e é caracterizada por feridas na pele, enquanto a visceral afeta órgãos internos e representa grave risco de vida (CDC, 2020c).

Encontrada nas regiões tropicais, subtropicais e no sul da Europa, a leishmaniose é endêmica em 98 diferentes países, sendo o Brasil uma das cinco regiões mais afetadas do mundo (CABEZAS, 2015; CDC, 2020a). No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pela espécie *L. chagasi* e sua importância reside não só na alta incidência e distribuição da doença, mas também na sua associação a quadros de má nutrição e infecções concomitantes, levando às formas mais letais da enfermidade (GONTIJO, 2004).

Os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados no tratamento da leishmaniose desde meados de 1930, sendo o antimoniato de *N*-metil glucamina (Glucantime, Sanofi-Aventis) e o estibogluconato de sódio (Pentostam, GlaxoSmithKline) os medicamentos de primeira escolha no tratamento da doença (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). Entretanto, problemas de efetividade e segurança têm sido associados ao uso destes fármacos, como alta toxicidade, baixa tolerabilidade, altas taxas de recorrência, desenvolvimento de resistência e efeitos colaterais como acidose tubular renal, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015; HERWALDT; BERMAN, 1992; MATOUSSI et al., 2007a; ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004).

A anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina representam alternativas ao tratamento (GONTIJO; MELO, 2004). Entretanto, estes também apresentam efeitos colaterais: a anfotericina B é nefrotóxica (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015), a

pentamidina têm sido associada a problemas de toxicidade devido a hiperglicemia e hipoglicemia (THAKUR; KUMAR; PANDEY, 1991) e a miltefosina com teratogenicidade e efeitos adversos gastrointestinais (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2012; SUNDAR; CHATTERJEE, 2006). Em suma, quase todos os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose compartilham diversas desvantagens e o desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes e seguros para o tratamento da doença continua sendo mandatório (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo lento e oneroso. Além disso, estima-se que de 10000 compostos testados, apenas 1 ou 2 chegam ao mercado (SHEKHAR, 2008). Por outro lado, com o avanço da tecnologia computacional, modelos *in silico* têm sido capazes de auxiliar em praticamente todas as etapas da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, por permitir prever as interações entre ligantes e alvos moleculares. Dessa forma, milhares de moléculas podem ser testadas simultaneamente, em um curto espaço de tempo e com um custo menor (SHEKHAR, 2008).

Um estudo realizado por uma indústria farmacêutica, usando ferramentas computacionais para encontrar um ligante adequado para a enzima tirosina fosfatase-1B, alvo molecular importante no Diabetes mellitus tipo II, das 245 mil moléculas de uma biblioteca chegou a 365 compostos líderes. Testes *in vitro* posteriores mostraram que 127 destas moléculas inibiram a enzima efetivamente, o que representa uma taxa de 35%, enquanto que compostos líderes obtidos em estudos tradicionais tiveram uma taxa de 0,02% de real inibição da enzima (DOMAN et al., 2002). De fato, o FDA tem encorajado o uso destas tecnologias para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (SHEKHAR, 2008).

Considerando a necessidade de novos fármacos para a leishmaniose e os avanços das ferramentas computacionais, o presente estudo teve como objetivo encontrar moléculas candidatas a novas entidades químicas inibidoras da enzima TR, alvo molecular promissor para moléculas antileishmania. Para isto, foram realizados ensaios *in silico* guiados por *machine learning* em duas bases de dados, sendo uma de produtos naturais e a outra de compostos aprovados pelo FDA, visando a descoberta e reposicionamento de fármacos para o tratamento da leishmaniose.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Encontrar, através de pesquisa em bases de dados e utilizando-se de ensaios *in silico* guiados por *machine learning*, novas entidade químicas, potenciais inibidoras da enzima TR, para o tratamento da leishmaniose.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem virtual de produtos naturais e fármacos aprovados pelo FDA, disponíveis em bases de dados, para a descoberta e reposicionamento de fármacos;
- Prever, através de *docking* molecular, as possíveis interações e energias de ligação das candidatas a novas entidades químicas e o alvo molecular;
- Avaliar *in silico* as propriedades físico-químicas, *drug-likeness* e propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) dos compostos com afinidade pelo alvo molecular;
- Desenvolver modelo de *machine learning* para validação dos ensaios *in silico* utilizados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE

#### 2.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença mundialmente disseminada. Em um reporte feito pela OMS (2020), um total de 97 países ou territórios foram considerados endêmicos para leishmaniose, e destes 4 foram adicionados em 2017 e 2018, o que indica que a doença continua a se espalhar pelo mundo. A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, única ainda em crescimento (BENCHIMOL et al., 2019).

Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e ocorrem cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea todos os anos (OMS, 2022b).

Apesar da doença ser disseminada em todos os continentes, com exceção da Oceania, mais de 95% dos novos casos de leishmaniose visceral ocorrem em apenas 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. De forma semelhante, mais de 85% dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em 10 países: Brasil, Afeganistão, Argélia, Bolívia, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Arábia Saudita e Tunísia. Por fim, mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Bolívia, Etiópia e Peru (OMS, 2022b). Além disso, em outro levantamento realizado pela OMS, observou-se que, de 25 países selecionados para o estudo da incidência da doença, 13 tiveram uma alta taxa de incidência de leishmaniose visceral, 11 de leishmaniose cutânea, e apenas um país teve uma alta incidência das duas formas da doença: o Brasil (OMS, 2016). No último reporte disponibilizado pela OMS (2015) acerca da distribuição da doença no Brasil, o número absoluto de novos casos de leishmaniose visceral foi de 3.289, de leishmaniose cutânea 18.324 e mucocutânea 1.071.

Alguns fatores de risco são determinantes no desenvolvimento da doença, como condições socioeconômicas precárias associadas à migração de indivíduos não imunes para áreas endêmicas (OMS, 2022b). Assim, a incidência anual de leishmaniose cutânea na Síria era de aproximadamente 23.000 casos antes da guerra civil, e passou a ser de 53.000 e 41.000 em 2012 e 2013, respectivamente (DU et al.,

2016). Observou-se também um aumento relacionado a conflitos na Líbia e no Yemen (DU et al., 2016). Além disso, surtos de leishmaniose têm ocorrido em campos de refugiados na Turquia, Líbano, Jordânia e Tunísia (AL-SALEM et al., 2016; DU et al., 2016; SAROUFIM et al., 2014).

Na América Latina, estima-se que ocorram cerca de 60.000 novos casos todos os anos. Tipicamente, a doença ocorre em ambientes onde o vetor se desenvolve. Assim, o ambiente propício para o desenvolvimento da leishmaniose é aquele em uma altitude de 0 a 1.500 metros acima do nível do mar, temperaturas superiores a 20°C e 1.500 a 3.000 milímetros de chuva por ano (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

No fim do século XX, devido a mudanças ambientais, migrações, crescimento urbano e outros fatores socioeconômicos, todas as formas de leishmaniose que pareciam sob controle reemergiram no Brasil. Atualmente, a leishmaniose apresenta elevada incidência e distribuição neste país e frequentemente está associada à má nutrição e comprometimento imune por infecções concomitantes, especialmente pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o que aumenta ainda mais sua letalidade (BENCHIMOL et al., 2019).

### 2.1.2 Biologia

A leishmaniose é causada pela infecção com os protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de insetos conhecidos como flebotomíneos (CDC, 2020b).

O agente causador da leishmaniose foi visto pela primeira vez em 1885 pelo pesquisador David Douglas Cunningham (1843-1914) (CUNNINGHAM, 1885). Entretanto, foi reconhecido como um protozoário apenas em 1898, pelo russo Piotr Fokich Borovsky (1863-1932) (HOARE, 1938 *apud* STEVERDING, 2017). Em novembro de 1900, o patologista escocês Willian Boog Leishman (1865-1926), enquanto servia ao exército britânico na Índia, observou corpos ovoides em uma amostra retirada do baço de um soldado que havia morrido com esplenomegalia. Em 1903, Leishman publicou um artigo sugerindo que tais corpos eram tripanosomas (LEISHMAN, 1903). Poucos meses depois, Charles Donovan (1863-1951) reportou algo parecido em amostras de pacientes indianos que tiveram febre persistente e esplenomegalia (DONOVAN, 1903). Então, o médico britânico Ronald Ross (1857-1932) publicou, no mesmo ano, um comentário acerca da descoberta de Leishman e

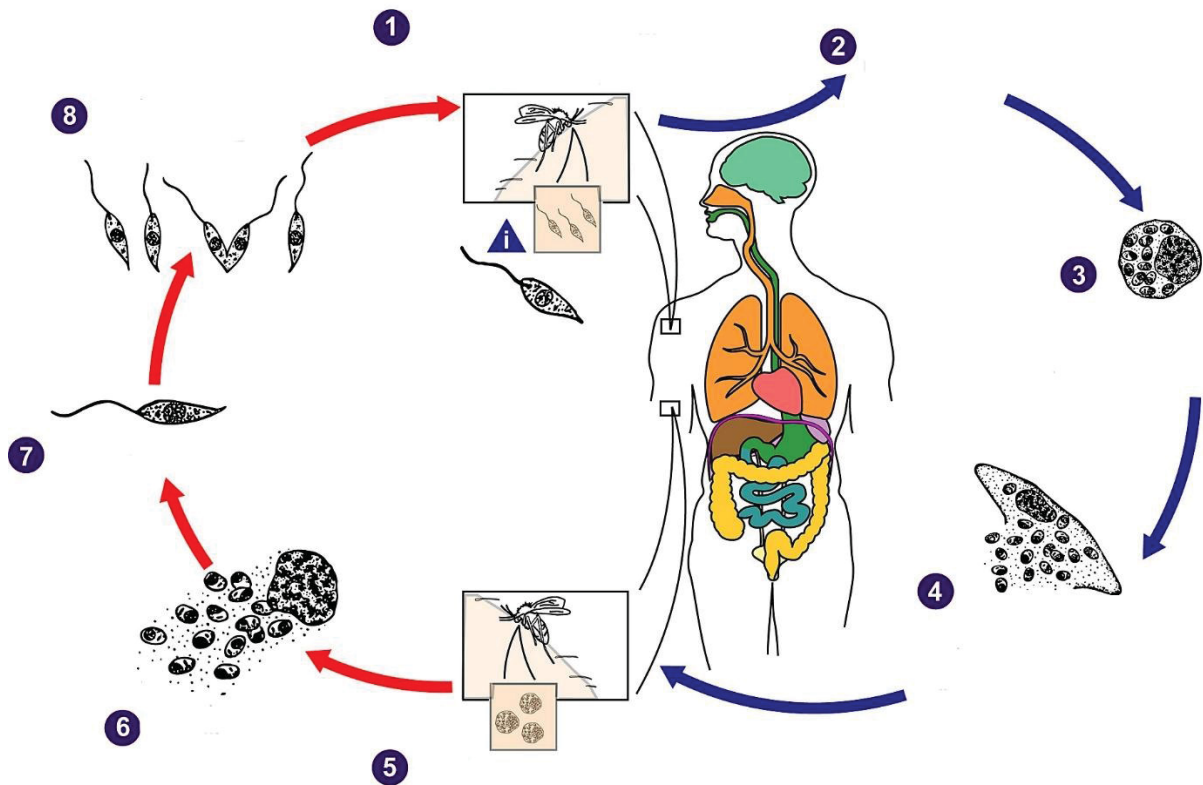


de Donovan, concluindo que os corpos ovoides encontrados se tratavam do mesmo patógeno, e que este não era um tripanosoma mas um novo protozoário, propondo o nome de *Leishmania donovani* (ROSS, 1903a, b).

Já nas Américas, o primeiro a descrever o parasito causador da leishmaniose cutânea foi o pesquisador brasileiro Adolpho Carlos Lindenberg (1872-1950), em 1909 (CARINI; PARANHOS, 1909). Por sua vez, o *Leishmania chagasi*, responsável pela leishmaniose visceral, foi descrito pela primeira vez na América Latina em 1937 por Evandro Serafim Lobo Chagas (1905-1940) (CUNHA; CHAGAS, 1937), filho de Carlos Chagas. Entretanto, recentemente a biologia molecular demonstrou que o *Leishmania chagasi* é idêntico ao *Leishmania infantum*, que já havia sido descrito como agente causador da leishmaniose visceral na Europa (MAURICIO et al., 1999).

Atualmente, o parasito é categorizado em dois grupos: as espécies que causam a doença na Europa, África e Ásia (chamadas de espécies do “velho mundo”), e as que causam a doença na América (“novo mundo”) (IOWA STATE UNIVERSITY/COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE, 2009). Foram descritas 53 espécies, muitas de ciclo zoonótico (tendo como reservatórios diferentes espécies de animais selvagens e domésticos) e algumas de ciclo antroponótico (podem ser transmitidas entre seres humanos na presença do vetor) (ALVAR et al., 2012).

O parasito *Leishmania* spp. passa por duas principais formas no seu ciclo de vida: amastigota e promastigota. Quando o ser humano é picado pela fêmea do flebotomíneo, são injetadas promastigotas metacíclicas na pele. Uma vez fagocitadas pelos macrófagos ou outras células fagocíticas, o parasito passa ao estágio de amastigota, não flagelado, e multiplica-se por divisão binária infectando novas células. Quando os flebotomíneos picam um hospedeiro infectado, ingerem os macrófagos com amastigotas. Quando a fêmea pica o hospedeiro, produz uma pequena ferida que lisa os macrófagos, liberando as amastigotas. No intestino do inseto, o parasito passa ao estágio flagelado novamente (promastigota), migra para a probóscide e pode ser novamente transmitido a outro hospedeiro (CDC, 2020b; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; SCHMIDT; ROBERTS, 2009). O ciclo de vida descrito pode ser visualizado na FIGURA 1.

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO *Leishmania* spp.

FONTE: Adaptado de CDC (2017).

LEGENDA: O vetor injeta promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro (1), que são fagocitadas pelos macrófagos ou outras células mononucleares fagocíticas (2). Em seguida, as promastigotas se transformam em amastigotas (3), multiplicam-se e infectam outras células (4). Quando o vetor pica novamente o hospedeiro, ingere as células infectadas (5). Essas células rompem-se no intestino do inseto (6) e as amastigotas transformam-se em promastigotas (7) novamente. Por fim, se dividem e migram para a probóscide do inseto (8), onde podem ser transmitidas a um novo hospedeiro (1).

Os subgêneros *Leishmania* são classificados de acordo com o seu desenvolvimento no intestino hospedeiro invertebrado. Alguns parasitos se desenvolvem apenas no intestino grosso dos flebotomíneos, outros se desenvolvem no intestino grosso, mas posteriormente migram para o intestino médio e posterior. Outros, ainda, estão restritos apenas ao intestino médio e posterior. Assim, o subgênero *Leishmania* inclui as espécies que se desenvolvem no intestino médio e posterior, enquanto o subgênero *Viannia* se refere aos parasitos que se desenvolvem também no intestino grosso (LAINSON; SHAW, 1987).

No subgênero *Viannia*, estão inclusos o *L. braziliensis* — maior causador da leishmaniose cutânea e mucocutânea —, *L. guyanensis* (presente no norte do Rio Amazonas e países próximos), *L. lainsoni* (presente na Amazônia), *L. shawi* (Pará), *L.*

*naiffi* (Pará, Amazonas e Guiana Francesa), *L. peruviana*, *L. panamensis* e *L. colombiensis* (LAINSON; SHAW, 1987).

Já no subgênero *Leishmania*, encontram-se as espécies *L. amazonensis*, *L. chagasi* (responsável pela leishmaniose visceral e de distribuição ampla na América Latina), *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, *L. donovani* (responsável pela leishmaniose visceral no Velho Mundo), *L. tropica* e *L. aethiopica* (LAINSON; SHAW, 1987).

Os flebotomíneos são insetos da ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Podem pertencer a dois gêneros principais: *Phlebotomus*, no chamado Velho Mundo, e *Lutzomyia* nas Américas, e a variadas espécies patogênicas, sendo 90% delas pertencem ao gênero *Lutzomyia*. As fêmeas se alimentam do sangue de mamíferos e outros vertebrados, durante a noite, absorvendo nutrientes que auxiliam no desenvolvimento do parasito posteriormente (MAROLI et al., 2013; READY, 2013; RIDLEY, 1988).

Entre os hospedeiros vertebrados, ou reservatórios, estão descritas espécies de roedores, mangustos, cães, gatos, raposas, chacais, lobos, morcegos, primatas e tatus (DEREURE et al., 2000; ROHOUSOVA et al., 2015; ROQUE; JANSEN, 2014). A transmissão da leishmaniose destes animais aos seres humanos, mediada pelo vetor, ocorre quando há proximidade entre populações urbanas e áreas selvagens, podendo ainda ser facilitada pelos animais domésticos (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2001). Alterações produzidas no ecossistema pelo ser humano, como o desmatamento e ocupação de áreas florestais, aumentam a taxa de transmissão da leishmaniose por aumentarem a quantidade de vetores presentes e também de reservatórios (DAWIT; SHISHAY, 2014; PATZ et al., 2000; WALSH; MOLYNEUX; BIRLEY, 1993).

### 2.1.3 Fisiopatologia

A leishmaniose tem diferentes manifestações clínicas, resultado da relação entre a espécie do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro (PACE, 2014). Assim, a leishmaniose pode ser assintomática, visceral ou cutânea.

A leishmaniose visceral (LV), também chamada de calazar ou febre negra, ocorre principalmente em crianças de 1 a 4 anos, mas também pode ocorrer em adultos imunocomprometidos (DESJEUX, P.; ALVAR, 2013). As manifestações

clínicas podem levar de 10 dias a 1 ano para ocorrerem (OMS, 2010b). Os sintomas incluem febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza (ASHKAN; RAHIM, 2008; BRAGA; JUNIOR; RABELLO, 2013). O acúmulo de células fagocitárias leva a esplenomegalia, hepatomegalia e palidez (GRECH et al., 2000). No Brasil, foi descrita uma forma subclínica da doença, causada pelo *L. infantum* e caracterizada por febre baixa, diarreia, *déficit* de crescimento e esplenomegalia (BADARO et al., 1986). Se não tratada, a LV sintomática leva a doença de múltiplos órgãos, diátese hemorrágica secundária a plaquetas baixas, infecções secundárias e morte, em 2 a 3 anos (COLLIN et al., 2004).

Uma complicação da LV é a chamada leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC), causada pelo *L. donovani* na Ásia e no leste da África (DESJEUX et al., 2013). A doença ocorre normalmente após o tratamento da LV, e se manifesta na forma de erupções cutâneas que variam em severidade, devido a uma reação imunológica aos parasitos que remanescem na pele (ZIJLSTRA et al., 2000).

A leishmaniose cutânea (LC), por sua vez, ocorre normalmente em áreas do corpo expostas ao vetor como o rosto, pescoço e membros. As espécies que causam a LC no chamado Velho Mundo (*L. infantum*, *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*) tem por manifestação clínica o aparecimento de uma pápula indolor, que progride para um nódulo com uma crosta central, embaixo da qual se encontra uma úlcera seca endurecida (AARA et al., 2013; OMS, 2010b). Já no Novo Mundo, os padrões das lesões são diversos e raramente a doença se resolve sem tratamento. Assim, a LC pode se manifestar como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC) ou leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A LCL pode ser causada pelo *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* ou *L. infantum*. Se manifesta como nódulos ou úlceras, linfadenopatia ou linfadenite e pode se espalhar para outras áreas da pele ou mucosa (OMS, 2010b).

Já a LMC pode ser causada pelo *L. braziliensis* e *L. panamensis*, além de outras espécies no caso de indivíduos imunocomprometidos, e se caracteriza pela metástase das lesões para mucosas do trato respiratório superior e boca. As lesões na mucosa na LMC podem aparecer até anos após a cura das lesões cutâneas (OMS, 2010b). As lesões podem levar ao bloqueio das narinas, destruição do septo nasal ou colapso nasal (GUERRA et al., 2011), bem como a faringe, palato, lábio superior e laringe, resultando em destruição dos tecidos (AMATO, V. S. et al., 2009).

A LCD, por sua vez, é causada pelo *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, e é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões (>20). As lesões da LCD podem persistir mesmo com o tratamento adequado (OMS, 2010b).

#### 2.1.4 Tratamento

O tratamento da leishmaniose é complexo devido a existência de muitas espécies diferentes de *Leishmania* e diferentes manifestações clínicas da doença. Cerca de 25 compostos estão disponíveis para o tratamento da leishmaniose em humanos, mas todos associados com problemas de toxicidade, custo, recidivas e de adesão ao tratamento. Vale ressaltar que o tratamento em pacientes com HIV é ainda mais complexo e representa outro desafio (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

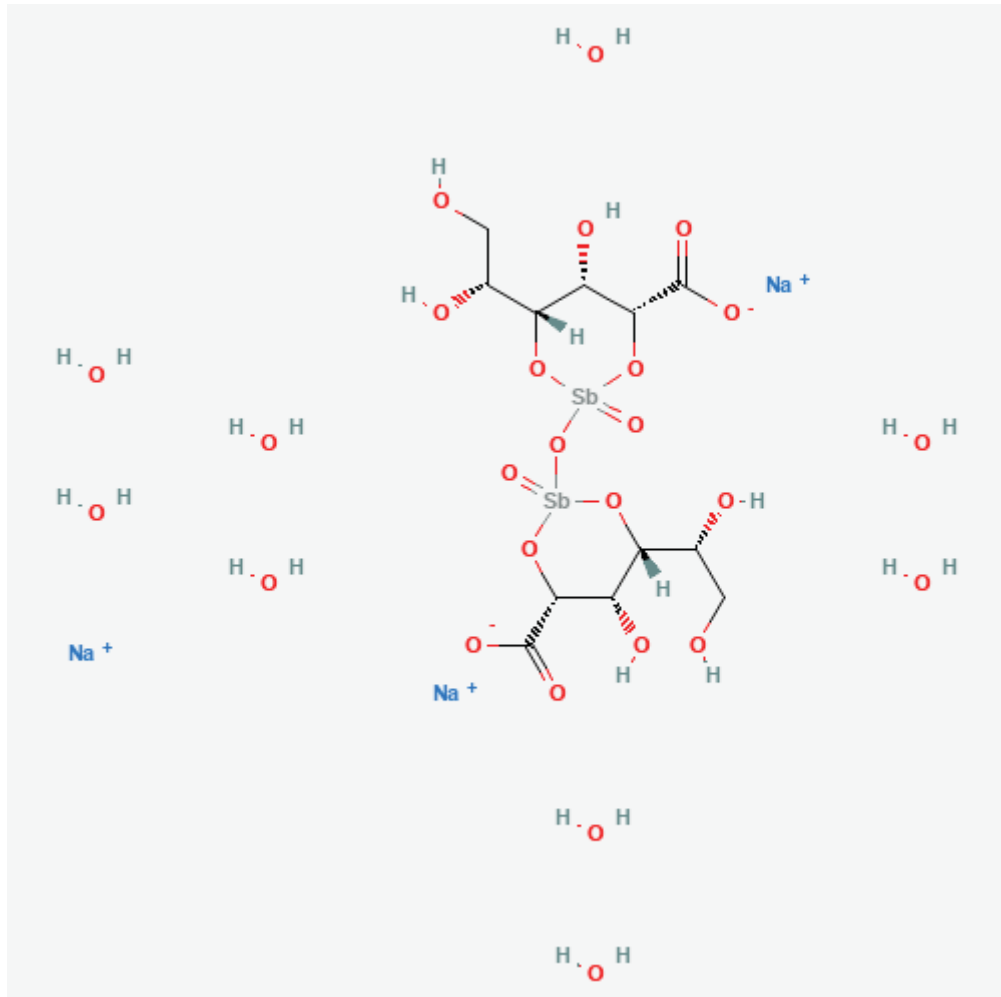
Os antimoniais pentavalentes são considerados o tratamento de primeira escolha desde o começo do século 20 (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; GUERIN et al., 2002; MURRAY, 2000). O tratamento de segunda escolha inclui a anfotericina B, as pentamidinas e a miltefosina (MURRAY, 2000; SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, 2013). Além disso, novos agentes como tamoxifeno e paramomicina têm sido introduzidos na terapia da leishmaniose nos últimos anos (CHAPPUIS et al., 2007; MIGUEL et al., 2011). Devido aos problemas relacionados a todas estes medicamentos, também tem sido utilizada a terapia combinada no lugar da monoterapia, com resultados positivos (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; SUNDAR, Shyam et al., 2011; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

##### 2.1.4.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes são bioprecursores, convertidas nos macrófagos à sua forma ativa, que consiste no antimônio trivalente (Sb(III)) (EPHROS et al., 1999). Dois compostos à base de antimônio pentavalente (Sb(V)) estão disponíveis comercialmente: o antimoniato de *N*-metil-glucamina (Glucantime, Sanofi-Aventis) e o estibogluconato de sódio (Pentostam, GlaxoSmithKline). O Glucantime contém 8,5% de Sb(V) e é usado principalmente em países de língua inglesa, enquanto o Pentostam é amplamente utilizado e possui cerca de 10% de Sb(V)

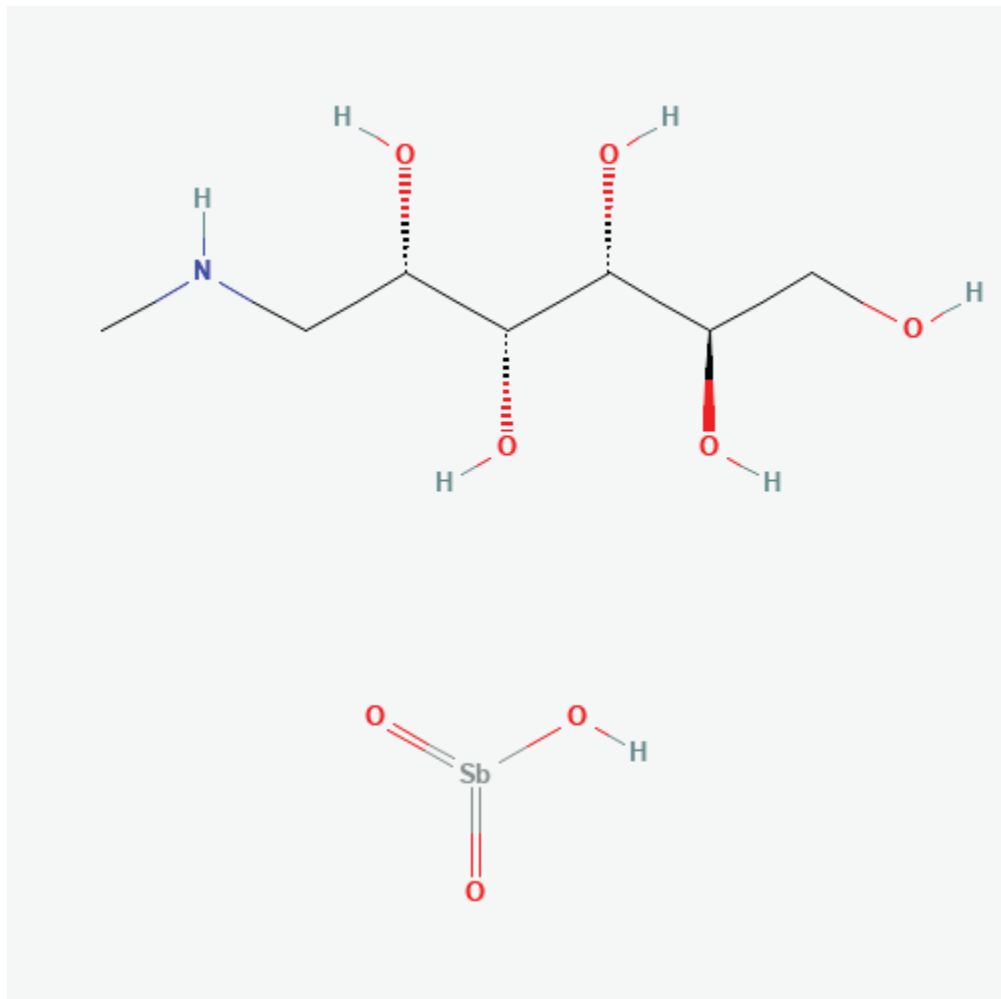
(HERWALDT; BERMAN, 1992; WORTMANN et al., 2002). A estrutura química desses fármacos pode ser visualizada nas FIGURAS 2 e 3.

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTIBOGLUCONATO DE SÓDIO



FONTE: PubChem (2022e)

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ANTIMONIATO DE N-METIL-GLUCAMINA



FONTE: PubChem (2022b)

Sabe-se que os compostos a base de Sb(V) penetram nos macrófagos dos hospedeiros e são convertidos à Sb(III) dentro dos fagolisossomos, onde estão as amastigotas. O Sb(III) então induz o efluxo de compostos de tiol das amastigotas, causando uma desordem no potencial redox das células e inibição da enzima TR, com consequente início do processo de apoptose celular (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Além disso, mecanismos indiretos como o aumento de citocinas também podem ser causados pelos antimoniais pentavalentes (PATHAK; YI, 2001), bem como indução de dano ao DNA dos parasitos (LIMA et al., 2010) e inibição da DNA topoisomerase (TORRES et al., 2010).

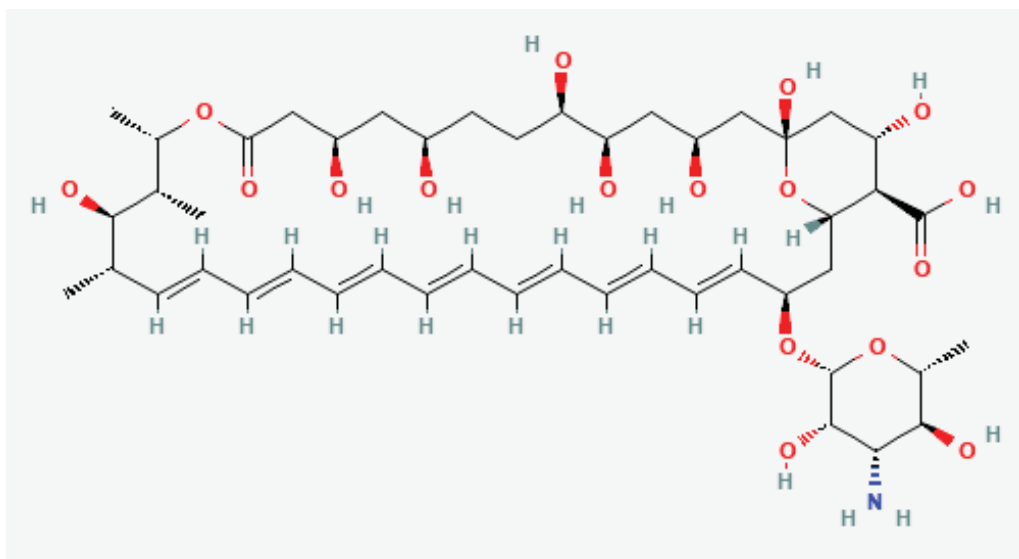
Diversos problemas estão relacionados ao uso dos antimoniais pentavalentes: são injetáveis e devem ser administrado por um período de 20 a 40 dias, o que dificulta a adesão ao tratamento e facilita o aparecimento de resistência. Além disso,

apresentam alta toxicidade, baixa tolerabilidade, altas taxas de recorrência e desenvolvimento de resistência (BERMAN, J. D., 1997; CROFT; COOMBS, 2003; HERWALDT; BERMAN, 1992). Efeitos adversos como náusea, vômito, dor abdominal, mialgia, artralgia, neutropenia, trombocitopenia e pancreatite também estão associados ao uso destes medicamentos (GASSER et al., 1994; KHALIL et al., 2006; OMS, 2010a; RAJU et al., 2012; SHAHIAN; ALBORZI, 2009; THAKUR; KUMAR, 1990). Os eventos mais graves são a acidose tubular renal, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (MATOUSSI et al., 2007b; ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004). Mudanças no eletrocardiograma, como intervalo Q-T prolongado, também foram observadas (ANTEZANA et al., 1992; SUNDAR, Shyam et al., 2011; SUNDAR, Shyam; CHATTERJEE, 2006). Por fim, foram relatados casos de morte súbita com altas doses desses fármacos em pacientes com doença cardíaca, renal, hepática, HIV, idade avançada ou gestantes (OMS, 2010a).

#### 2.1.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um macrolídeo, originalmente utilizado no tratamento de micoses sistêmicas (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). Complexa-se com esteróis da membrana celular do *Leishmania* spp., causando alteração no balanço iônico e consequente morte celular (GOAD; HOLZ; BEACH, 1984; ROBERTS et al., 2003). A estrutura química da anfotericina B pode ser visualizada na FIGURA 4.

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ANFOTERICINA B



FONTE: PubChem (2022a)



O uso deste medicamento no tratamento da leishmaniose tem sido relacionado a altas taxas de cura e foi introduzido na terapêutica devido à casos de resistência do parasito aos antimoniais (BARRATT; LEGRAND, 2005; MISHRA, Jyotsna; SAXENA; SINGH, 2007; SINGH, Sarman; SIVAKUMAR, 2004). Entretanto, a anfotericina B está relacionada a diferentes efeitos adversos, como: febre frequente e severa, calafrios, tromboflebite, dores musculares e nas articulações, cólicas gastrointestinais, arritmias cardíacas, hepatotoxicidade, neuropatias periféricas, convulsões, anemia, hipocalcemia, além do desenvolvimento de resistência e toxicidade. A anfotericina B é injetável e o tratamento pode levar de 20 a 40 dias, dificultando a adesão à terapia e levando a casos de resistência (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; CHAPPUIS et al., 2007; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, o acompanhamento da função renal e a necessidade de hospitalização por até 5 semanas para a realização do tratamento aumentam significativamente os custos da terapia (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

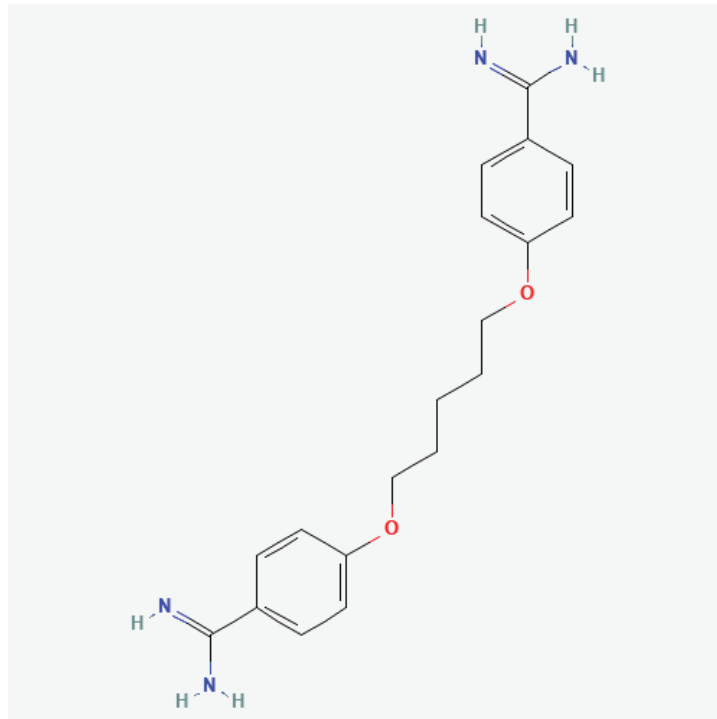
Para procurar minimizar os efeitos adversos da anfotericina B, foram desenvolvidas diferentes formulações, como a associação do medicamento com lipossomas (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; SUNDAR, Shyam et al., 2004; YARDLEY; CROFT, 1997). Lipossomas são partículas lipídicas artificiais que são absorvidas mais rapidamente e assimiladas pelo sistema mononuclear fagocítico, além de permanecerem no sangue por mais tempo e assim terem maior biodisponibilidade do que o fármaco livre (BERMAN, J. D., 1997; MEYERHOFF, 1999). Entretanto, o alto custo e baixa estabilidade a altas temperaturas da anfotericina B lipossomal limitam seu uso em países subdesenvolvidos (BERMAN, J; DIETZE, 1999; SUNDAR, S et al., 1999).

#### 2.1.4.3 Pentamidina

A pentamidina foi introduzida no tratamento da leishmaniose na década de 1980 e é usada como um tratamento de segunda escolha nos casos resistentes aos antimoniais pentavalentes (NOK, 2003; THAKUR, 1984; ZIJLSTRA et al., 2003). Na Índia e Sudão, estudos demonstraram uma taxa de cura de 93% para LV, ainda que em algumas áreas da Índia a taxa tenha diminuído para 70-80% nos anos 90 (DAS et al., 2009; MISHRA et al., 1992; THAKUR; KUMAR; PANDEY, 1991). No tratamento da LC e LMC, a pentamidina alcançou taxas de cura de 90-93% (AMATO et al., 1998;

DE PAULA et al., 2003). Seu mecanismo de ação é desconhecido, apesar de saber-se que ela atua no genoma do parasito a nível mitocondrial e altera o metabolismo da ubiquitina (NGUEWA et al., 2005; SUN; ZHANG, 2008). A estrutura química da pentamidina pode ser observada na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA PENTAMIDINA



FONTE: PubChem (2022d)

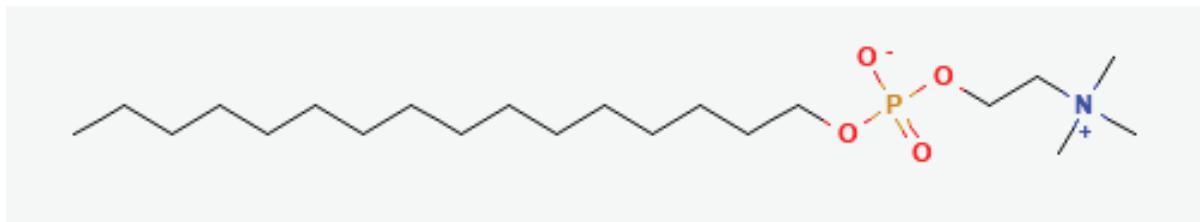
Alguns efeitos adversos severos estão associados ao seu uso em pacientes com LV, como queda de pressão arterial, colapso vascular, pancreatite, hipoglicemia grave, diabetes mellitus persistente e disfunção renal. A pentamidina é injetável, assim como a maioria dos demais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, dificultando a adesão e levando ao desenvolvimento de resistência (BERMAN, 2005; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; SUNDAR; CHATTERJEE, 2006; THAKUR; KUMAR; PANDEY, 1991).

#### 2.1.4.4 Miltefosina

A miltefosina foi o primeiro tratamento oral efetivo contra a leishmaniose, sendo originalmente um antineoplásico (SINDERMANN; ENGEL, 2006; SOTO et al., 2004, 2007; SUNDAR et al., 2008; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). É considerada um

tratamento de primeira escolha na Índia, Nepal e Bangladesh, com uma taxa de cura de 94-97% para a LV na Índia (BHATTACHARYA et al., 2004; SINGH et al., 2006; SUNDAR et al., 2002). É efetiva também contra a LC e promissora quanto ao tratamento da LMC na Bolívia (SOTO et al., 2001, 2007). A sua estrutura química pode ser visualizada na FIGURA 6.

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MILTEFOSINA



FONTE: PubChem (2022c)

Seu mecanismo de ação não é conhecido, mas sabe-se que o fármaco altera a permeabilidade da membrana celular do parasito (PARIS et al., 2004; PÉREZ-VICTORIA et al., 2003). A miltefosina também estimula a produção da enzima óxido nítrico sintetase 2 nos macrófagos, catalisando a geração de óxido nítrico e consequente morte do parasito dentro das células mononucleares (WADHONE et al., 2009).

Está associada com teratogenicidade e efeitos adversos gastrointestinais (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2012; SUNDAR; CHATTERJEE, 2006). Além disso, seu alto custo e longo tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ : 152 horas) são desvantagens associados ao uso deste fármaco (BHATTACHARYA et al., 2004; JHA et al., 1999; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006; SOTO; BERMAN, 2006; SUNDAR; MURRAY, 2005).

#### 2.1.4.5 Terapia combinada

Devido aos problemas relacionados a quase todas os medicamentos utilizados na terapêutica da leishmaniose, o uso da terapia combinada representa uma estratégia alternativa (MUSA et al., 2012; VAN GRIENSVEN et al., 2010). Tal terapia consiste no uso concomitante de dois ou mais medicamentos, de forma que a eficácia do tratamento seja melhor e diminua o surgimento de resistência, bem como toxicidade, devido ao sinergismo entre os fármacos, utilizadas em doses mais baixas que na monoterapia (NWAKA; HUDSON, 2006; OUELLETTE; DRUMMELSMITH;

PAPADOPOULOU, 2004; VAN GRIENSVEN et al., 2010). Entretanto, a terapia combinada é limitada às moléculas aprovadas para tratamentos de pequena duração, o que dificulta o entendimento do mecanismo relacionado (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

No tratamento da LV, a combinação mais promissora é a do estibogluconato de sódio com a paromomicina, com taxa de cura maior que do antimonial sozinho (THAKUR et al., 2000). Além disso, diversos estudos apontam que a combinação de fármacos antileishmania com imunomoduladores pode ser benéfica (GOTO; LINDOSO, 2010; SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011; SHAKYA; SANE; GUPTA, 2011).

Um regime de tratamento efetivo para a LC é uma combinação de alopurinol, imiquimode, itraconazol ou pentoxifilina oral e o Glucantime, com taxa de cura de 86% (ESFANDIARPOUR; DABIRI, 2007; LLANOS-CUENTAS et al., 1997; MACHADO et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 1995). Além disso, a combinação de estibogluconato de sódio e alopurinol teve maior efetividade do que o estibogluconato de sódio sozinho, apesar de esse efeito não ser observado no tratamento da LMC (NAVIN et al., 1992).

## 2.2 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS AUXILIADO POR COMPUTADOR

Os computadores se tornaram ferramentas essenciais na Química Medicinal Farmacêutica (QMF) moderna: muitas das análises que só podiam ser realizadas por especialistas tornaram-se acessíveis e factíveis em qualquer equipamento, por meio dos métodos de planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *computer-aided drug design*) (PATRICK, 2013).

A modelagem molecular pode ser definida como a investigação das propriedades moleculares e estruturas por meio da química computacional, de forma a fornecer uma visualização tridimensional (3D) das moléculas (CARVALHO et al., 2003). As operações executadas na modelagem molecular envolvem o uso de algoritmos matemáticos pelos *softwares*, que calculam a estrutura e propriedades das moléculas em estudo. Assim, é possível calcular a energia de um arranjo de átomos específico, modificar sua estrutura para chegar à conformação de menor energia, calcular a carga, momento dipolo, calor de formação e outros parâmetros. Os modelos matemáticos utilizados podem ser baseados em mecânica molecular ou mecânica quântica (PATRICK, 2013).

## 2.2.1 Modelos matemáticos

### 2.2.1.1 Mecânica molecular

Na mecânica molecular, as equações aplicadas seguem as leis da física clássica e referem-se apenas aos núcleos, mas não aos elétrons: assim, os átomos são considerados como esferas conectadas por uma série de molas. São utilizadas equações derivadas da mecânica clássica para o cálculo das energias de interação (campos de força) resultantes do estiramento das ligações, mudança de ângulos, interações não-ligantes e energias de torção. Para a mensuração destes cálculos, os *softwares* de modelagem molecular têm bancos de dados que descrevem as interações entre diferentes pares de átomos. Vale ressaltar que as energias calculadas são comparativas entre diferentes conformações da mesma molécula, e não valores absolutos. A mecânica molecular representa um modelo mais rápido e com menor gasto computacional, entretanto não é capaz de calcular propriedades eletrônicas. Pode ser realizado para moléculas de até milhares de átomos, e tem utilidade em cálculos de minimização de energia, identificação das conformações mais estáveis, cálculo de energia para conformações específicas, geração de diferentes conformações e estudo do movimento molecular (PATRICK, 2013; VANOMMESLAEGHE; GUVENCH; MACKERELL, 2014).

### 2.2.1.2 Mecânica quântica

Por sua vez, a mecânica quântica baseia-se nas equações da física quântica, considerando os elétrons e os núcleos das moléculas, com uma série de aproximações. Os núcleos são considerados imóveis, já que os elétrons se movem muito mais rapidamente; assim é possível calcular a energia eletrônica separadamente da energia nuclear. Além disso, assume-se que os elétrons têm movimento independente entre si (PATRICK, 2013).

Os modelos de mecânica quântica podem ainda ser divididos em *ab initio* ou semiempíricos. O modelo *ab initio* requer maior gasto computacional, é aplicável apenas a moléculas pequenas (dezenas de átomos), não requer que o *software* tenha um banco de dados e é mais rigoroso. Já o método semiempírico considera apenas os elétrons de valência, é menos acurado, pode ser realizado em moléculas maiores

(centenas de átomos) e é mais rápido, visto que usa parâmetros armazenados pelos *softwares* e mais aproximações. Através dos modelos de mecânica quântica, pode-se calcular: energia e coeficientes de orbitais moleculares, calor de formação de conformações específicas, cargas atômicas parciais, potenciais eletrostáticos, momentos dipolo, geometria e energia de estados de transição e energia de dissociação de ligações (BRYCE, 2020; PATRICK, 2013).

## 2.2.2 Métodos de análise conformacional

### 2.2.2.1 Minimização de energia

Uma vez que uma molécula 3D for desenhada ou obtida de algum banco de dados, é necessário que seja realizado um processo chamado de minimização de energia. Esse processo precisa ser executado pois, frequentemente, as estruturas 3D podem ter comprimentos de ligação, ângulos de ligação e ângulos de torção desfavoráveis, bem como interações desfavoráveis com átomos não-ligantes. Em suma, no processo de minimização de energia os *softwares* variam os comprimentos e ângulos de ligação e torção, até que uma variação nesses parâmetros não resulte em uma grande diferença de energia com a conformação anterior: um mínimo de energia (PATRICK, 2013).

A estrutura obtida pelo processo de minimização de energia não é necessariamente a mais estável, já que o processo interrompe assim que o *software* encontra a primeira conformação estável, ou mínimo local. Para que se possa encontrar uma conformação ainda mais estável, variações estruturais que aumentariam a energia de tensão precisariam ser consideradas. Entretanto, o *software* de minimização não pode continuar fazendo as modificações para chegar a essa conformação, chamada de mínimo global. Assim, para que se encontre o mínimo global, faz-se necessário a geração de diferentes conformações da molécula e posterior comparação das energias de efeitos estéricos. Isso pode ser realizado através dos métodos de dinâmica molecular, rotação de ligações, métodos Monte Carlo e Metropolis ou algoritmos genéticos e evolucionários (LESYNG; MCCAMMON, 1993; PATRICK, 2013).

### 2.2.2.2 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular mimetiza o movimento dos átomos das moléculas, calculando sua energia potencial e cinética através das leis de Newton. Por meio deste método, diferentes conformações podem ser geradas aumentando artificialmente a temperatura do sistema a 900 K – possibilitando que as barreiras energéticas entre as conformações sejam transpostas – e esfriando-o a 300 K para obtenção da estrutura final mais estável. Entretanto, não há garantia de que a dinâmica molecular identifique todas as conformações possíveis e encontre o mínimo global (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018; PATRICK, 2013).

### 2.2.2.3 Rotação de ligações

Outro processo mais sistemático consiste na geração das diferentes conformações pela rotação possível de cada ligação presente na molécula a um número de graus pré-definidos (por exemplo: 12 diferentes conformações para o butano podem ser encontradas rotacionando suas ligações a 30°). O número de conformações geradas depende do número de ligações rotacionáveis e dos graus determinados para a rotação. Em geral, cerca de 1000 conformações por segundo podem ser processadas em um computador normal (PATRICK, 2013).

### 2.2.2.4 Método de Monte Carlo e Metropolis

A procura pela conformação mais estável na dinâmica molecular leva a geração de diferentes conformações aleatórias, de alta e baixa energia, e todas são analisadas individualmente. O método de análise conformacional de Monte Carlo faz com que seja gasto mais tempo de processamento nas conformações estáveis, um processo chamado de amostragem de importância. Assim, são geradas várias conformações pela rotação das suas ligações, e cada uma tem sua energia minimizada e energia de efeito estérico calculada e comparada com a estrutura anterior. Se a energia for menor, ou seja, a estrutura for mais estável, ela é aceita e a próxima conformação é gerada a partir dela. Se for maior, ela pode ser aceita ou não, dependendo de uma equação de probabilidade. A temperatura pode ser determinada pelo analisador e, quanto mais alta, mais estruturas diferentes serão geradas. Entretanto, não é certo que o mínimo global será encontrado, já que é uma busca aleatória – especialmente

se a molécula tiver muitas ligações rotacionáveis e um grande número de possíveis conformações estáveis. Em geral, o algoritmo irá encontrar a conformação estável mais próxima de estrutura inicial (HATFIELD; LOVAS, 2014; PATRICK, 2013).

O método Metropolis pode ser utilizado para aumentar as chances de encontrar o mínimo global. Nesse método, o algoritmo de Monte Carlo é executado em diferentes ciclos de temperatura, começando por uma temperatura alta e diminuindo lentamente. A estrutura mais estável do primeiro ciclo é utilizada para iniciar o próximo, e assim sucessivamente. Dessa forma, a procura é lentamente direcionada para uma área específica do espaço conformacional (as diferentes conformações que podem ser geradas a partir de uma molécula) e pode-se encontrar o mínimo global mais facilmente. Quanto mais lentamente a temperatura for diminuída e mais ciclos forem feitos, maiores as chances de chegar a verdadeira conformação mais estável (HATFIELD; LOVAS, 2014; PATRICK, 2013).

#### 2.2.2.5 Algoritmos genéticos e evolucionários

Por fim, podem ser utilizados algoritmos genéticos e evolucionários para se encontrar o mínimo global. Esses algoritmos têm o mesmo princípio da teoria da evolução. Assim, estes algoritmos pretendem criar diferentes conformações e selecionar apenas as estáveis num processo semelhante ao da evolução biológica, que seleciona mutações benéficas e não passa adiante as desvantajosas. Para que esse processo seja aplicado, os ângulos de torção das ligações rotacionáveis são armazenados como um código ou uma sequência. Essa sequência corresponde a um “cromossomo”, e cada “gene” a um ângulo de torção. Pela escolha aleatória de ângulos de rotação, é gerada uma população de conformações, ou cromossomos, e cada uma tem sua energia calculada por mecânica molecular (AGUIAR-PULIDO et al., 2013; PATRICK, 2013).

No algoritmo genético, são então selecionados pares de “cromossomos” ou “pais” — correspondentes aos mais estáveis da população — e uma nova população é gerada. Cada um dos “cromossomos” (ou conformações) dos pais é recombinado (*crossover*), e assim cada “cromossomo” gerado tem ângulos de torção de cada “pai”. Além dessas recombinações, também são feitas “mutações” em cada “cromossomo” individualmente, ou seja: uma alteração aleatória de um ângulo de torção da molécula. Tanto pela recombinação quanto pela mutação, são geradas novas populações e as



moléculas mais estáveis podem ser usadas com “pais” para a próxima geração (AGUIAR-PULIDO et al., 2013; PATRICK, 2013).

No algoritmo evolucionário não são feitos *crossovers*, mas apenas as mutações pontuais para criação da próxima geração. Cada cromossomo gerado é comparado com um número randômico de cromossomos, e aqueles que correspondem a conformações mais estáveis terão pontuações mais altas e serão preservados (AGUIAR-PULIDO et al., 2013; PATRICK, 2013).

Os dois algoritmos são utilizados para chegar à conformação mais estável em um curto período de tempo, mas, sendo randômicos, também não garantem que o mínimo global seja encontrado. São métodos mais adequados para moléculas altamente flexíveis, que não poderiam ser analisadas usando uma busca sistemática (AGUIAR-PULIDO et al., 2013; PATRICK, 2013).

### 2.2.3 Comparação de estruturas

Na modelagem molecular, é possível comparar diferentes estruturas entre si em um modelo de sobreposição. Assim, o *software* calcula o desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *root mean square deviation*) entre todos os pares de átomos dos grupos farmacofóricos de duas ou mais estruturas sobrepostas, encontrando a orientação das moléculas quando esse valor é mínimo. Esse processo é realizado com as moléculas rígidas: ou seja, nenhuma rotação e mudança de conformação é possível. Assim, cada molécula deve estar na conformação ativa para que o processo de comparação seja realizado. Os *softwares* de modelagem molecular podem definir automaticamente quais átomos devem ser emparelhados, escolhendo aqueles que normalmente estão envolvidos em ligações, como anéis aromáticos, doadores e receptores de ligações de hidrogênio, grupos carregados positivamente, grupos ácidos e grupos básicos. Em suma, quanto menor o RMSD, maior a similaridade entre as estruturas estudadas (MARTÍNEZ, 2015; PATRICK, 2013).

### 2.2.4 *Docking* molecular

*Docking* molecular (docagem ou ancoragem molecular) é um método de modelagem molecular que consiste na predição da conformação e orientação de um ligante (chamado de pose) no seu sítio de ligação. O processo se inicia pela aplicação

de algoritmos que identificam as poses do ligante no sítio ativo. Então, são utilizadas funções de pontuação para predizer a atividade biológica do ligante, através da avaliação das interações entre ele e o alvo molecular (KITCHEN et al., 2004).

Ainda que possa ser realizado manualmente, molécula a molécula, existem atualmente uma grande variedade de *softwares* que requerem um mínimo de manuseio do operador e permitem o estudo de muitos ligantes ao mesmo tempo. Assim, pode ser realizada a triagem virtual (*triagem virtual*) de milhares de moléculas, obtidas de uma “biblioteca” química, em *softwares* de *docking* a fim de encontrar a que melhor se encaixa com o alvo molecular (PATRICK, 2013).

As redes (*grids* ou *grid box*) foram utilizadas pela primeira vez por Goodford (1985) e têm se tornado comum em *softwares* de *docking* molecular. Consistem em redes 3D que são construídas a partir de coordenadas definidas pelo operador ao redor do alvo molecular ou apenas do seu sítio de ligação. As *grids* permitem a estimativa dos efeitos de campos estéricos e eletrostáticos ao redor de uma molécula, bem como interações com os aminoácidos do sítio de ligação e sua força, utilizando fragmentos moleculares típicos (como carbonilas, carboxilas ou aminas) ou átomos (como carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio) presentes na maioria dos ligantes. Essas medidas são armazenadas pelos *softwares* em tabelas, para cada átomo típico ou fragmento. Dessa forma, as energias de ligação dos ligantes a serem testados pode ser calculada identificando que átomos da molécula coincidem com pontos específicos da rede e medidas pré-calculadas para os átomos e fragmentos típicos, em um curto período de tempo.

Os cálculos de *docking* precisam ser rápidos e factíveis, visto o número de ligantes envolvidos, mas também acurados o suficiente para gerar valores de energia de ligação exatos. Existem três abordagens principais de *docking* molecular: ligantes e alvo molecular rígidos, ligantes e alvo molecular flexíveis e alvo rígido e ligantes flexíveis. A primeira abordagem é a mais simples, e só é realizada quando se conhece a conformação ativa do ligante ou se sua estrutura é cíclica e rígida. Já o *docking* com ligantes e alvo flexíveis é a mais complexa das abordagens e envolve um alto gasto computacional. A terceira abordagem é a mais comum, onde o alvo é considerado rígido e os ligantes flexíveis (PATRICK, 2013).

#### 2.2.4.1 *Docking* de ligantes flexíveis

Alguns *softwares* utilizam algoritmos para buscar conformações dos ligantes junto ao processo de docagem (ROSENFELD; VAJDA; DELISI, 1995). Um exemplo é o método Metropolis onde o ligante é posicionado aleatoriamente no sítio de ligação, e o algoritmo de Monte Carlo é então utilizado para gerar diferentes conformações. Além disso, o ligante é rotacionado no sítio de ligação, e assim as conformações são geradas em diferentes orientações. Cada estrutura tem sua energia de ligação medida, e o algoritmo identifica as melhores formas de ligação. Assim, é medida a energia de ligação das diferentes formas de o ligante ancorar-se no sítio de ligação, e não a energia estérica das diferentes conformações (PATRICK, 2013; ROSENFELD; VAJDA; DELISI, 1995).

Os algoritmos genéticos e evolucionários são também utilizados por *softwares* de *docking* de ligantes flexíveis e alvo rígido. Nestes casos, os “cromossomos” não apenas determinam a conformação, mas também a posição e orientação no sítio de ligação. Além disso, as mutações e *crossovers* mudam a conformação e orientação pela translação e rotação da molécula inteira do ligante (PATRICK, 2013; ROSENFELD; VAJDA; DELISI, 1995).

Outros *softwares* utilizam métodos diferentes para o *docking* de ligantes flexíveis. Um método popular consiste na fragmentação do ligante, identificação de um fragmento rígido a ser docado e reconstrução da molécula a partir desse fragmento. Outro método é o utilizado pelo *software Flexible Ligands Orientated on Grid* (FLOG), que faz o *docking* de diferentes conformações armazenadas em bibliotecas (PATRICK, 2013; ROSENFELD; VAJDA; DELISI, 1995).

#### 2.2.5 Alvo molecular: a enzima tripanotiona redutase

A TR tem papel antioxidante e está presente em todos os parasitas da família Trypanosomatidae, inclusive do gênero *Leishmania*. A ausência da TR nos hospedeiros mamíferos e a sensibilidade dos parasitas frente às espécies reativas de oxigênio (EROS), tornam a enzima um alvo molecular promissor para fármacos antileishmania (BAIOCCO et al., 2009).

### 2.2.5.1 Domínios de ligação da enzima

A TR é um dímero, onde cada monômero é formado por um domínio de ligação ao dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), um domínio de ligação ao fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e um domínio de interface (ZHANG et al., 1996).

O domínio de ligação ao FAD é formado por uma folha- $\beta$  antiparalela de três fitas, uma folha- $\beta$  paralela de cinco fitas e quatro  $\alpha$ -hélices (BAIOCCO et al., 2009). O domínio de ligação ao FAD da TR é maior que o da glutathione redutase (GR) humana, apesar de ser semelhante (BOND et al., 1999; LANTWIN et al., 1994; HUNTER et al., 1992; JACOBY et al., 1996; ZHANG et al., 1996). Entre a família da TR, quase todos resíduos que interagem com o FAD são conservados, com pequenas diferenças (BAIOCCO et al., 2009).

Já no domínio de ligação ao NADPH, o grupo fosfato do ligante interage com a TR pela ligação entre os oxigênios do NADPH e os aminoácidos arginina (Arg222), Arg228 e tirosina (Tyr221) da enzima. Além disso, o grupo pirofosfato interage por ligação de hidrogênio com o Tyr198, enquanto a ribose da nicotinamida interage com a metionina (Met333) e a nicotinamida com o ácido glutâmico (Glu202) e a alanina (Ala365). A enzima passa por mudanças conformacionais quando da ligação ao NADPH: o anel fenólico da Tyr198 é rotacionado  $120^\circ$  ao redor da ligação entre o carbono  $\alpha$  e carbono  $\beta$ , de forma a acomodar o anel nicotínico do ligante. Já a Arg222 rotaciona  $30^\circ$  ao redor da ligação C $\alpha$ -C $\beta$  para acomodar o anel de adenina (BAIOCCO et al., 2009).

A TR é ativa no estado dimérico e possui uma grande área de superfície apolar (3187.61 Å) (DESJEUX, P., 2001). A interface dimérica é estabilizada por pontes de hidrogênio entre diversos resíduos de aminoácidos. Algumas dessas interações estão presentes apenas na TR, mas não na GR humana. Além disso, a interface dimérica contém dois sítios catalíticos onde ocorre a redução da tripanotiona (BAIOCCO et al., 2009).

### 2.2.5.2 Mecanismo molecular de redução da tripanotiona

O sistema tripanotiona/TR é semelhante ao sistema glutathione/GR presente nas células humanas. Tem papel antioxidante e é essencial para a sobrevivência dos

parasitas. A enzima tripanotiona sintetase (TS) sintetiza um conjugado glutaciona-espermidina (N1-N8-bis(glutacionil)espermidina) chamado de tripanotiona, enquanto a TR mantém esse conjugado reduzido (HUNTER, W. N. et al., 2003; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008; LINARES; RAVASCHINO; RODRIGUEZ, 2006).

A TR tem muitas propriedades semelhantes à GR humana, mas é substrato-específica, ou seja, não reduz a glutaciona (BRADLEY; WALSH; BÜCHELER, 1991; SHAMES et al., 1988). Assim, é consenso que o mecanismo de redução seja parecido para ambas as enzimas (BERKHOLZ et al., 2008; KARPLUS; SCHULZ, 1989).

O mecanismo começa com a ligação NADPH à enzima, que reduz temporariamente o grupamento flavina da TR. Então, o grupo flavina reduzido promove a redução da ponte dissulfeto entre a cisteína (Cys57) e Cys52 no sítio ativo da enzima, formando um intermediário covalente e em seguida um complexo estável de transferência de carga entre o grupo flavina e o grupo tiol da Cys57. Logo após, O NADP<sup>+</sup> se dissocia e é substituído por outro NADPH. A Cys52, após ser ativada pelo par Hys461'-Glu466' (que pertencem a segunda subunidade do dímero), reage então com a tripanotiona. Por fim, a Cys57 ataca a Cys52 e libera a tripanotiona reduzida. Forma-se novamente a ponte dissulfeto entre a Cys52 e Cys57, e a enzima volta ao estado oxidado (BAIOCCO et al., 2009).

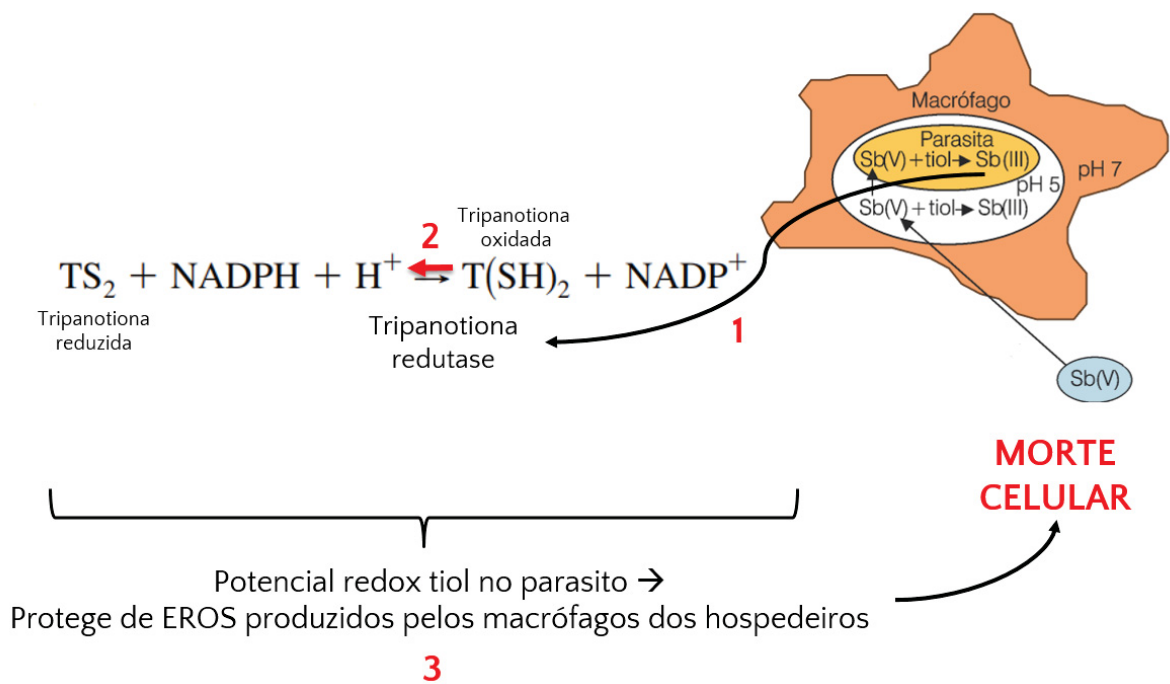
### 2.2.5.3 Mecanismo molecular de ação dos fármacos antimoniais

O alvo molecular dos fármacos antimoniais é a enzima TR (CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 1995; GOODWIN; PAGE, 1943; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). O mecanismo molecular pelo qual os antimoniais pentavalentes inibem a TR foi elucidado por Baiocco et al. (2009) e sua estrutura cristalográfica foi obtida e depositada no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código PDB 2JK6.

Os antimoniais pentavalentes são bioprecursores, ativos após conversão do antimônio para Sb(III) (GOODWIN; PAGE, 1943). Além disso, a enzima também precisa estar no estado reduzido para que ocorra a interação (CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 1995). No estado oxidado, os átomos de enxofre da Cys52 e Cys57 estão na distância ideal para formação de uma ponte dissulfeto. Após a redução da TR pelo NADPH e ligação do Sb(III), a ponte dissulfeto é quebrada e os átomos de enxofre se distanciam. Além de interagir com a cisteína, o Sb(III) interage com o resíduo de treonina (Thr335) e o resíduo de Hys461', que também interage com a tripanotiona, e

que pertence ao outro monômero da TR. Assim, a ligação do Sb(III) interrompe a comunicação entre a Hys461', os resíduos Cys e a tripanotona, inibindo assim a redução da tripanotona pela TR (BAIOCCO et al., 2009). Para ilustrar, o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes pode ser visualizado de forma esquemática na FIGURA 7.

FIGURA 7 – MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMONIAIS PENTAVALENTES



FONTE: A autora (2022)

LEGENDA: O antimônio proveniente dos antimoniais pentavalentes é reduzido a Sb(III) dentro dos fagolisossomos e do próprio parasito. Uma vez na forma de Sb(III), atua em resíduos de cisteína e histidina da enzima TR do *Leishmania* spp., o que impede sua ação redutora sobre a molécula de tripanotona (1). Devido a inibição da enzima, a reação tripanotona/TR é deslocada para a esquerda (2), desequilibrando o potencial redox do parasito, expondo-o às EROS (3) e levando, por fim, a morte celular.

### 2.2.6 Predição das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, toxicidade e drug-likeness

No processo de desenvolvimento e descoberta de novos fármacos, muitas estruturas devem ser avaliadas de acordo com diversos parâmetros, a fim de definir aquelas que têm maiores possibilidades de se tornarem fármacos seguros e eficazes (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

As moléculas selecionadas precisam ter propriedades físico-químicas adequadas, além de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade apropriadas (chamadas de propriedades ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). A estimativa destas propriedades ainda na fase de descoberta de novos fármacos reduz as falhas relacionadas à farmacocinética nas fases clínicas de estudo (HAY et al., 2014). Além disso, modelos computacionais dão ainda a possibilidade de predição de tais parâmetros antes mesmo que procedimentos experimentais sejam levados à cabo, representando economia de tempo e recursos financeiros (DAHLIN; INGLESE; WALTERS, 2015).

Muitos métodos *in silico* pretendem prever as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de uma molécula, como a regra-dos-cinco de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001), que define a probabilidade de uma molécula ter característica de uma droga para uso oral, ou *drug-likeness*.

#### 2.2.6.1 Propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas de uma estrutura podem ser preditas através do uso de ferramentas como o *SwissADME* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Assim, podem ser acessados parâmetros simples como peso molecular, refratividade molecular, quantidade de átomos específicos (átomos pesados, pesados e aromáticos, carbonos com hibridização  $sp^3$ , entre outros), área de superfície polar, lipofilicidade e solubilidade em água.

A área de superfície polar é calculada considerando-se apenas fragmentos (átomos de enxofre e fósforo) como átomos polares, técnica conhecida por área de superfície polar topológica (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000). A área de superfície polar é um descritor útil na predição de diversas propriedades farmacocinéticas, especialmente a probabilidade de passagem das moléculas por barreira biológicas como a barreira hematoencefálica (BHE) (DAINA; ZOETE, 2016).

A lipofilicidade é descrita principalmente pelo coeficiente de partição *n*-octanol/água ( $\log P_{o/a}$ ). Cinco modelos para predição do  $\log P_{o/a}$  são utilizados pelo *SwissADME*, de forma a aumentar a acurácia deste parâmetro através do consenso entre os modelos utilizados. São eles: XLOP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT e ILOGP. Assim, o  $\log P_{o/a}$  consensual é a média aritmética dos valores preditos pelos 5 métodos utilizados (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).



A solubilidade em água também é uma característica determinante no desenvolvimento de um fármaco, visto que afeta sua absorção e biodisponibilidade. Na ferramenta *SwissADME*, são usados dois métodos topológicos para predição da solubilidade das moléculas estudadas em água, sendo eles o modelo ESOL (DELANEY, 2004) e uma adaptação de Ali et al (2012). Ambos tem adequada correlação linear ( $R^2 = 0,69$  e  $0,81$ , respectivamente) entre os valores experimentais e os preditos. Um terceiro método baseado em fragmentos é utilizado, desenvolvido por SILICOS-IT, com correlação linear de  $0,75$  (SILICOS-IT, 2014). A solubilidade é então apresentada como logaritmo decimal da solubilidade molar em água ( $\log S$ ), além de mol/L, mg/mL e classe qualitativa de solubilidade (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

#### 2.2.6.2 *Drug-likeness*

Drug-likeness é um parâmetro importante que deve ser preenchido por uma molécula sintética ou produto natural para ser aprovado para uso em ensaios clínicos. Diversas regras podem ser utilizadas para fazer tal avaliação, entre elas a regra de Lipinski e a regra Veber. Para aplicação destas regras a determinada estrutura, também várias ferramentas estão disponíveis, como a plataforma *ADMETlab* (DONG et al., 2018) e *SwissADME* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

A regra dos cinco de Lipinski considera que é mais provável haver baixa absorção e permeabilidade quando a substância possui mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais de 10 receptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior que 500 e  $\log P$  calculado maior que 5 (LIPINSKI et al., 2001). Já a regra de Veber considera que possuem características de fármaco as moléculas que possuem 10 ou menos ligações rotacionáveis e 12 ou menos doadores e receptores de ligação de hidrogênio somados (VEBER et al., 2002).

Na regra de Lipinski, para que uma molécula seja considerada como tendo características fármaco-similares deve-se cumprir pelo menos dois critérios, ao passo que para regra de Veber todos critérios devem ser cumpridos.



### 2.2.6.3 Propriedades ADMET

O perfil farmacocinético de um fármaco é definido pela sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (FAN; DE LANNOY, 2014) e seu esboço é fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, visto que a farmacocinética inapropriada é a maior causa do insucesso no desenvolvimento de medicamentos inéditos (PRENTIS; LIS; WALKER, 1988; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Algumas plataformas, como o *ADMETlab* (DONG et al., 2018), possibilitam a avaliação da farmacocinética das estruturas baseada em bancos de dados e modelos de predição. Através destas, é possível o acesso a diversas propriedades fundamentais, como atuação sobre glicoproteína P (Pgp, do inglês *P-glycoprotein*), absorção intestinal humana (AIH), biodisponibilidade oral, permeação por barreiras biológicas, ligação a proteínas plasmáticas (LPP), volume de distribuição (VD), atuação sobre enzimas do citocromo P450, *clearance* renal (CL), entre outras.

Além disso, também a toxicidade pode ser predita nas etapas iniciais do desenvolvimento de fármacos, aumentando as chances de sucesso da nova molécula em estudo. Além do *ADMETlab* (DONG et al., 2018), plataformas como *ProToxII* (BANERJEE et al., 2018) e *Pred-hERG* (BRAGA et al., 2015) auxiliam na predição da toxicidade das estruturas, dando características como a dose letal mediana (LD50), hepatotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade cardíaca, entre outras.

### 2.2.7 Machine learning

O aprendizado de máquina ou *machine learning* (ML) é um modelo computacional que utiliza algoritmos para inferir fenômenos a partir de padrões observados em um conjunto de dados (COBRE et al., 2021).

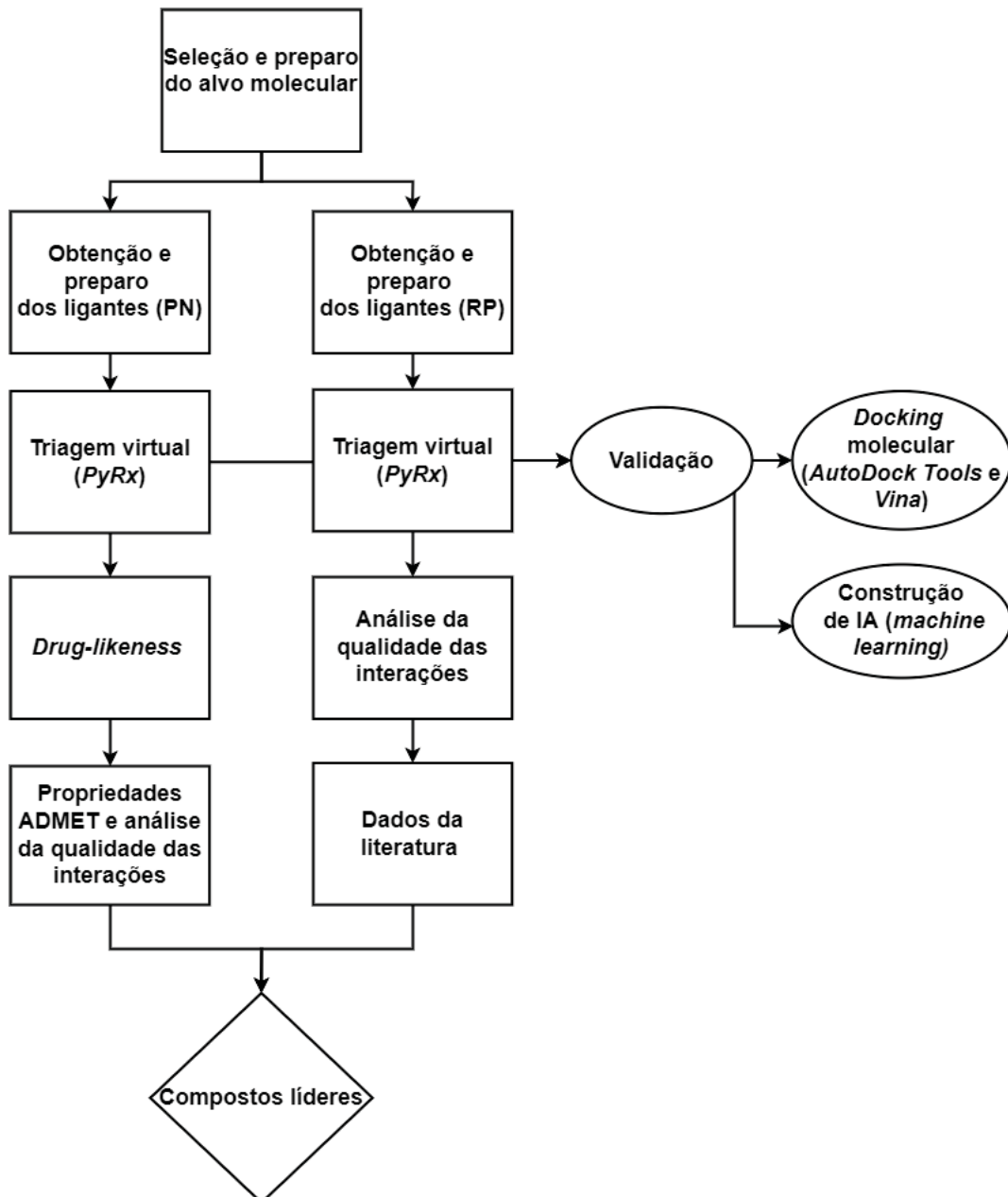
Muitos *softwares* de *docking* molecular podem conter funções de pontuação com vieses importantes, especialmente para moléculas grandes, gerando falsos positivos na etapa de *triagem virtual* (SIEG; FLACHSENBERG; RAREY, 2019). Além disso, se a ligação da molécula ao alvo molecular requer mudanças conformacionais da proteína, podem ocorrer falsos negativos (FERREIRA et al., 2010). Por outro lado, a abordagem de ML tem sido utilizada com sucesso para prever a afinidade entre alvos moleculares e ligantes, com acurácia maior que dos *softwares* de *docking* convencionais (LI et al., 2020; SIEG; FLACHSENBERG; RAREY, 2019).

Os modelos de ML já foram utilizados no reposicionamento de fármacos, predição de interações entre alvo molecular e ligantes, predição da eficácia de fármacos, predição da segurança de biomarcadores e otimização da atividade biológica de moléculas (KHAMIS; GOMAA; AHMED, 2015; LEELANANDA; LINDERT, 2016; MAIA et al., 2020; RÉDA; KAUFMANN; DELAHAYE-DURIEZ, 2020; USHA et al., 2017). Tam et al. (2019), por exemplo, utilizou ML aplicado a uma abordagem de *docking* molecular na descoberta de um candidato à novo fármaco contra o *Mycobacterium tuberculosis*, onde os resultados do modelo gerado equipararam-se àqueles gerados de forma experimental. Além disso, os algoritmos de ML também já foram utilizados para desenvolver diversos modelos de predição de características químicas, biológicas e físicas nas diversas etapas do desenvolvimento de fármacos (AGARWAL; DUGAR; SENGUPTA, 2010; GERTRUDES et al., 2012; LO et al., 2018; RODRIGUES; BERNARDES, 2020; TALEVI et al., 2020).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar o entendimento de como o estudo foi realizado, uma síntese das principais etapas pode ser visualizada no fluxograma apresentado na FIGURA 8.

FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO ESTUDO



LEGENDA: PN: produtos naturais; RP: fármacos para reposicionamento; IA: inteligência artificial; ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

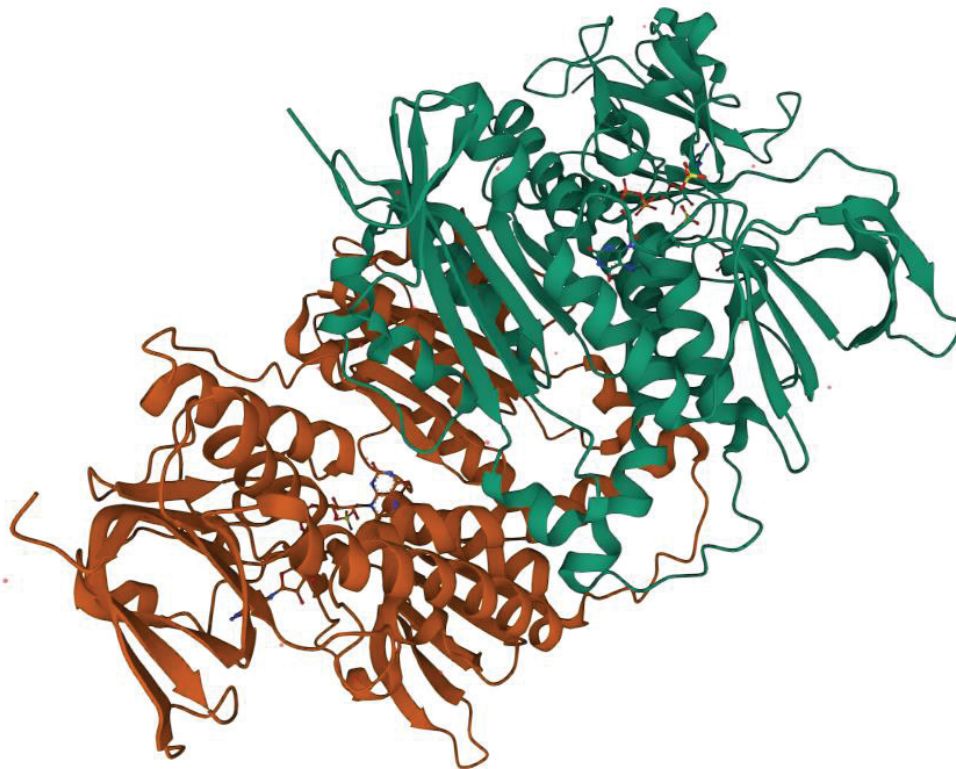
FONTE: A autora (2022).

### 3.1 SELEÇÃO E PREPARO DO ALVO MOLECULAR

A estrutura 3D da enzima TR, estabelecida na literatura como principal alvo molecular da maioria dos leishmanicidas, foi obtida através do *Protein Data Bank* (PDB) (ROSE et al., 2016). O PDB é uma base de dados de domínio público de estruturas 3D de proteínas e ácidos nucleicos, obtidas através de ressonância magnética nuclear, crio microscopia eletrônica e, principalmente, difração de raios-X (BERMAN et al., 2000).

No PDB, foram encontradas as estruturas PDB ID 6T95, 6T97 e 2JK6, correspondentes a TR expressa pelo *Leishmania infantum*, com resolução de 1,5 a 3,0 Å. Os artigos originais das estruturas PDB ID 6T95 e 6T97 não haviam sido aceitos para publicação até o momento, e, portanto, foi escolhido como alvo molecular o cristal obtido por difração de raios-x PDB ID 2JK6, de resolução 2,95 Å, valor de R observado de 0,237, sequência completa de aminoácidos e artigo original publicado (BAIOCCO et al., 2009). Sua estrutura 3D pode ser visualizada na FIGURA 9.

FIGURA 9 – ESTRUTURA 3D DO ALVO MOLECULAR (PDB ID 2JK6)



FONTE: Baiocco et al. (2009); Sehnal (2021).

Para o preparo do alvo molecular, sua estrutura cristalográfica foi importada no *software AutoDock Tools* (MORRIS et al., 2009), onde foram removidos todos artefatos de cristalização (que incluíram vinte e quatro moléculas de água e cinco grupos sulfatos) e foram adicionados os hidrogênios polares e as cargas de Kollman (JAKALIAN; JACK; BAYLY, 2002; GOODSSELL; MORRIS; OLSON, 1996). Como o alvo molecular (proteína PDB 2JK6) é um dímero formado por duas cadeias simétricas (cadeia A e B), neste estudo foi removida a cadeia B e mantida a cadeia A e esta última convertida do formato PDB para o formato PDBQT, que é o formato adequado para a realização das análises de *docking* molecular.

### 3.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS LIGANTES

Os ligantes (produtos naturais e fármacos em teste para reposicionamento) foram obtidos por meio da base de dados *ZINC15* (STERLING; IRWIN, 2015), uma coleção de domínio público de moléculas 3D de compostos químicos bioativos disponíveis comercialmente. Nessa base de dados, as substâncias estão categorizadas quanto à sua disponibilidade (disponíveis para venda, não disponíveis, disponíveis em pequenas quantidades, disponíveis imediatamente ou com tempo de espera), bioatividade (fármacos aprovados pelo FDA, compostos bioativos testados *in vivo* e *in vitro*, entre outros), biogenicidade (compostos biogênicos naturais, metabólitos primários observados em humanos e em outras espécies) e reatividade (anódinos ou com padrões de reatividade) (STERLING; IRWIN, 2015).

#### 3.2.1 Produtos naturais

Na base de dados *ZINC15* (STERLING; IRWIN, 2015) foram encontrados 8846 PNs disponíveis comercialmente e testados *in vivo*, utilizando-se os filtros “*for sale*”, “*in vivo*” e “*biogenic*”. Estes ligantes foram obtidos no formato mol2 e importados no *software PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015). O método de análise conformacional realizado por este *software* de uso livre é a minimização de energia. Assim, essa foi realizada utilizando-se os parâmetros de campo de força UFF, com algoritmo de otimização de gradientes conjugados, número total de 200 passos e *software* programado para parar a minimização quando a diferença de energia entre as conformações for menor do que 0.1. O objetivo desse processo é obter a

conformação de menor energia e, portanto, maior estabilidade, que será utilizada para interagir com o alvo molecular posteriormente. Com o *software* AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009), acoplado ao *PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015), as conformações encontradas foram então convertidas para o formato PDBQT.

### 3.2.2 Fármacos para reposicionamento

Com o objetivo de estudar o reposicionamento de fármacos para a terapêutica da leishmaniose, foram obtidas 1576 moléculas na base de dados *ZINC15* (STERLING; IRWIN, 2015), disponíveis comercialmente e aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) no tratamento de diversas doenças.

Após a aquisição das estruturas 3D dos fármacos (também no formato mol2), os RPs foram importados no *software PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015) para minimização de energia com os mesmos parâmetros utilizados no preparo dos produtos naturais. Posteriormente, as conformações encontradas foram convertidas para o formato PDBQT com o *software AutoDock Vina* (TROTT; OLSON, 2009), acoplado ao *PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015).

### 3.3 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NA ESTRUTURA DO LIGANTE

Após preparo dos ligantes e do alvo molecular, os ligantes e a TR foram ambos importados no *PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015) e a *grid box* foi ajustada de forma a englobar toda o sítio ativo da enzima, nas coordenadas de centro X (28,18), Y (46,71) e Z (1,20) e dimensões de X (60.86 Å), Y (62,20 Å) e Z (55.15 Å). Em seguida, foram ajustados os parâmetros de função de busca do algoritmo genético e função de pontuação de campo de força. Então, procedeu-se a triagem virtual através do AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009), acoplado ao *PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015).

### 3.3.1 Produtos naturais

Foram considerados compostos líderes aqueles que apresentaram valores de energia de ligação alvo molecular-ligante  $\leq -9$  kcal/mol e RMSD menores que 2 Å (KIRCHMAIR et al., 2008).

A conformação mais estável, dentre as 9 encontradas por padrão pelo *PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015) para cada molécula analisada, foi então convertida ao formato PDB para posterior visualização e avaliação da qualidade das interações do complexo ligante-alvo molecular no *software Biovia Discovery Studio Visualizer* (BIOVIA, 2020).

### 3.3.2 Fármacos para reposicionamento

Foram considerados compostos líderes os ligantes com afinidade de ligação com o alvo molecular  $\leq -9$  kcal/mol e RMSD menor que 2 Å. A melhor pose (conformação mais estável) para cada molécula foi então convertida no formato PDB para posterior visualização e avaliação da qualidade das interações do complexo ligante-alvo molecular.

## 3.4 VALIDAÇÃO DA TRIAGEM VIRTUAL

### 3.4.1 *Docking* molecular

Para validação dos resultados da triagem virtual, os RPs e os PNs que mostraram ser de maior afinidade com o alvo molecular (TR) foram submetidos a uma nova modelagem por *docking* molecular nos *softwares AutoDock Tools* (MORRIS et al., 2009) e *AutoDock Vina* (TROTT; OLSON, 2009), utilizando o algoritmo genético. As energias de ligação e os valores de RMSD obtidas nessas análises foram então comparadas com as obtidas no *PyRx virtual screening tool* (DALLAKYAN; OLSON, 2015). A seguir (TABELA 1) são mostrados os parâmetros usados para a otimização do algoritmo genético para a modelagem por *docking* molecular no *AutoDock Tools* (MORRIS et al., 2009) e *AutoDock Vina* (TROTT; OLSON, 2009).



TABELA 1 – PARÂMETROS DO ALGORITMO GENÉTICO USADOS NA ANÁLISE DE *DOCKING* MOLECULAR NO *AUTODOCK TOOLS* E *AUTODOCK VINA*

Número máximo de gerações	27.000
Número máximo de indivíduos importante que sobrevivem automaticamente	1,000
Taxa de mutação genética	0,020
Taxa de <i>crossover</i>	0,800
Média de distribuição de <i>Cauchy</i> para mutação genética	0,000
Número de gerações para colher o pior indivíduo	10,000

FONTE: A autora (2022).

### 3.5 MACHINE LEARNING

Outra estratégia de validar os resultados de modelagem molecular é através da inteligência artificial, por meio de utilização de algoritmos de *machine learning* (ZHANG *et al.*, 2019). Para classificar as moléculas de maior afinidade e de menor afinidade com a enzima TR (classificação binária), e assim validar e reproduzir os resultados da triagem virtual e *docking* molecular, foram utilizados os seguintes algoritmos de ML: análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*), análise discriminante linear (LDA, do inglês *linear discriminant analysis*), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *partial least squares-discriminant analysis*), redes neurais artificiais (ANN, do inglês *artificial neural network*), k-vizinhos mais próximos (KNN, do inglês *k-nearest neighbors*), modelagem independente e flexível por analogia de classe (SIMCA, do inglês *soft independent modeling of class analogies*), *eXtreme gradient boosting* (XGBoost), máquina de vetores de suporte (SVM, do inglês *support vector machine*) e regressão logística (LREG, do inglês *logistic regression*).

Para tal, as propriedades físico-químicas, de lipossolubilidade e de hidrossolubilidade dos PNs e dos fármacos aprovadas pelo FDA foram obtidos na plataforma *SwissADME* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), e usadas como descritores (preditores) para o desenvolvimento dos modelos de aprendizado de máquina (TABELA 2).



TABELA 2 – DESCRITORES USADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS LIGANTES DE MENOR E DE MAIOR AFINIDADES COM A TR

<b>Propriedades físico-químicas</b>	Peso molecular (PM)
	Número de átomos pesados (NAP)
	Número de átomos pesados em anel aromático (NAPA)
	Fração de carbonos com hibridização $sp^3$ (C $sp^3$ )
	Número de ligações rotacionáveis (NLR)
	Número de hidrogênios aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (NHA e NHD)
	Refratividade molar (RM)
<b>Lipossolubilidade</b>	Área de superfície polar topológica (TPSA)
	Log $P_{o/w}$ (iLOGP)
	Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)
	Log $P_{o/w}$ (WLOGP)
	Log $P_{o/w}$ (MLOGP)
	Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)
<b>Hidrossolubilidade</b>	Log $P_{o/w}$ (consenso)
	Log S (ESOL)
	Solubilidade 1
	Log S (Ali)
	Solubilidade 2
	Log S (SILICOS-IT)
	Solubilidade 3

FONTE: A autora (2022)

### 3.5.1 Pré-processamento dos dados para *machine learning*

O pré-processamento dos dados é uma etapa crucial que precede a etapa da construção dos modelos de *machine learning*, e compreende a preparação, organização e estruturação de dados brutos. Isso permite a obtenção de modelos de *machine learning* mais robustos, confiáveis e facilmente interpretáveis (ALAM; YAO, 2019; BURDACK et al., 2020). Para o nosso estudo, diversos métodos de pré-processamento foram testados, nomeadamente: (i) Filtragem: linha de base (pontos especificados), linha de base (mínimos quadrados ponderados), derivada (Savitzky-Golay), suavização (Savitzky-Golay), tendência, ponderação dos mínimos quadrados generalizados (GLSW, do inglês *generalized least squares weighting*), correção de sinal ortogonal (OSC, do inglês *orthogonal signal correction*) e ortogonalização de parâmetros (EPO, do inglês *external parameter orthogonalisation*); (ii) Transformação: valor absoluto e log 10; (iii) Normalização: normalizar, variada normal padrão (SNV, do inglês *standard normal variate*) e correção de dispersão multiplicativa média (MSC-mean, do inglês *multiplicative scatter correction*); (iv) Escalonamento e centragem:

graduação automática, grupo de escala, escala de decaimento logística, média central, mediana central, centro multidirecional, escala multidirecional e escala de raiz quadrada média (GONG et al., 2005; LEE; LIONG; JEMAIN, 2017). Todas as análises foram realizadas no *software Solo* (EIGENVECTOR, 2022).

### 3.5.2 Análise exploratória dos dados

Antes de treinar (calibrar) qualquer modelo de *machine learning* supervisionado é sempre importante realizar uma análise exploratória, com o objetivo de reconhecer padrões de distribuição dos dados no espaço multidimensional, detectar a presença de possíveis amostras anómalas (*outliers*) e avaliar a relação existente entre as variáveis (BALLABIO; CONSONNI, 2013). Neste estudo, a análise exploratória dos dados foi realizada utilizando o modelo não supervisionado PCA, e constituiu como uma fase preliminar para o desenvolvimento dos modelos de ML supervisionados (PLS-DA, ANN, KNN, XGBoost, SIMCA, SVM e LREG). A escolha de número de componentes principais foi realizada pelo critério de *eigenvalue*, onde o número de componentes principais é selecionado de acordo com a maior variância acumulada e a capacidade do modelo em discriminar os compostos com alta e baixa afinidade com a enzima TR.

### 3.5.3 Calibração e validação dos modelos de *machine learning*

Para a construção dos modelos de ML (PLS-DA, ANN, KNN, XGBoost, SIMCA, SVM e LREG) os dados foram divididos em dois grupos: dados de treinamento e dados de previsão. A seleção das amostras (PNs ou RPs) pertencentes ao conjunto de calibração e de previsão foi realizada aleatoriamente no *software Solo* (EIGENVECTOR, 2022) utilizando o algoritmo de *Kennard-Stone* (KENNARD; STONE, 1969). A escolha de número de variáveis latentes dos modelos de ML foi realizada pelo método de validação cruzada do tipo “*leave-one-out*”. Assim, as variáveis latentes que formaram o modelo de calibração foram aquelas que apresentavam menores valores de raiz quadrada de erro médio de calibração (RMSEC) e de raiz quadrada de erro médio de validação cruzada (RMSECV), simultaneamente. A raiz quadrada de erro médio de predição (RMSEP) foi utilizada

para avaliar a capacidade preditiva do modelo, sendo assim os modelos de *machine learning* foram otimizados considerando os menores valores de RMSEP.

### 3.5.4 Avaliação do desempenho preditivo dos modelos de *machine learning*

O desempenho dos algoritmos de ML foi avaliado considerando as seguintes métricas: sensibilidade (equação 1), especificidade (equação 2), acurácia (equação 3), e área sob a curva ROC (do inglês, *receiver operating characteristic*). Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia e de áreas sob a curva ROC variam de zero a um e, portanto, o modelo de ML de melhor desempenho é aquele cujos valores das métricas estão mais próximas a um.

$$\text{(Eq. 1) Sensibilidade} = \frac{VP}{VP+FN}$$

$$\text{(Eq. 2) Especificidade} = \frac{VN}{VN+FP}$$

$$\text{(Eq. 3) Acurácia} = \frac{(VP+VN)}{(VP+VN+FP+FN)}$$

Onde, VP: verdadeiro positivo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo.

As curvas ROC foram também construídas para avaliação da acurácia dos modelos de ML na predição dos compostos de alta e de baixa afinidade com a TR.

### 3.5.5 Identificação de variáveis importantes dos modelos de *machine learning*

Com o objetivo de identificar os descritores físico-químicas relevantes para a classificação dos compostos de baixa e alta afinidade com a enzima TR, foi construído o gráfico de VIP (do inglês, *variable importance in projection*). Um VIP score de uma variável original é calculado como uma soma ponderada das correlações quadradas entre as variáveis latentes do modelo de ML e a variável original (por exemplo, um metabólito). O número de termos na soma depende do número de variáveis latentes do modelo que foram consideradas significativas na distinção dos grupos (classes) das amostras. Os pesos correspondem à variância percentual explicada pelas

variáveis latentes no modelo de ML. Uma variável original com VIP score maior que 1 é considerada estatisticamente significativa para classificação dos grupos (alta e baixa afinidade com o alvo molecular). A seguir é apresentada a equação de cálculo do VIP score (equação 4) (FAVILLA et al., 2013; COCCHI; BIANCOLILLO; MARINI, 2018).

$$(Eq. 4) \text{VIP}^2_j = \frac{\sum_f (W_{if} \text{SSY}_f J)}{\text{SSY}_{total \text{ expl. } F}}$$

Onde,  $w_{if}$  = PLS - valor do peso; SSY = porcentagem de variância Y explicada por cada variável latente específica; F = Número de variáveis latentes do modelo PLS-DA; J = número de X variáveis.

### 3.6 DRUG-LIKENESS

Os PNs que apresentaram maior afinidade de ligação com a enzima TR foram avaliados quanto à sua *drug-likeness*, utilizando-se um consenso entre a regra dos cinco de Lipinski e a regra de Veber. A regra dos cinco de Lipinski considera que é mais provável haver baixa absorção e permeabilidade quando a substância possui mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais de 10 receptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior que 500 e log P calculado maior que 5 (LIPINSKI et al., 2001). Já a regra de Veber considera que possuem características de fármaco as moléculas que possuem 10 ou menos ligações rotacionáveis e 12 ou menos doadores e receptores de ligação de hidrogênio somados (VEBER et al., 2002). Na regra de Lipinski, para que uma molécula seja considerada como tendo características fármaco-similares deve-se cumprir pelo menos dois critérios, ao passo que para regra de Veber todos os critérios devem ser cumpridos.

Assim, consideramos como tendo *drug-likeness* apenas moléculas que respeitaram as duas regras concomitantemente. A observância às regras foi acessada através da plataforma *ADMETlab 1.0* (DONG et al., 2018), utilizando-se os códigos SMILES dos PNs.

### 3.7 PROPRIEDADES ADMET

As propriedades ADMET dos produtos naturais que apresentaram *drug-likeness* foram preditas através das plataformas *ADMET Lab 2.0* (XIONG et al., 2021), *ProTox II* (BANERJEE et al., 2018) e *pred-hERG* (BRAGA et al., 2015).

#### 3.7.1 Absorção

Foram preditas as probabilidades de as moléculas permearem por células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) e células renais caninas Madin-Darby (MDCK), atuarem como substrato ou inibidoras da Pgp, apresentarem AIH e probabilidade de possuírem biodisponibilidade oral menor que 20% e 30%. Nessa etapa, foram excluídos os PNs que apresentaram alta probabilidade de ter biodisponibilidade oral menor que 20%.

#### 3.7.2 Distribuição

Para estimativa da distribuição, foram coletadas informações acerca da LPP, VD, penetração pela BHE e fração livre no plasma (FL) das substâncias estudadas. Foram excluídas apenas aquelas que apresentaram alta probabilidade de penetração pela BHE.

#### 3.7.3 Metabolismo

O metabolismo, por sua vez, foi avaliado através da probabilidade de as substâncias atuarem como inibidoras ou substratos das enzimas do citocromo P450 (CYP) CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Assim, foram eliminados os produtos naturais que atuam fortemente (90-100% de probabilidade) como inibidores de 2 ou mais CYPs ou que tem probabilidade de 70 a 90% de atuarem como inibidoras de 3 ou mais enzimas do citocromo P450.

#### 3.7.4 Excreção

Para predição da excreção, foi avaliado o CI e  $t_{1/2}$  dos produtos naturais de interesse. Não foi considerado nenhum critério de exclusão nessa etapa.

### 3.7.5 Toxicidade

Por fim, foi predita a toxicidade dos produtos naturais que apresentaram absorção, distribuição e metabolismo adequados de acordo com os critérios estabelecidos.

Os parâmetros avaliados foram: LD50, hepatotoxicidade e toxicidade cardíaca, carcinogenicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, atuação em receptor de hidrocarboneto arílico (AHR) e vias de sinalização nucleares e de resposta ao estresse.

As vias de sinalização nucleares avaliadas foram: receptor de andrógeno (AR), domínio de ligação ao ligante de receptor de andrógeno (AR-LBD), receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER), domínio de ligação ao ligante do receptor de estrogênio (ER-LBD), receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) e elemento de resposta antioxidante eritroide 2 relacionado ao fator 2 (nrf2/ARE).

As vias de sinalização de resposta ao estresse acessadas foram: elemento de resposta ao fator de choque térmico (HSE), potencial de membrana mitocondrial (MMP), gene supressor tumoral p53 e proteína 5 contendo domínio da família das ATPase AAA (ATAD5).

### 3.8 ANÁLISE DA QUALIDADE DAS INTERAÇÕES

As interações entre os ligantes (PNs e RPs) com o alvo molecular, para aqueles que apresentaram alta afinidade com a enzima TR e demais características promissoras, foram avaliadas através do *software Biovia Discovery Studio Visualizer* (BIOVIA, 2020). Assim, foram extraídas as estruturas bidimensionais (2D) e 3D, de forma a possibilitar a visualização do tipo de ligação e de quais aminoácidos da TR estavam envolvidos. De acordo com Lima (2020), apesar de ter como vantagem uma IC50 menor, moléculas que no *docking* molecular fazem ligações covalentes com o alvo podem gerar mais reações adversas por não haver garantia da sua seletividade. Por outro lado, moléculas que fazem outros tipos de ligação (como ligações de *van der Waals* e ligações de hidrogênio), ainda que tenham IC50 maior, apresentam reações adversas mais brandas já que, caso interajam com outras moléculas que não o alvo idealizado, tem uma ligação menos estável que as covalentes. Assim, foram excluídas as moléculas que apresentaram ligações covalentes, bem como aquelas

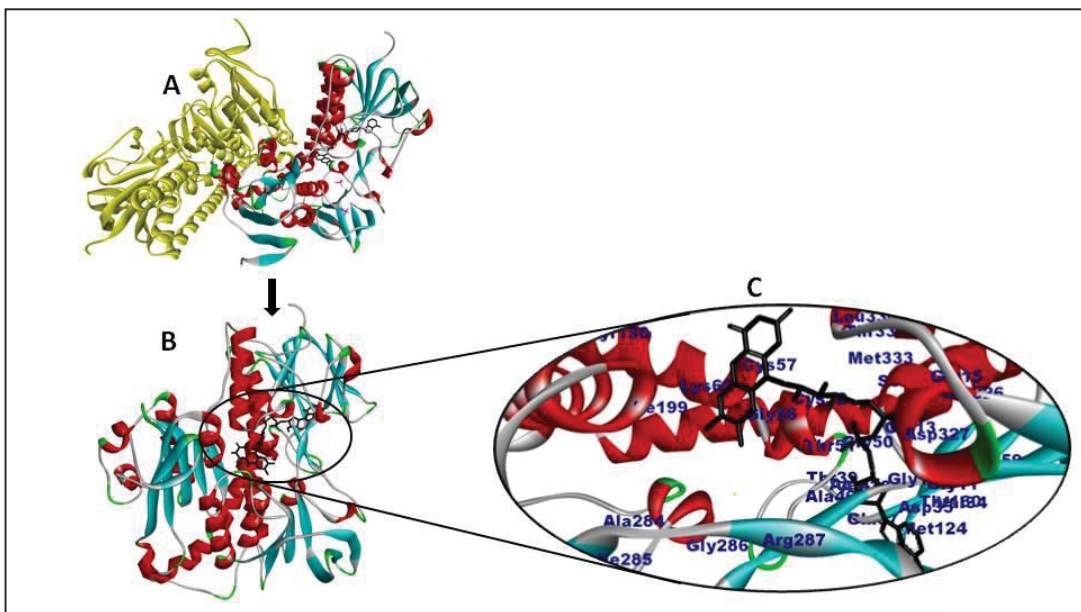
que não apresentaram nem ligações de *van der Waals* nem ligações de hidrogênio (MARY et al., 2021; MEYER; WILSON; SCHOMBURG, 1996).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SELECÇÃO E PREPARO DO ALVO MOLECULAR

Neste estudo a proteína TR da *Leishmania infantum* (PDB ID 2JK6), encontrava-se na sua forma dimérica (cadeia A e B), com um total de 511 resíduos de aminoácidos para cada cadeia (FIGURA 10A). O primeiro passo do preparo da TR foi o isolamento da sua forma monomérica (FIGURA 10B), e a seguir fez-se a: (I) remoção de todos os artefatos de cristalização (moléculas de água e os grupos sulfato); (II) adição dos hidrogênios polares e (III) finalmente adição das cargas de Kollman (FIGURA 10B). Após o preparo, procedeu-se com a identificação do sítio ativo da enzima e resíduos dos aminoácidos que o compõem. No sitio ativo da enzima, para além dos resíduos de aminoácidos, também pode ser visto a estrutura química do FAD, uma coenzima da TR (estrutura representada pela coloração preta) (FIGURA 10C). Assim, os ensaios *in silico* (triagem virtual e *docking* molecular) foram conduzidos objetivando identificar ligantes capazes de bloquear os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo da enzima.

FIGURA 10 – ESTRUTURA DA ENZIMA TR



LEGENDA: Em A, a proteína na sua forma dimérica. Em B, a forma monomérica e após a remoção dos artefatos de cristalização (moléculas de água, e grupos sulfatos), adição de hidrogênios polares, e adição das cargas de Kollman. Em C é a identificação dos resíduos de aminoácidos, que formam o sítio ativo da enzima.

FONTE: A autora (2022).



## 4.2 PRODUTOS NATURAIS

### 4.2.1 Triagem virtual e *docking* molecular

Os resultados da triagem virtual dos 8846 PNs são apresentados na TABELA 3. Destes, 61 foram identificados como tendo maior afinidade com a enzima TR. As afinidades de ligação são expressas como energias de ligação mais baixas obtidas em kcal/mol ( $\leq -9$  kcal/mol).

Os resultados da análise de *docking* molecular dos PNs são também mostradas na TABELA 3. A análise de *docking* obteve resultados semelhantes dos obtidos na triagem virtual, ou seja: dos 8846 PNs, 61 foram identificados como tendo maior afinidade (energia de afinidade  $\leq -9$  kcal/mol) com a TR. Os valores dos desvios-padrão relativo (DPR) das energias de *docking* molecular dos *softwares PyRx virtual screening tool, AutoDock tools e AutoDock Vina* foram menores que 3%, mostrando uma alta precisão dos resultados de *docking*.

TABELA 3 – RESULTADOS DE TRIAGEM VIRTUAL (OBTIDO POR PYRX) E DOCKING MOLECULAR (OBTIDO POR AUTODOCK TOOLS E AUTODOCK VINA) DA LIGAÇÃO ENTRE OS 61 PRINCIPAIS PNs E A ENZIMA TR

Molécula	ZINC ID	PyRx tools	AutoDock Tools	AutoDock Vina	DPR (%)
PN1	ZINC000001531664	-9,4	-9,2	-9,4	1,24
PN2	ZINC000001570586	-9,4	-9,4	-9,3	0,62
PN3	ZINC000001612996	-9,7	-9,8	-9,8	0,59
PN4	ZINC000003197535	-9,1	-9,3	-9,4	1,65
PN5	ZINC000003874886	-9,1	-9,3	-8,9	2,20
PN6	ZINC000003947456	-9,1	-9,2	-9,3	1,09
PN7	ZINC000003977927	-9,1	-9,2	-9,3	1,09
PN8	ZINC000003978083	-9,0	-9,2	-9,1	1,10
PN9	ZINC000003979028	-9,4	-9,2	-9,4	1,24
PN10	ZINC000003995616	-9,0	-8,8	-9,3	2,79
PN11	ZINC000003996035	-9,0	-9,2	-9,1	1,10
PN12	ZINC000004096650	-9,0	-9,1	-9,1	0,64
PN13	ZINC000004097705	-9,3	-9,2	-9,2	0,63
PN14	ZINC000004098868	-9,0	-9,2	-9,1	1,10
PN15	ZINC000006017975	-9,2	-9,1	-9,1	0,63
PN16	ZINC000006028400	-9,6	-9,6	-9,5	0,60
PN17	ZINC000008214665	-9,6	-9,6	-9,7	0,60
PN18	ZINC000008234189	-9,6	-9,5	-9,6	0,60
PN19	ZINC000014089767	-9,1	-9,1	-9,1	0,00
PN20	ZINC000017654900	-9,0	-9,1	-9,2	1,10

Molécula	ZINC ID	PyRx tools	AutoDock Tools	AutoDock Vina	DPR (%)
PN21	ZINC000019203128	-9,0	-9,2	-9,2	1,26
PN22	ZINC000021981222	-9,0	-8,9	-9,0	0,64
PN23	ZINC000026649450	-9,4	-9,2	-9,3	1,08
PN24	ZINC000030726863	-9,3	-9,2	-9,5	1,64
PN25	ZINC000030726947	-9,0	-8,9	-8,9	0,65
PN26	ZINC000034037250	-9,0	-9,2	-9,2	1,26
PN27	ZINC000042806008	-9,0	-9,2	-9,1	1,10
PN28	ZINC000042851784	-9,0	-8,9	-9,1	1,11
PN29	ZINC000044306907	-9,4	-9,3	-9,4	0,62
PN30	ZINC000071318051	-9,3	-9,2	-9,3	0,62
PN31	ZINC000073331412	-9,0	-9,0	-9,0	0,00
PN32	ZINC000085536958	-9,3	-9,2	-9,3	0,62
PN33	ZINC000085537053	-9,2	-9,1	-9,2	0,63
PN34	ZINC000094307036	-9,1	-9,2	-9,1	0,63
PN35	ZINC000095617641	-9,5	-9,4	-9,5	0,61
PN36	ZINC000096015174	-9,9	-9,9	-9,7	1,17
PN37	ZINC000096319491	-9,5	-9,4	-9,5	0,61
PN38	ZINC000100078482	-9,2	-9,2	-9,3	0,63
PN39	ZINC000100828831	-9,8	-9,8	-9,7	0,59
PN40	ZINC000140393484	-9,0	-8,9	-8,9	0,65
PN41	ZINC000169363256	-9,0	-9,1	-9,0	0,64
PN42	ZINC000206658454	-9,3	-9,2	-9,1	1,09
PN43	ZINC000247978460	-9,2	-9,1	-9,3	1,09
PN44	ZINC000248330745	-9,0	-9,2	-9,0	1,27
PN45	ZINC000248330746	-9,7	-9,6	-9,6	0,60
PN46	ZINC000253500761	-9,9	-9,8	-9,7	1,02
PN47	ZINC000253500763	-9,7	-9,7	-9,8	0,59
PN48	ZINC000253501027	-9,2	-9,2	-9,4	1,25
PN49	ZINC000253501034	-9,4	-9,7	-9,5	1,60
PN50	ZINC000253527861	-9,5	-9,5	-9,5	0,00
PN51	ZINC000253527863	-9,4	-9,3	-9,4	0,62
PN52	ZINC000253599728	-9,7	-9,6	-9,4	1,60
PN53	ZINC000253611308	-9,1	-9,2	-9,0	1,10
PN54	ZINC000253611310	-9,1	-9,0	-9,2	1,10
PN55	ZINC000253624624	-9,0	-9,1	-9,3	1,67
PN56	ZINC000256418857	-9,2	-9,2	-9,1	0,63
PN57	ZINC000257434589	-9,2	-9,3	-9,3	0,62
PN58	ZINC000257480108	-9,1	-9,3	-9,2	1,09
PN59	ZINC000257511790	-9,4	-9,2	-9,0	2,17
PN60	ZINC000257561965	-9,4	-9,2	-9,3	1,08
PN61	ZINC000257561966	-9,4	-9,4	-9,3	0,62

LEGENDA: DPR: Desvio padrão relativo; PN: Produto natural.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.2 Machine learning

Os valores medianos dos descritores usados para a construção dos modelos de ML para a classificação dos PNs de baixa e de alta afinidade com a TR são mostradas na tabela abaixo (TABELA 4). Os valores de  $p$  menores que 0,05 indicam que há uma diferença entre os descritores dos PN de baixa e alta afinidade com a TR.

TABELA 4 – DESCRITORES UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE ML (PNs)

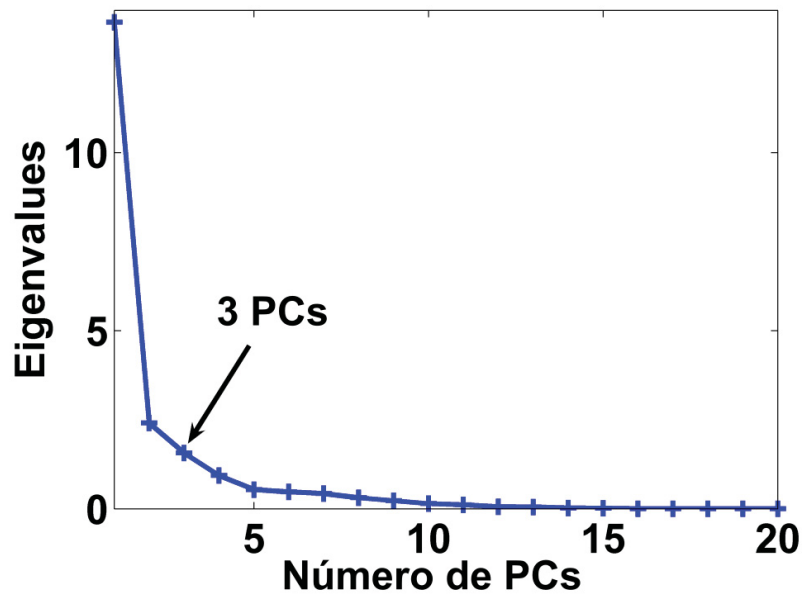
Descritor	PN com alta afinidade com a TR (n=61)			PN com baixa afinidade com a TR (n=61)			p-valor*
	Mediana	IQ1	IQ3	Mediana	IQ1	IQ3	
<b>Propriedades físico-químicas</b>	---	---	---	---	---	---	---
PM	524,1000	465,0300	608,7200	104,1000	88,0850	124,1850	<0,001
NAP	38,0000	34,0000	45,0000	7,0000	6,0000	8,0000	<0,001
NAPA	6,0000	0,0000	22,5000	0,0000	0,0000	5,0000	<0,001
C sp <sup>3</sup>	0,6350	0,3500	0,8775	0,7500	0,4000	0,8300	<0,001
NLR	3,5000	1,2500	7,0000	2,0000	1,0000	3,0000	<0,001
NHA	7,0000	4,0000	8,0000	2,0000	1,0000	2,0000	<0,001
NHD	2,0000	1,0000	3,7500	1,0000	0,0000	1,0000	<0,001
RM	148,6900	133,0600	181,6100	27,4300	23,0050	34,1300	<0,001
TPSA	95,2050	62,2950	136,2375	40,4600	26,3000	57,5300	<0,001
<b>Lipossolubilidade</b>	---	---	---	---	---	---	---
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	3,9850	3,4175	4,6775	1,3600	0,7800	1,7250	<0,001
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	5,2550	3,2700	6,3400	0,3200	-0,5800	1,2050	<0,001
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	4,8350	2,8800	5,7400	0,4800	-0,3000	1,2050	<0,001
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2,7500	1,6700	4,7575	0,3000	-0,5950	0,8900	<0,001
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	4,9950	3,4000	5,9075	0,5700	-0,5400	1,1500	<0,001
Log $P_{o/w}$ consensual	4,3350	3,0200	5,2075	0,4700	-0,1600	1,1750	<0,001
<b>Hidrossolubilidade</b>	---	---	---	---	---	---	---
Log S (ESOL)	-6,2400	-7,4300	-5,1975	-0,7100	-1,3300	0,0400	<0,001
Solubilidade 1	0,0003	0,0000	0,0036	18,7000	5,2700	93,4000	<0,001
Log S (Ali)	-7,1450	-8,0600	-5,8775	-0,6500	-1,6700	0,2000	<0,001
Solubilidade 2	0,0000	0,0000	0,0007	24,0000	2,6950	179,0000	<0,001
Log S (SILICOS-IT)	-6,4050	-9,2800	-4,7925	-0,9500	-1,4700	0,2700	<0,001
Solubilidade 3	0,0002	0,0000	0,0067	12,2000	3,9000	206,0000	<0,001

LEGENDA: \*Teste de *Mann Whitney*. C sp<sup>3</sup>: Carbono de hibridização sp<sup>3</sup>; IQ: Interquartil; NAP: Número de átomos pesados; NAPA: Número de átomos pesados em anel aromático; NHA: Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio; NHD: Número de hidrogênio doadores de ligação de hidrogênio; NLR: Número de ligações rotacionáveis; PM: Peso molecular; PN: Produto natural; RM: Refratividade molar; TPSA: Área de superfície polar topológica; TR: Tripanotona redutase. FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.2.1 Análise exploratória

A análise exploratória foi conduzida usando o modelo PCA. Para a construção do modelo, diferentes métodos de pré-processamento foram testados, sendo que a combinação *auto escale* + GLSW com  $\alpha=0,02$  foi a que melhor se ajustou aos dados. O segundo passo foi a escolha de número de componentes principais (PCs, do inglês *principal components*) usando o critério de *eigenvalue*. Neste critério, os números de PCs selecionados correspondem aqueles nos quais não se verifica a variação significativa de *eigenvalue*. Sendo assim, três PCs foram selecionadas (FIGURA 11), correspondendo a um total de 80,54% da variância acumulada (TABELA 5).

FIGURA 11 – PCS DE ACORDO COM O CRITÉRIO DE *EIGENVALUE* (PNs)



LEGENDA: PC: Componente principal.

FONTE: A autora (2022).

TABELA 5 – VARIÂNCIA ACUMULADA (PNS)

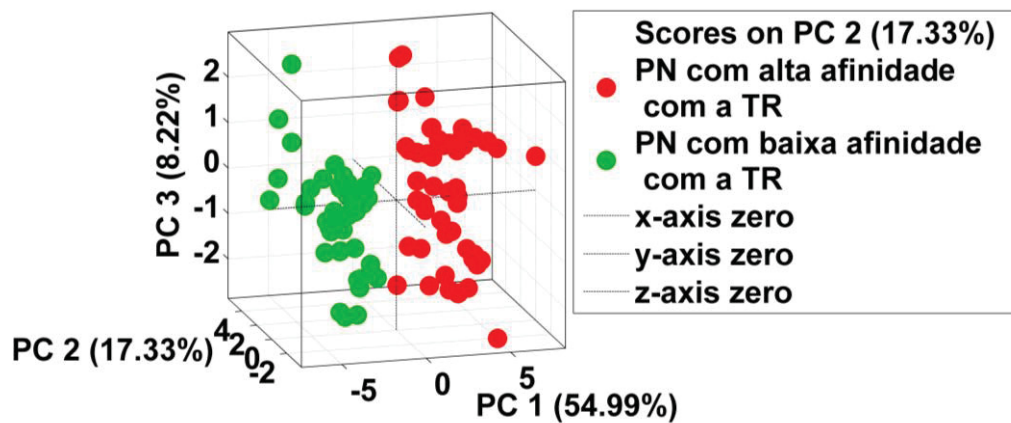
PC	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	54,99	-
2	17,33	-
3	8,22	80,54

LEGENDA: PC: Componente principal.

FONTE: A autora (2022).

Após a escolha do número de PCs, o terceiro passo foi a construção do gráfico de escores dos dois PCs selecionados. Pelo gráfico de escores, o modelo conseguiu discriminar amostras (PNs) de maior e de menor afinidade com a TR. Todas as amostras (ligantes) estão dentro do intervalo de confiança de 95%, mostrando que não foram detectados *outliers* (FIGURA 12).

FIGURA 12 – MODELO PCA (PNs)

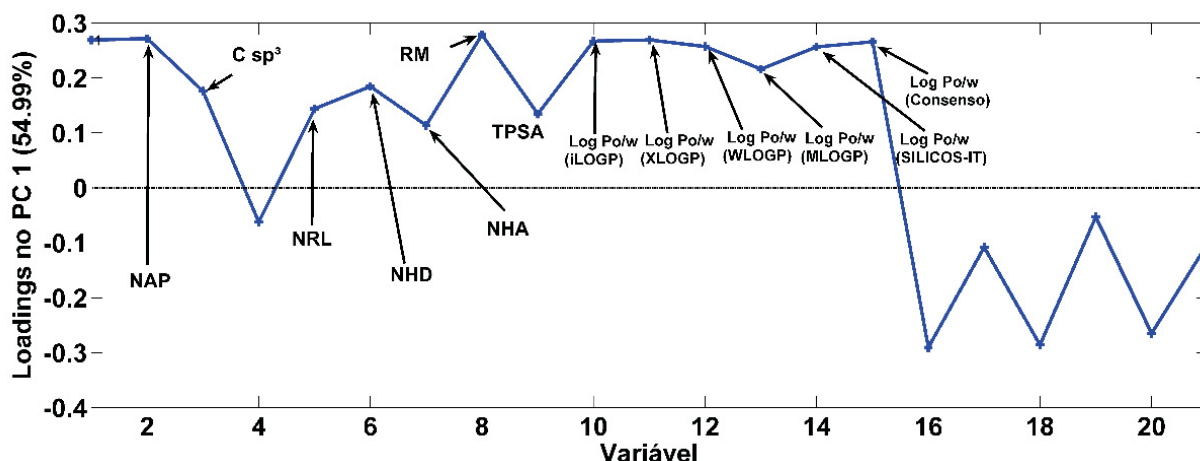


LEGENDA: PC: Componente principal; PN: Produto natural; TR: Tripanotiona reductase.

FONTE: A autora (2022).

Uma vez construído o gráfico de escores, o último passo foi a construção do gráfico de *loading*. O gráfico de *loading* indica quais foram as variáveis responsáveis pela separação entre os ligantes (PNs) de maior e de menor afinidade com a TR. Como a PC 1 foi a que capturou maior variância explicada (PC 1 54,99%), o *loading* foi construído considerando apenas a PC 1.

Do gráfico de *loading*, se pode verificar as variáveis mais importantes na discriminação entre os PN de maior e de menor afinidade com a TR. As variáveis que se encontram acima da linha tracejada são as que contribuem positivamente na discriminação (FIGURA 13).

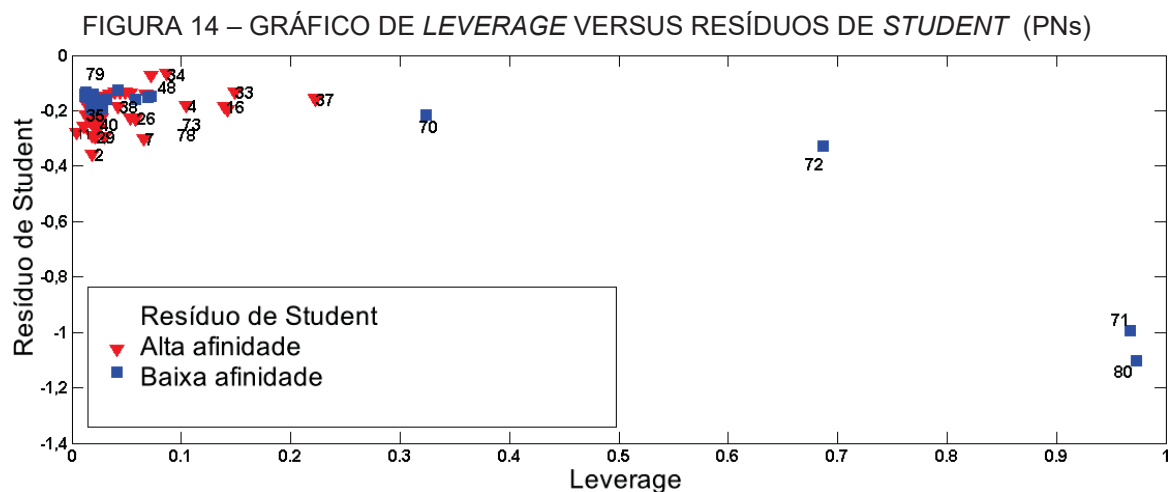
FIGURA 13 – GRÁFICO DE *LOADING* (PNs)

LEGENDA: C sp<sup>3</sup>: Carbono com hibridização sp<sup>3</sup>; NAP: Número de átomos pesados; NHA: Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio; NHD: Número de hidrogênios doadores de ligação de hidrogênio; NRL: Número de ligações rotacionáveis; RM: Refratividade molar; TPSA: Área de superfície polar topológica.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.2.2 Detecção supervisionada de *outlier*

O primeiro passo para a construção dos modelos de ML de classificação de fármacos de alta e de baixa afinidade com a TR foi a detecção de *outliers* (amostras anômalas) pelo gráfico de *Leverage versus Resíduos de Student* (FIGURA 14). Uma amostra é considerada *outlier* apenas se apresentar simultaneamente altos valores de Resíduos de Student e de *Leverage*. Sendo assim, as amostras (PNs) número 71, 72 e 78, embora tenham apresentado altos valores de *Leverage*, não são *outliers* porque estão dentro do intervalo de resíduos de Student ( $\pm 2.5$  desvios-padrão) tolerado.



FONTE: A autora (2022)

#### 4.2.2.3 Modelos de *machine learning*

Após a avaliação de *outliers*, o próximo passo foi a construção dos modelos de ML para classificação dos produtos naturais de alta e de baixa afinidade com a enzima TR: ANN, XGBoost, KNN, SIMCA, PLS-DA, LREG e SVM. Na TABELA 6 são mostrados os desempenhos de todos modelos de ML dos compostos de alta afinidade (n=61) e de baixa afinidade (n=61). O modelo PLS-DA foi o que teve maior desempenho preditivo (maior sensibilidade, especificidade, acurácia e área sobre a curva (ASC) ROC) (TABELA 6).

TABELA 6 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODELOS DE ML (NPs)

Classe	Modelo	VP	FN	VN	FP	SEN (%)	ESP (%)	ACU (%)	ASC ROC (%)
PN com alta afinidade com a TR	ANN	43	18	40	21	70	66	68	68
	XGBoost	49	12	47	14	80	77	79	79
	KNN	51	10	46	15	84	75	80	80
	PLS-DA	61	0	60	1	100	98	99	99
	SIMCA	55	6	53	8	90	87	89	89
	LREG	44	17	39	22	72	64	68	68
	SVM	39	22	42	19	64	69	66	66
PN com baixa afinidade com a TR	ANN	44	17	50	11	72	82	77	77
	XGBoost	37	24	42	19	61	69	65	65
	KNN	48	13	45	16	79	74	76	76
	PLS-DA	60	1	61	0	98	00	99	99
	SIMCA	50	11	48	13	82	79	80	80
	LREG	49	12	45	16	80	74	77	77
	SVM	41	20	44	17	67	72	70	70

LEGENDA: ACU: Acurácia; ANN: Redes neurais artificiais; ASC: Área sob a curva; ESP: Especificidade; FN: Falso negativo; FP: Falso positivo; KNN: K-vizinhos mais próximos; LREG: Regressão logística; PLS-DA: Análise discriminante por mínimos quadrados parciais; ROC: Receiver operating characteristic; SEN: Sensibilidade; SIMCA: Modelagem independente e flexível por analogia de classe; SVM: Máquina de vetores de suporte. VN: Verdadeiro negativo; VP: Verdadeiro positivo; XGBoost: *eXtreme gradiente boosting*.

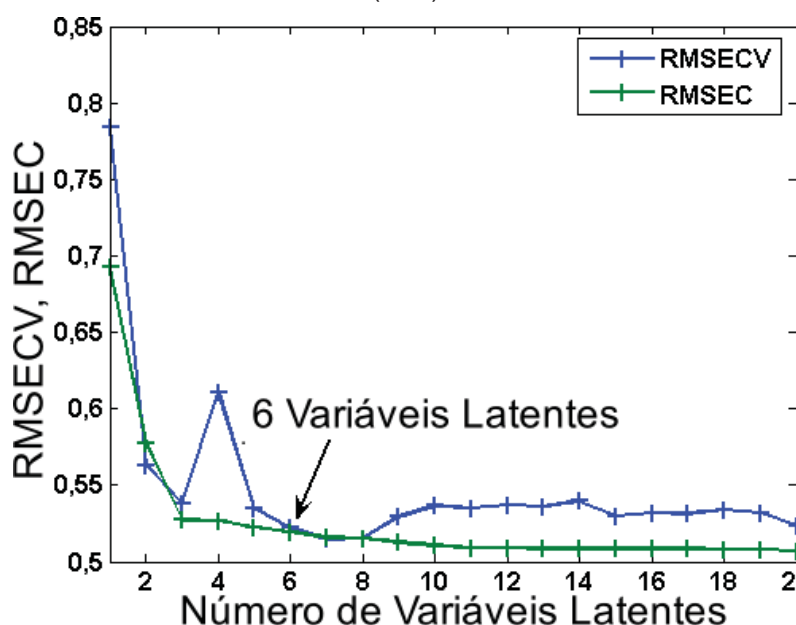
FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.2.4 Modelo de análise discriminante por mínimos quadrados parciais

Considerando que o modelo PLS-DA foi o que apresentou maior desempenho preditivo, a seguir são apresentados os detalhes do modelo. Para a construção deste, 70% dos ligantes de ambas as classes dos PNs (maior e de menor afinidade com a TR) foram usadas para a calibração, usando a validação cruzada do tipo *leave-one-*

out. O número de variáveis latentes selecionados para a calibração foi escolhido de acordo com o RMSEC e RMSECV. Assim o modelo PLS-DA otimizado foi constituído por 6 variáveis latentes. O vetor  $x$  foi pré-processado pelo método *mean center*, ao passo que para o vetor  $y$  nenhum tipo de pré-processamento foi aplicado. O gráfico de RMSEC e RMSECV *versus* número de variáveis latentes pode ser observado na FIGURA 15.

FIGURA 15 – GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (PNs)



LEGENDA: RMSEC: Raiz quadrada de erro médio de calibração; RMSECV: Raiz quadrada de erro médio de validação cruzada.

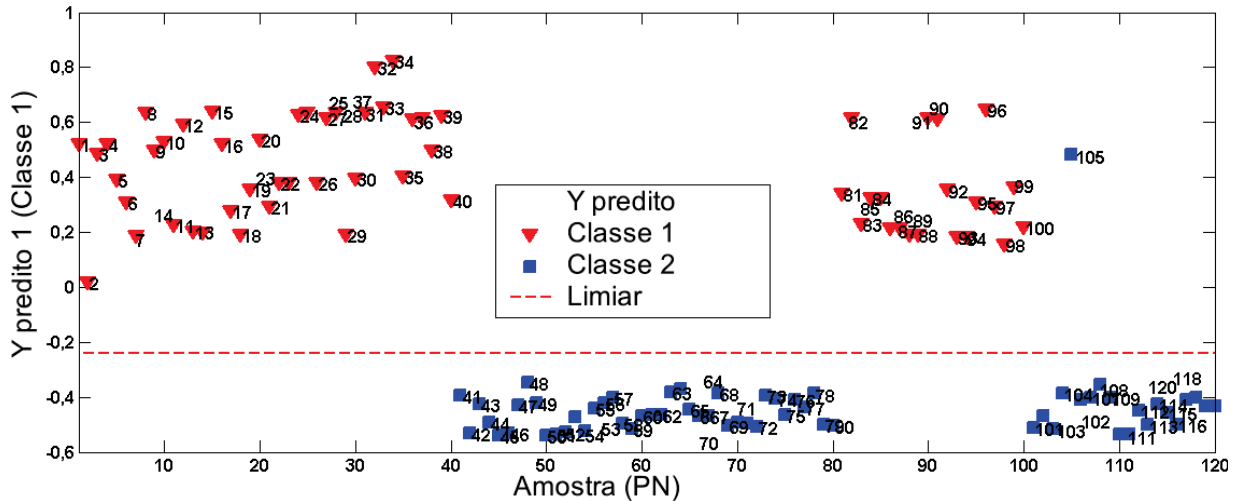
FONTE: A autora (2022)

Os resultados dos dois modelos de PLS-DA com seis variáveis latentes para classificação dos PNs de maior e de menor afinidade com a TR são mostrados nas FIGURAS 16 e 17 através do gráfico de amostras *versus*  $y$  previsto. O limiar calculado é mostrado na linha vermelha tracejada horizontal. As amostras de interesse que estão sendo classificadas são aquelas que se localizam acima do limiar. Assim, nos modelos PLS-DA para classificação dos PNs de alta afinidade e de baixa afinidade com a TR, os limiares calculados foram aproximadamente de -2.2 e de 2.2, respectivamente. O modelo PLS-DA de classificação dos compostos de alta afinidade (FIGURA 16) conseguiu classificar corretamente todos os PNs de maior afinidade com a TR, e uma amostra foi considerada como falsa positiva (ligante 105) representando



uma sensibilidade, especificidade, acurácia e ASC ROC de 100%, 98%, 99% e 99%, respectivamente, como observado acima na TABELA 6.

FIGURA 16 – MODELO PLS-DA COM 6 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS PNs DE ALTA AFINIDADE)

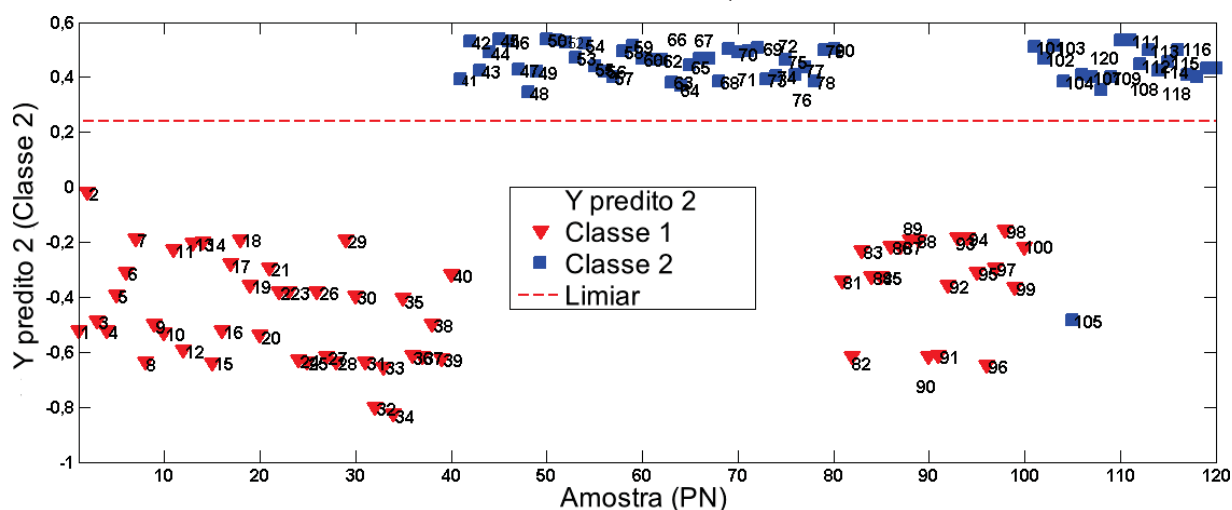


LEGENDA: As Classe 1 e 2, representam os compostos de alta e de baixa afinidade, respectivamente. Todos produtos naturais de alta afinidade foram corretamente classificados. PN: Produto natural.

FONTE: A autora (2022)

No modelo PLS-DA para classificação dos compostos de baixa afinidade (FIGURA 17) com a TR apenas uma amostra foi erradamente classificada como falsa negativa (ligante 105), e os valores da sensibilidade, especificidade, acurácia e ASC ROC de 98%, 100%, 99% e 99%, respectivamente.

FIGURA 17 – MODELO PLS-DA COM 6 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS PNs DE BAIXA AFINIDADE)



LEGENDA: As Classe 1 e 2, representam os compostos de alta e de baixa afinidade, respectivamente. Apenas um PN (ligante 105) de baixa afinidade foi erradamente classificado. PN: Produto natural.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.3 Drug-likeness

Os resultados das análises de *drug-likeness* dos 61 PNs que mostraram maior afinidade com a TR são mostrados na TABELA 7. O consenso entre as regras de Lipinski e Veber (LIPINSKI et al., 2001; VEBER et al., 2002) foi utilizado para definir uma molécula como tendo características fármaco-similares. Assim, dos 61 PNs, 31 (51%) apresentaram *drug-likeness*, e os restantes 30 PNs não foram considerados nas análises subsequentes.

TABELA 7 – ANÁLISE DE *DRUG-LIKENESS* DOS 61 PRINCIPAIS PNs QUE TIVERAM MELHOR AFINIDADE DE LIGAÇÃO COM A ENZIMA TR

PN	Regra de Lipinski				Regra de Veber				Consenso	
	PM<500 (g/mol)	NHD ≤5	NHA ≤10	Log P≤5	Drug-likeness	NLR ≤10	TPSA ≤140	NHD+ NHA ≤12		Drug-likeness
PN1	566,518	4	10	5,740	Não (50%)	5	159,80	14	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN2	346,294	2	6	2,409	Sim (100%)	1	108,74	8	Sim (100%)	Sim
PN3	586,689	1	9	4,091	Sim (75%)	6	114,20	10	Sim (100%)	Sim
PN4	566,518	4	10	5,740	Não (50%)	5	159,80	14	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN5	516,546	5	8	5,397	Não (50%)	6	144,52	13	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN6	456,711	2	2	7,090	Sim (75%)	1	57,53	4	Sim (100%)	Sim
PN7	517,564	3	7	-0,240	Sim (75%)	9	156,43	10	Não (66.67%)	<b>Não</b>
PN8	609,743	2	7	6,701	Não (50%)	2	80,62	9	Sim (100%)	<b>Não</b>

PN	Regra de Lipinski					Regra de Veber				Consenso
	PM<500 (g/mol)	NHD ≤5	NHA ≤10	Log P≤5	<i>Drug- likeness</i>	NLR ≤10	TPSA ≤140	NHD+ NHA ≤12	<i>Drug- likeness</i>	
PN9	552,491	5	10	5,437	Não (50%)	4	170,80	15	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN10	611,743	3	6	2,717	Sim (75%)	6	118,21	9	Sim (100%)	Sim
PN11	435,564	3	4	3,957	Sim (100%)	1	82,55	7	Sim (100%)	Sim
PN12	596,724	3	8	6,156	Não (50%)	8	94,86	11	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN13	466,442	4	9	3,392	Sim (100%)	4	134,91	13	Não (66.67%)	<b>Não</b>
PN14	411,630	2	3	5,002	Sim (75%)	0	41,49	5	Sim (100%)	Sim
PN15	624,778	1	8	6,762	Não (50%)	10	72,86	9	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN16	64,568	2	2	8,450	Sim (75%)	5	48,91	4	Sim (100%)	Sim
PN17	530,658	4	8	3,014	Sim (75%)	3	129,59	12	Sim (100%)	Sim
PN18	470,606	2	6	3,353	Sim (100%)	3	96,36	8	Sim (100%)	Sim
PN19	512,731	1	4	6,839	Não (50%)	3	80,67	5	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN20	623,795	3	7	3,067	Sim (75%)	12	138,84	10	Não (66.67%)	<b>Não</b>
PN21	470,694	2	3	6,413	Sim (75%)	1	74,60	5	Sim (100%)	Sim
PN22	479,588	3	7	4,248	Sim (100%)	8	95,07	10	Sim (100%)	Sim
PN23	501,667	2	4	5,786	Não (50%)	2	71,55	6	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN24	606,719	0	8	6,874	Não (50%)	2	61,86	8	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN25	608,735	1	8	6,859	Não (50%)	3	72,86	9	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN26	468,766	0	2	8,884	Sim (75%)	2	26,30	2	Sim (100%)	Sim
PN27	610,751	2	8	6,459	Não (50%)	9	83,86	10	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN28	608,735	1	8	6,859	Não (50%)	3	72,86	9	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN29	470,606	2	6	3,495	Sim (100%)	2	96,36	8	Sim (100%)	Sim
PN30	560,643	2	7	5,513	Não (50%)	5	119,36	9	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN31	608,735	1	8	6,859	Não (50%)	3	72,86	9	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN32	778,947	2	11	4,754	Não (50%)	10	133,87	13	Não (66.67%)	<b>Não</b>
PN33	807,890	5	14	3,260	Não (50%)	14	224,45	19	Não (0%)	<b>Não</b>
PN34	808,973	2	12	4,007	Não (50%)	10	146,40	14	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN35	511,630	3	8	4,130	Sim (75%)	8	96,86	11	Sim (100%)	Sim
PN36	822,942	8	13	2,246	Não (25%)	7	267,04	21	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN37	822,942	8	13	2,246	Não (25%)	7	267,04	21	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN38	534,660	3	4	7,214	Não (50%)	5	111,73	7	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN39	606,586	4	8	6,160	Não (50%)	2	133,52	12	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN40	484,721	1	4	6,501	Sim (75%)	2	63,60	5	Sim (100%)	Sim
PN41	600,709	3	9	2,460	Sim (75%)	8	147,16	12	Não (66.67%)	<b>Não</b>
PN42	610,751	2	8	6,459	Não (50%)	9	83,86	10	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN43	532,586	1	10	2,955	Sim (75%)	4	118,98	11	Sim (100%)	Sim
PN44	426,729	1	1	8,169	Sim (75%)	0	20,23	2	Sim (100%)	Sim
PN45	426,729	1	1	8,169	Sim (75%)	0	20,23	2	Sim (100%)	Sim
PN46	413,646	2	3	5,287	Sim (75%)	0	41,49	5	Sim (100%)	Sim
PN47	413,646	2	3	5,287	Sim (75%)	0	41,49	5	Sim (100%)	Sim
PN48	432,645	2	4	4,765	Sim (100%)	0	58,92	6	Sim (100%)	Sim
PN49	432,645	2	4	4,765	Sim (100%)	0	58,92	6	Sim (100%)	Sim
PN50	822,942	8	13	2,246	Não (25%)	7	267,04	21	Não (33.33%)	<b>Não</b>
PN51	822,942	8	13	2,246	Não (25%)	7	267,04	21	Não (33.33%)	<b>Não</b>

PN	PM<500 (g/mol)	Regra de Lipinski				Regra de Veber				Consenso
		NHD ≤5	NHA ≤10	Log P≤5	<i>Drug- likeness</i>	NLR ≤10	TPSA ≤140	NHD+ NHA ≤12	<i>Drug- likeness</i>	
PN52	578,787	4	8	3,618	Sim (75%)	3	117,84	12	Sim (100%)	Sim
PN53	496,641	5	7	2,303	Sim (100%)	4	136,68	12	Sim (100%)	Sim
PN54	496,641	5	7	2,303	Sim (100%)	4	136,68	12	Sim (100%)	Sim
PN55	460,743	2	3	6,741	Sim (75%)	1	49,69	5	Sim (100%)	Sim
PN56	604,916	1	4	10,393	Não (50%)	9	55,76	5	Sim (100%)	<b>Não</b>
PN57	454,695	1	3	6,684	Sim (75%)	0	46,53	4	Sim (100%)	Sim
PN58	454,519	0	7	3,925	Sim (100%)	1	95,34	7	Sim (100%)	Sim
PN59	498,748	1	3	7,660	Sim (75%)	3	63,60	4	Sim (100%)	Sim
PN60	413,646	1	3	5,575	Sim (75%)	0	38,33	4	Sim (100%)	Sim
PN61	413,646	1	3	5,575	Sim (75%)	0	38,33	4	Sim (100%)	Sim

LEGENDA: NHA: Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio; NHD: Número de hidrogênio doadores de ligação de hidrogênio; NLR: Número de ligações rotacionáveis; PM: Peso molecular; PN: Produto natural; TPSA: Área de superfície polar topológica.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.4 Propriedades ADMET

Dos 31 compostos que apresentaram características de *drug-likeness*, 19 foram excluídos na etapa da análise farmacocinética. Assim, os produtos naturais PN3, PN14, PN16, PN17, PN26, PN40, PN44, PN45, PN57, PN58, PN60, PN61 foram excluídos devido à alta probabilidade de ter biodisponibilidade <20%. Já os compostos PN11, PN18, PN22, PN29 e PN35 foram excluídos devido a sua alta probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica. O composto PN10 foi excluído por mostrar maior probabilidade de inibir a CYP2C9 e a CYP3A4. O composto PN2 foi excluído por ter maior probabilidade de inibir a CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e a CYP3A4.

Os resultados da análise farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) dos 12 PNs restantes que simultaneamente mostraram maior afinidade com a TR e apresentaram características de *drug-likeness* são resumidos na TABELA 8.

TABELA 8 – ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DOS 12 PNs LÍDERES

Etapa da farmacocinética	Parâmetro	PN6	PN21	PN43	PN46	PN47	PN48
Absorção	Permeabilidade Caco-2	-5,169	-5,498	-5,038	-4,851	-4,899	-4,809
	Permeabilidade MDCK	$9,7 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}$
	Inibidor Pgp	--	-	+++	---	---	++
	Substrato Pgp	---	---	--	+	++	+++
	HIA	---	---	---	---	---	---
	Biodisponibilidade 20%	-	---	--	+	+	---
	Biodisponibilidade 30%	++	+++	+	++	++	+
Distribuição	LPP	96,805%	91,564%	75,220%	94,308%	95,954%	95,121%
	VD	0,642	0,671	1,657	1,276	1,130	1,312
	Penetração BHE	+	--	++	--	---	---
	FL	2,199%	7,613%	14,367%	2,416%	1,958%	2,815%
Metabolismo	Inibidor CYP1A2	---	---	---	---	---	---
	Substrato CYP1A2	-	++	+++	-	-	+
	Inibidor CYP2C19	---	---	---	--	--	---
	Substrato CYP2C19	++	++	++	+++	+++	++
	Inibidor CYP2C9	--	--	---	--	--	--
	Substrato CYP2C9	--	---	---	---	---	---
	Inibidor CYP2D6	---	---	---	---	---	---
	Substrato CYP2D6	---	---	--	++	++	--
	Inibidor CYP3A4	-	-	-	++	+	+
Substrato CYP3A4	-	+	++	-	+	-	
Excreção	CL	3,916	2,517	12,462	11,815	10,282	9,892
	T <sub>1/2</sub>	0,064	0,079	0,462	0,241	0,275	0,337
		PN49	PN52	PN53	PN54	PN55	PN59
Absorção	Permeabilidade Caco-2	-4,797	-4,890	-5,671	-5,625	-4,902	-5,241
	Permeabilidade MDCK	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$
	Inibidor Pgp	+++	+++	++	+++	++	---
	Substrato Pgp	+++	++	-	+	---	---
	HIA	---	---	-	++	---	---
	Biodisponibilidade 20%	---	---	---	---	--	---
	Biodisponibilidade 30%	---	--	--	--	+	++
Distribuição	LPP	91,529%	93,686%	92,202%	91,261%	94,393%	97,380%
	VD	1,116	0,656	0,492	0,473	1,033	0,726
	Penetração BHE	--	---	---	---	---	---
	FL	4,140%	2,410%	4,503%	5,585%	2,802%	1,905%
Metabolismo	Inibidor CYP1A2	---	---	---	---	---	---
	Substrato CYP1A2	+	+	--	--	-	--
	Inibidor CYP2C19	---	---	---	---	---	---
	Substrato CYP2C19	++	-	+	+	+++	++
	Inibidor CYP2C9	--	---	---	---	--	--
	Substrato CYP2C9	---	---	++	+	-	-
	Inibidor CYP2D6	---	---	---	---	---	---
	Substrato CYP2D6	--	--	--	--	++	--
	Inibidor CYP3A4	+	--	---	---	--	--
Substrato CYP3A4	--	--	---	---	-	+	
Excreção	CL	14,537	3,063	0,794	0,835	6,967	2,482

Etapa da farmacocinética	Parâmetro	PN6	PN21	PN43	PN46	PN47	PN48
	T <sub>1/2</sub>	0,171	0,388	0,759	0,760	0,160	0,111

LEGENDA: AIH: Absorção intestinal humana; BHE: Barreira hematoencefálica; Caco-2: Células de adenocarcinoma colorretal humano; CL: *Clearence* renal; FL: Fração livre no plasma; LPP: Ligação a proteínas plasmáticas; MDCK: Células renais caninas Madin-Darby; Pgp: Glicoproteína P; PN: Produtos naturais; T<sub>1/2</sub>: Tempo de meia-vida; VD: Volume de distribuição.

FONTE: A autora (2022)

#### 4.2.5 Toxicidade

As predições de toxicidade dos 12 PNs que mostraram melhores resultados farmacocinéticos são mostrados na TABELA 9.

Os compostos PN6 e PN21 mostraram maior probabilidade de produzir hepatotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade via nrf2/ARE e HSE. O composto PN52 mostrou maior probabilidade de produzir citotoxicidade, toxicidade pelas vias de sinalização nuclear ER e ER-LBD, toxicidade pelas vias de sinalização de resposta ao estresse MMP e ATAD5. Os produtos naturais PN43, PN46 e PN55 tiveram respectivamente os valores de LD<sub>50</sub> de 28 mg/kg, 28 mg/kg e 210 mg/kg, mostrando que possuem maior probabilidade de produzir toxicidade aguda.

Assim, os produtos naturais PN43, PN53, PN54 e PN59 foram os que mostraram resultados promissores de toxicidade.

TABELA 9 – PREDIÇÃO DE TOXICIDADE DOS 12 PNs LÍDERES

Molécula	PN6	PN21	PN43	PN46	PN47	PN48	PN49	PN52	PN53	PN54	PN55	PN59
<b>LD50 (mg/kg)</b>	2.000	560	3.000	28	28	2.600	2.600	23.000	18.160	18.160	210	5.000
<b>Órgão-específica</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatotoxicidade	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
Toxicidade cardíaca	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>End-point</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcinogenicidade	<b>Ativo</b>	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
Mutagenicidade	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
Citotoxicidade	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
AHR	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>Via de sinalização nuclear</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AR	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
AR-LBD	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
Aromatase	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
ER	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
ER-LBD	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

Molécula	PN6	PN21	PN43	PN46	PN47	PN48	PN49	PN52	PN53	PN54	PN55	PN59
PPAR-Gamma	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
nrf2/ARE	<b>Ativo</b>	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>Via de sinalização de resposta ao estresse</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSE	<b>Ativo</b>	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
MMP	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
p53	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
ATAD5	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	<b>Ativo</b>	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

LEGENDA: AHR: receptor de hidrocarboneto arílico; AR: Receptor de andrógeno; AR-LBD: Domínio de ligação ao ligante de receptor de andrógeno; ATAD5: Proteína 5 contendo domínio da família das ATPase AAA; ER: Receptor de estrogênio  $\alpha$ ; ER-LBD: Domínio de ligação ao ligante do receptor de estrogênio; HSE: Elemento de resposta do fator de choque térmico; LD50: Dose letal mediana; MMP: Potencial de membrana mitocondrial; Nrf2/ARE: Elemento de resposta antioxidante eritroide 2 relacionado ao fator 2; PPAR- $\gamma$ : Receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissoma.

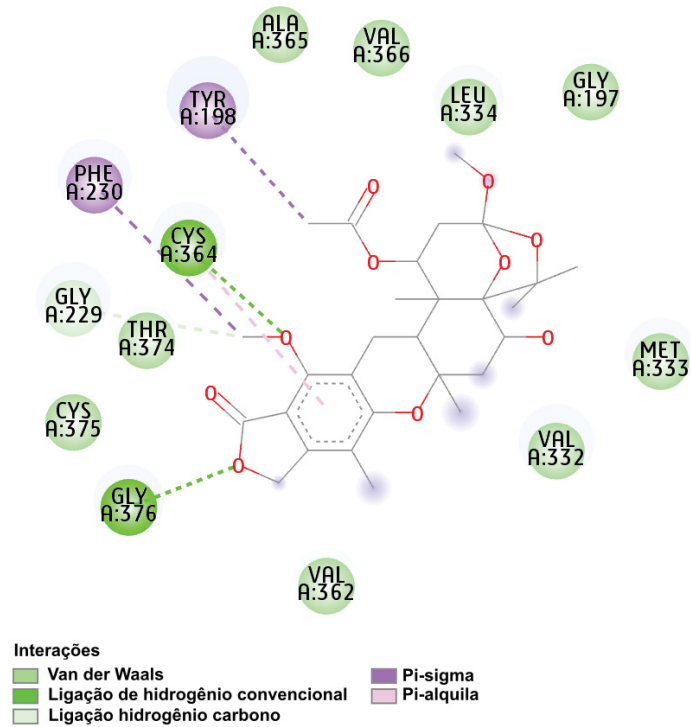
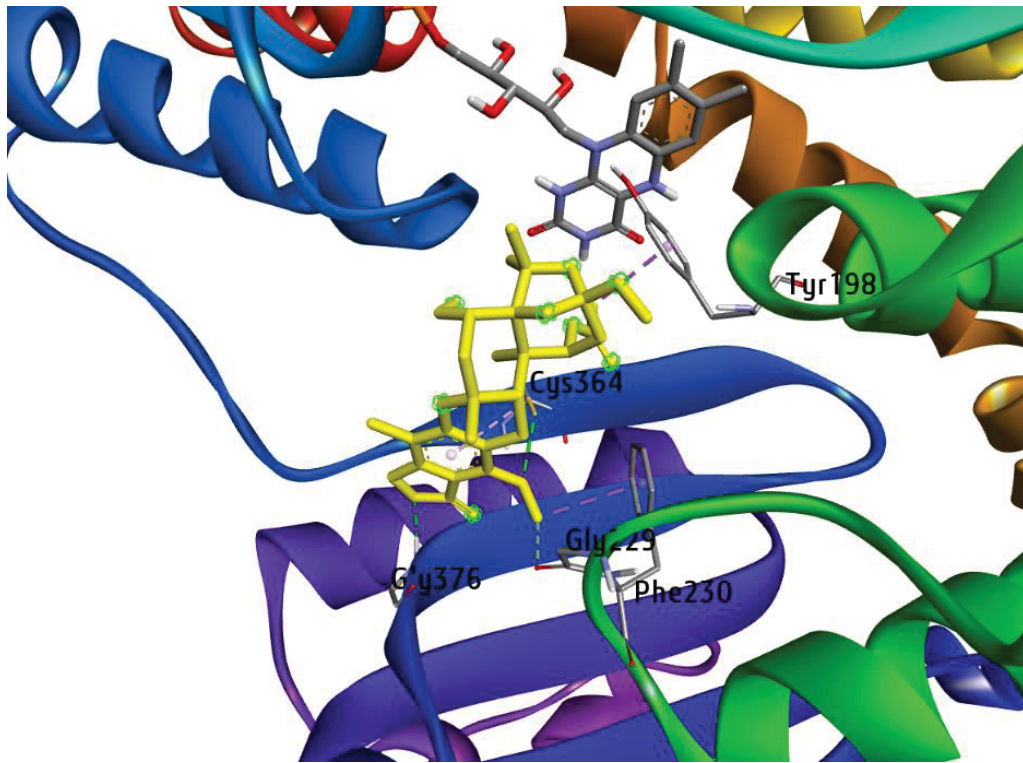
FONTE: A autora (2022).

#### 4.2.6 Análise da qualidade das interações

Dentre os 4 PNs que tiveram bons resultados de toxicidade, o composto PN54 foi excluído por apresentar ligações desfavoráveis (ligações covalentes) na interação com o alvo molecular (visto que moléculas que fazem ligações covalentes com o alvo podem gerar mais reações adversas por não haver garantia da sua seletividade) (LIMA, 2020). Assim, os produtos naturais PN43, PN53 e PN59 foram os compostos-líderes, bons candidatos a avançar para os ensaios pré-clínicos para o tratamento da leishmaniose. Seus resultados do *docking* molecular em 3D e diagramas 2D — identificando os aminoácidos envolvidos na ligação entre os ligantes e a macromolécula e os tipos de ligação — são apresentados nas figuras a seguir (FIGURA 18, 19 e 20).



FIGURA 18 – DOCKING MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DO PN43.

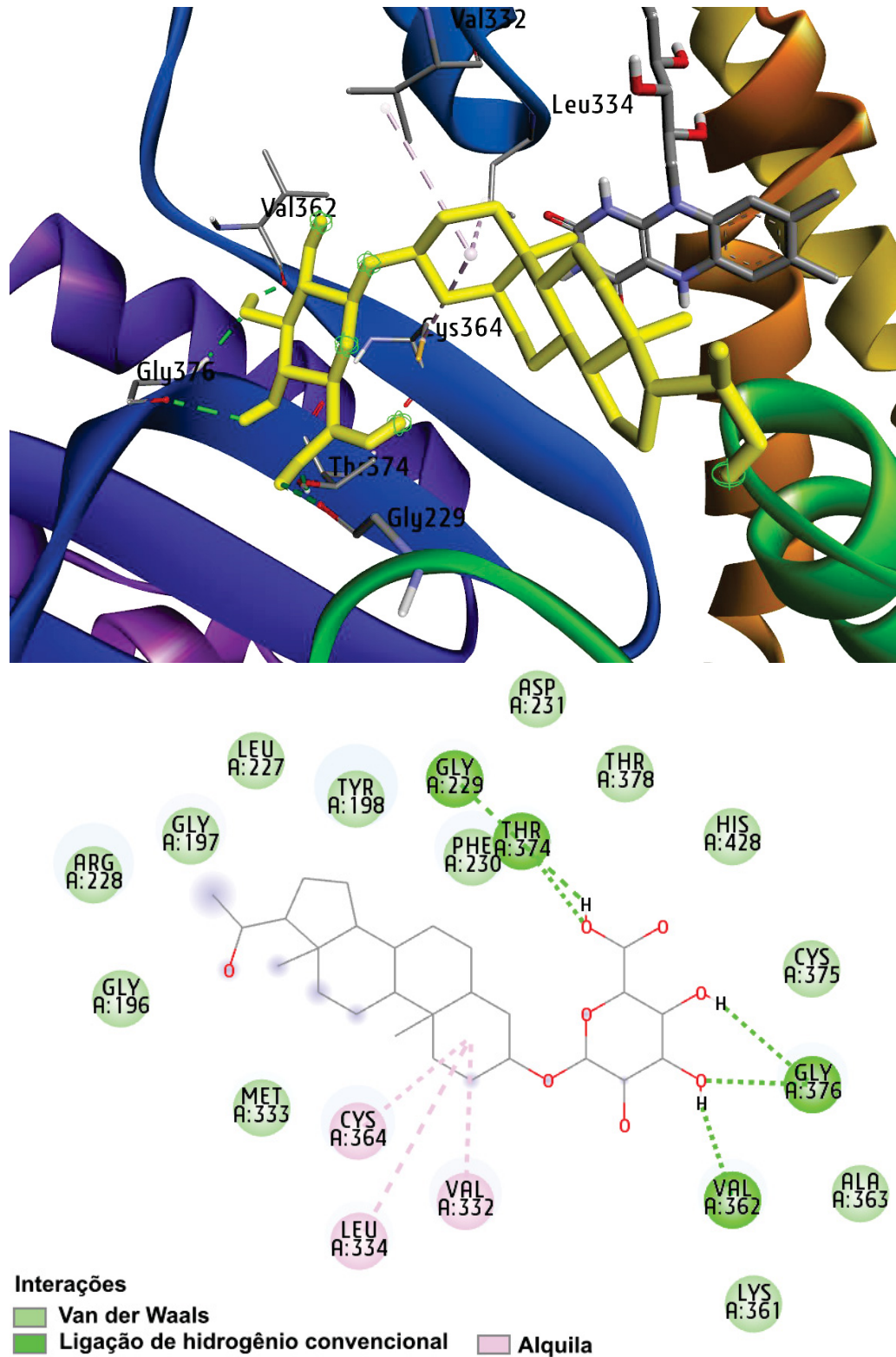


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A estrutura em amarelo corresponde ao PN43, encaixado no sítio ativo da enzima TR, representada pela estrutura de  $\alpha$ -hélices e fitas. Logo abaixo, pode-se visualizar a estrutura 2D da molécula, com os aminoácidos envolvidos na interação identificados.



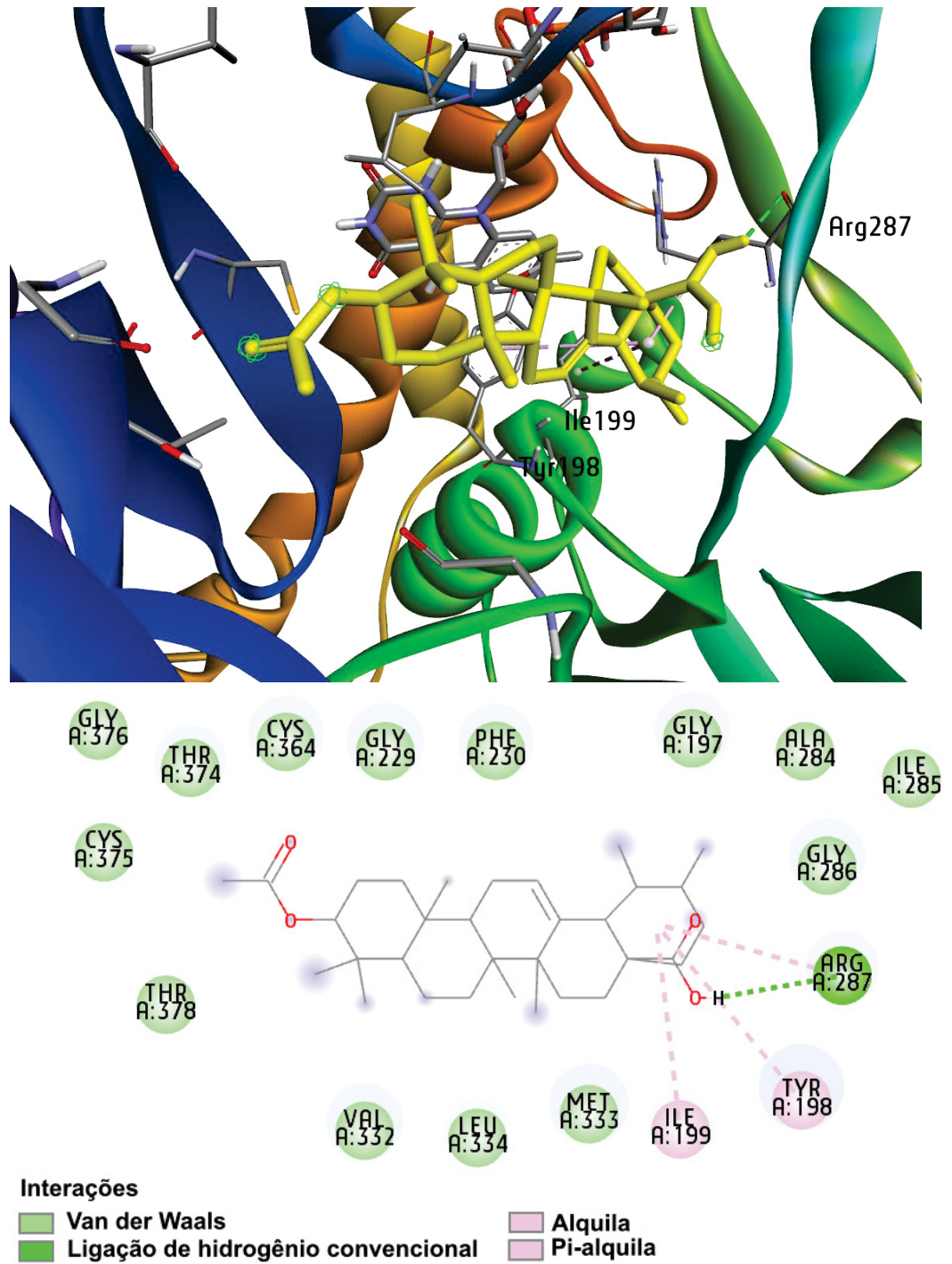
FIGURA 19 – DOCKING MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DO PN53.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A estrutura em amarelo corresponde ao PN53, encaixado no sítio ativo da enzima TR, representada pela estrutura de  $\alpha$ -hélices e fitas. Logo abaixo, pode-se visualizar a estrutura 2D da molécula, com os aminoácidos envolvidos na interação identificados.

FIGURA 20 – DOCKING MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DO PN59.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A estrutura em amarelo corresponde ao PN53, encaixado no sítio ativo da enzima TR, representada pela estrutura de  $\alpha$ -hélices e fitas. Logo abaixo, pode-se visualizar a estrutura 2D da molécula, com os aminoácidos envolvidos na interação identificados.

### 4.3 FÁRMACOS PARA REPOSICIONAMENTO

#### 4.3.1 Triagem virtual e *docking* molecular

Os resultados da triagem virtual dos 1576 RPs são apresentados na TABELA 10. Dos 1.576 RPs, 30 tiveram maior afinidade com a TR. As afinidades de ligação são expressas como energias de ligação mais baixas obtidas em kcal/mol ( $\leq -9$  kcal/mol).

Os resultados da análise de *docking* molecular dos RPs são também mostrados na TABELA 10. A análise de *docking* obteve resultados semelhantes dos obtidos na triagem virtual, ou seja: dos 1.576 RPs, 30 tiveram maior afinidade com a TR.

TABELA 10 – TRIAGEM VIRTUAL (OBTIDO POR PYRX) E *DOCKING* MOLECULAR (OBTIDO POR AUTODOCK TOOLS E AUTODOCK VINA) DA LIGAÇÃO ENTRE OS 30 PRINCIPAIS RPs E A ENZIMA TR

Molécula	ZINC ID	PyRx tools	Autodock tools	AutoDock Vina	DPR (%)	Fármaco
RP1	ZINC000052955754	-10,6	-10,5	-10,6	-0,5	Ergotamina
RP2	ZINC000003978005	-10,3	-10,6	-10,5	-1,5	Dihidroergotamina
RP3	ZINC000012503187	-10,0	-10,2	-10,1	-1,0	Conivaptano
RP4	ZINC000066166864	-9,7	-9,7	-9,7	0,0	Alectinibe
RP5	ZINC000011681563	-9,6	-9,7	-9,6	-0,6	Netupitanto
RP6	ZINC000019632618	-9,6	-9,3	-9,5	-1,6	Imatinibe
RP7	ZINC000036701290	-9,6	-9,6	-9,6	0,0	Ponatinibe
RP8	ZINC000003914596	-9,5	-9,6	-9,5	-0,6	Saquinavir
RP9	ZINC000006716957	-9,5	-9,3	-9,2	-1,6	Nilotinibe
RP10	ZINC000100378061	-9,5	-9,4	-9,4	-0,6	Naldemedine
RP11	ZINC000003927822	-9,3	-9,2	-9,2	-0,6	Lurasidona
RP12	ZINC000011679756	-9,3	-9,3	-9,2	-0,6	Eltrombopag
RP13	ZINC000068202099	-9,3	-9,2	-9,4	-1,1	Erismodegibe
RP14	ZINC000003939013	-9,2	-9,3	-9,4	-1,1	Fosaprepitanto
RP15	ZINC000022448696	-9,2	-9,3	-9,4	-1,1	Indinavir
RP16	ZINC000003817234	-9,1	-9,2	-9,1	-0,6	Maraviroc
RP17	ZINC000004097343	-9,1	-9,1	-9,1	0,0	Sem nome
RP18	ZINC000043100953	-9,1	-9,0	-9,1	-0,6	Tedizolide
RP19	ZINC000064033452	-9,1	-9,1	-9,1	0,0	Lumacaftor
RP20	ZINC000070466416	-9,1	-9,2	-9,2	-0,6	Cabozantinibe
RP21	ZINC000094566092	-9,1	-9,2	-9,1	-0,6	Doxazosina
RP22	ZINC000148723177	-9,1	-9,1	-9,1	0,0	Sem nome
RP23	ZINC000164760756	-9,1	-9,2	-9,1	-0,6	Simeprevir
RP24	ZINC000169289767	-9,1	-9,1	-9,2	-0,6	Azul de tripano

Molécula	ZINC ID	PyRx tools	Autodock tools	AutoDock Vina	DPR (%)	Fármaco
RP25	ZINC000003831128	-9,0	-9,1	-9,1	-0,6	Sem nome
RP26	ZINC000003938686	-9,0	-9,1	-9,0	-0,6	Palbociclib
RP27	ZINC000004214700	-9,0	-9,2	-9,1	-1,1	Paliperidona
RP28	ZINC000014261579	-9,0	-9,1	-9,0	-0,6	Ciclesonida
RP29	ZINC000035328014	-9,0	-9,0	-9,0	0,0	Ibrutinibe
RP30	ZINC000100016058	-9,0	-9,2	-9,1	-1,1	Tipranavir

LEGENDA: DPR: Desvio padrão relativo; RP: Fármacos para reposicionamento.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.3.2 Machine learning

Os valores medianos dos descritores usados para a construção dos modelos de ML para a classificação dos RPs de baixa e de alta afinidade com a TR são mostradas na tabela abaixo (TABELA 11).

TABELA 11 – VALORES MEDIANOS DOS DESCRITOS UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE ML (RPs)

Descritor	RP com alta afinidade com a TR (n=61)			RP com baixa afinidade com a TR (n=61)			p-valor*
	Mediana	IQ1	IQ3	Mediana	IQ1	IQ3	
<b>Propriedades físico-químicas</b>	---	---	---	---	---	---	---
Peso molecular	529,5200	452,4100	584,0900	104,1000	88,0850	124,1850	<0,001
Número de átomos pesados	39,0000	33,0000	43,0000	7,0000	6,0000	8,0000	<0,001
Número de átomos pesados em anel aromático	17,0000	15,0000	21,0000	0,0000	0,0000	5,0000	<0,001
Fração de carbonos com hibridização sp <sup>3</sup>	0,4000	0,2400	0,4800	0,7500	0,4000	0,8300	<0,001
Número de ligações rotacionáveis	6,0000	5,0000	9,0000	2,0000	1,0000	3,0000	<0,001
Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio	7,0000	6,0000	8,0000	2,0000	1,0000	2,0000	<0,001
Número de hidrogênios doadores de ligação de hidrogênio	2,0000	1,0000	3,0000	1,0000	0,0000	1,0000	<0,001
Refratividade molar	150,1000	131,6500	170,0200	27,4300	23,0050	34,1300	<0,001
Área de superfície polar topológica	99,1600	84,3900	118,2100	40,4600	26,3000	57,5300	<0,001
<b>Lipossolubilidade</b>	---	---	---	---	---	---	---
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	3,6400	3,3600	4,0500	0,3950	-1,4425	1,0750	<0,001
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	4,3500	3,0600	5,2800	-1,5950	-2,9550	-0,1825	<0,001
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	4,0100	2,7100	5,9100	-0,2700	-1,6550	0,2175	<0,001
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2,6900	1,8400	3,7400	-1,5550	-3,3000	-0,7550	<0,001
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	3,9700	2,5900	4,8300	-0,9150	-1,0475	-0,4650	<0,001
Log $P_{o/w}$ consensual	4,0100	2,8700	4,6000	-1,0900	-1,4825	-0,3775	<0,001

Descritor	RP com alta afinidade com a TR (n=61)			RP com baixa afinidade com a TR (n=61)			p-valor*
	Mediana	IQ1	IQ3	Mediana	IQ1	IQ3	
<b>Hidrossolubilidade</b>	---	---	---	---	---	---	---
Log S (ESOL)	-5,7300	-6,2500	-4,8800	0,7600	-0,3050	1,5300	<0,001
Solubilidade 1	0,0010	0,0003	0,0077	457,5000	46,4500	3762,5000	<0,001
Log S (Ali)	-6,2200	-7,1100	-5,0200	0,7750	-0,2825	1,8225	<0,001
Solubilidade 2	0,0003	0,0000	0,0054	604,0000	60,8750	8315,0000	<0,001
Log S (SILICOS-IT)	-7,8100	-9,0800	-6,4900	-0,1450	-1,2500	1,0425	<0,001
Solubilidade 3	0,0000	0,0000	0,0001	61,9000	8,9275	1006,5000	<0,001

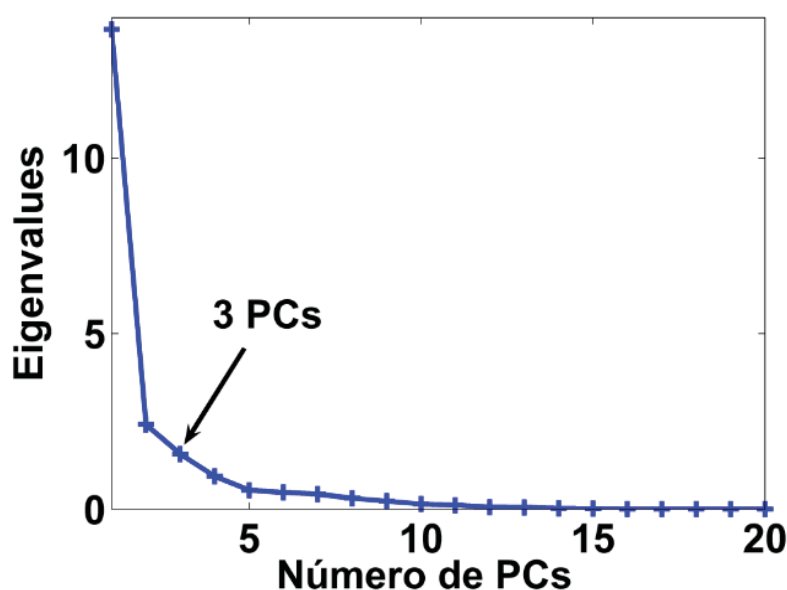
LEGENDA: \*Teste de *Mann Whitney*. C sp<sup>3</sup>: Carbono de hibridização sp<sup>3</sup>; IQ: Interquartil; NAP: Número de átomos pesados; NAPA: Número de átomos pesados em anel aromático; NHA: Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio; NHD: Número de hidrogênio doadores de ligação de hidrogênio; NLR: Número de ligações rotacionáveis; PM: Peso molecular; RM: Refratividade molar; RP: Fármacos para reposicionamento; TPSA: Área de superfície polar topológica; TR: Tripanotona redutase.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.3.2.1 Análise exploratória

A análise exploratória foi conduzida de forma semelhante aos PNs, descrito no subtópico 4.2.2.1. Assim, utilizou-se o modelo de PCA e diferentes métodos de pré-processamento foram testados, sendo a combinação *auto scale* + GLSW com  $\alpha=0,002$  a que melhor se ajustou aos dados. Um total de 3 PCs foram escolhidas (FIGURA 21) representando 84,64% de variancia acumulada (TABELA 12).

FIGURA 21 – PCs DE ACORDO COM O CRITÉRIO DE *EIGENVALUE* (RPs)



LEGENDA: PC: Componente principal.

FONTE: A autora (2022).



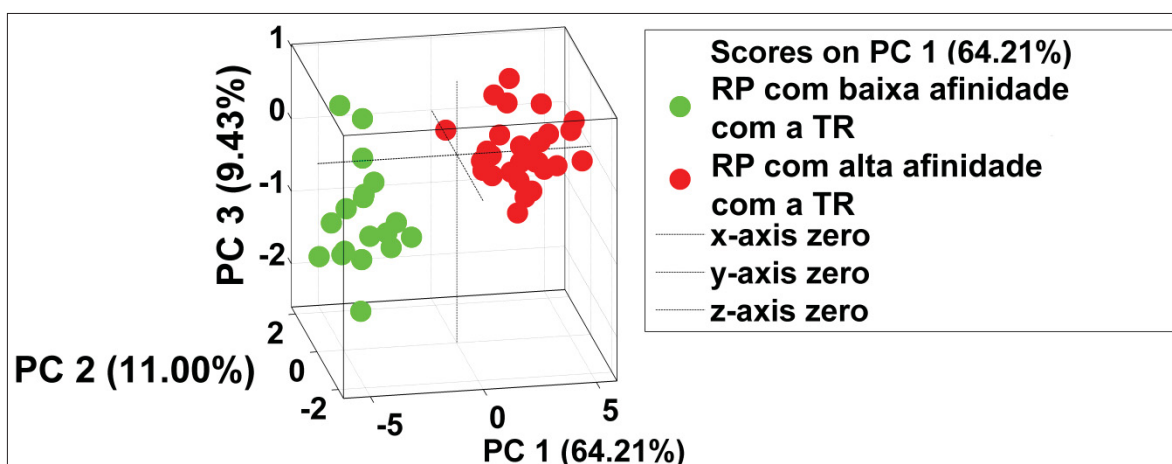
TABELA 12 – VARIÂNCIA ACUMULADA (RPs)

PC	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	64,21	-
2	11,00	75,21
3	9,43	84,64

FONTE: A autora (2022).

A FIGURA 22 mostra o gráfico de *escores* do modelo PCA com as três PCs selecionadas, onde é possível verificar que o modelo PCA foi capaz de discriminar os fármacos de alta e de baixa afinidade com a enzima TR. Todas as amostras (ligantes) estão dentro do intervalo de confiança de 95%, mostrando que não foram detectados *outliers*.

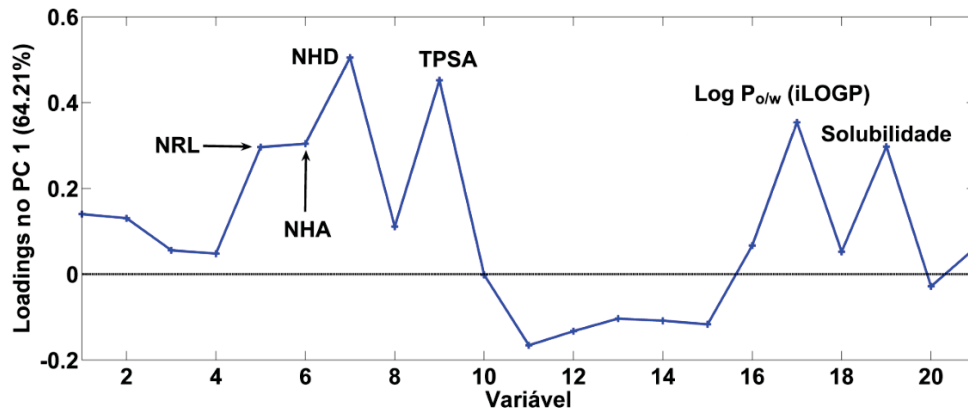
FIGURA 22 – Modelo PCA (RPs)



LEGENDA: PC: Componente principal; RP: Fármacos para reposicionamento; TR: Tripanotona redutase.

FONTE: A autora (2022).

O gráfico de *loadings* (FIGURA 23), mostra os descritores físico-químicos que foram importantes na discriminação dos compostes de alta e de baixa afinidade com a TR. Como a PC1 foi a que capturou maior variância explicada (PC1=64.21%), o *loading* foi construído considerando apenas a PC1. Assim, o número de ligações rotacionáveis (NLR), número de grupos doadores e aceptores de hidrogênio (NHD e NHA), TPSA, Log  $P_{o/a}$  (ILOGP) e a solubilidade foram as características que contribuíram positivamente na discriminação dos dois grupos de fármacos.

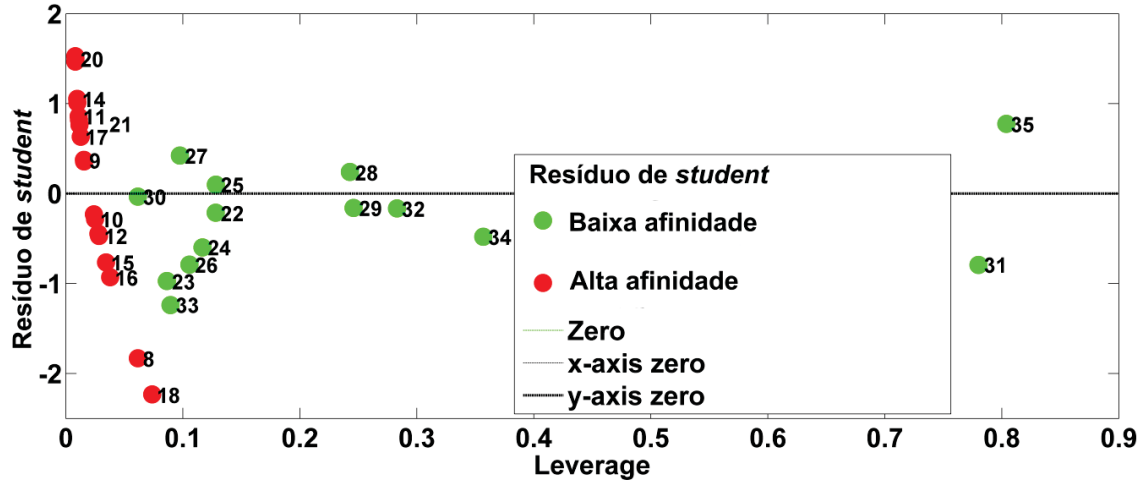
FIGURA 23 – GRÁFICO DE *LOADING* (RPs)

LEGENDA: NHA: Número de hidrogênios aceptores de ligação de hidrogênio; NHD: Número de hidrogênios doadores de ligação de hidrogênio; NRL: Número de ligações rotacionáveis; TPSA: Área de superfície polar topológica.

FONTE: A autora (2022).

#### 4.3.2.2 Detecção supervisionada de *outlier*

O primeiro passo para a construção dos modelos de ML de classificação de fármacos de alta e de baixa afinidade com a TR foi a detecção de *outliers* (amostras anômalas), através de gráfico de *Leverage versus Resíduos de Student* (FIGURA 24). Os fármacos números 31 e 35, embora tenham apresentado altos valores de *Leverage*, não são *outliers* porque estão dentro do intervalo de Resíduos de *Student* ( $\pm 2,5$  desvios-padrão) tolerados.

FIGURA 24 – GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS RESÍDUOS DE STUDENT* (RPs)

FONTE: A autora (2022).

#### 4.3.2.3 Modelos de *machine learning*

Após a avaliação de *outliers*, foram construídos os seguintes modelos de ML: ANN, XGBoost, KNN, SIMCA, PLS-DA, LREG e SVM. Na TABELA 13 são mostrados os desempenhos de todos os modelos de ML dos compostos de alta afinidade (n=30) e de baixa afinidade (n=30). De forma semelhante aos PNs, o modelo PLS-DA foi o que teve maior desempenho preditivo (maior sensibilidade, especificidade, acurácia e área sobre a curva (ASC) ROC) na classificação dos fármacos de alta e de baixa afinidade com a enzima TR (TABELA 13).

TABELA 13 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODELOS de ML (RPs)

Classe	Modelo	VP	FN	VN	FP	SEN (%)	ESP (%)	ACU (%)	ASC ROC (%)
RP com alta afinidade com TR	ANN	16	15	22	8	52	73	62	62
	XGBoost	18	13	26	4	58	87	72	72
	KNN	21	9	25	5	70	83	77	77
	PLS-DA	31	0	30	0	100	100	100	100
	SIMCA	19	12	22	8	61	73	67	67
	LREG	21	9	25	5	70	83	77	77
	SVM	17	3	18	12	85	60	70	70
RP com baixa afinidade com TR	ANN	13	17	14	17	43	45	44	44
	XGBoost	19	11	15	16	63	48	56	56
	KNN	21	9	17	14	70	55	62	62
	PLS-DA	30	0	31	0	100	100	100	100
	SIMCA	20	10	23	8	67	74	70	70
	LREG	21	9	26	5	70	84	77	77
	SVM	22	8	16	15	73	52	62	62

LEGENDA: ACU: Acurácia; ANN: Redes neurais artificiais; ASC: Área sob a curva; ESP: Especificidade; FN: Falso negativo; FP: Falso positivo; KNN: K-vizinhos mais próximos; LREG: Regressão logística; PLS-DA: Análise discriminante por mínimos quadrados parciais; ROC: Receiver operating characteristic; SEN: Sensibilidade; SIMCA: Modelagem independente e flexível por analogia de classe; SVM: Máquina de vetores de suporte. VN: Verdadeiro negativo; VP: Verdadeiro positivo; XGBoost: *eXtreme gradient boosting*.

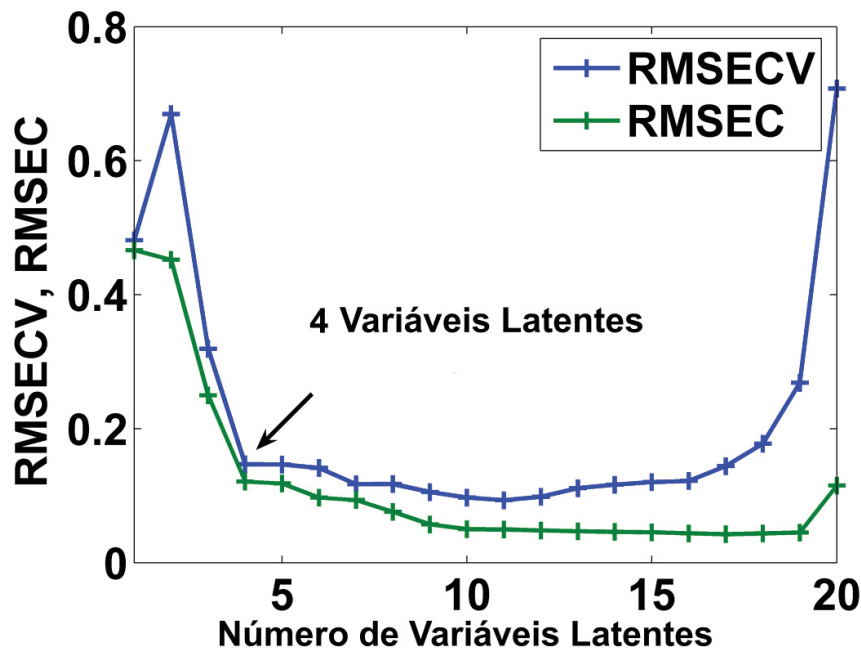
FONTE: A autora (2022).



#### 4.3.2.4 Modelo de análise discriminante por mínimos quadrados parciais

Ambos os modelos PLS-DA de predição dos fármacos de baixa e de alta afinidade com a TR foram calibrados usando a validação cruzada do tipo *leave-one-out*. O número de variáveis latentes selecionados para a calibração foi escolhido de acordo com o RMSEC e RMSECV. O modelo PLS-DA otimizado foi constituído por 4 variáveis latentes. A vetor x foi pré-processado pelo método de *autoscale*, ao passo que para o vector y nenhum tipo de pré-processamento foi aplicado. O gráfico de RMSEC e RMSECV versus número de variáveis latentes pode ser observado na FIGURA 25.

FIGURA 25 – GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV VERSUS NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (RPs)



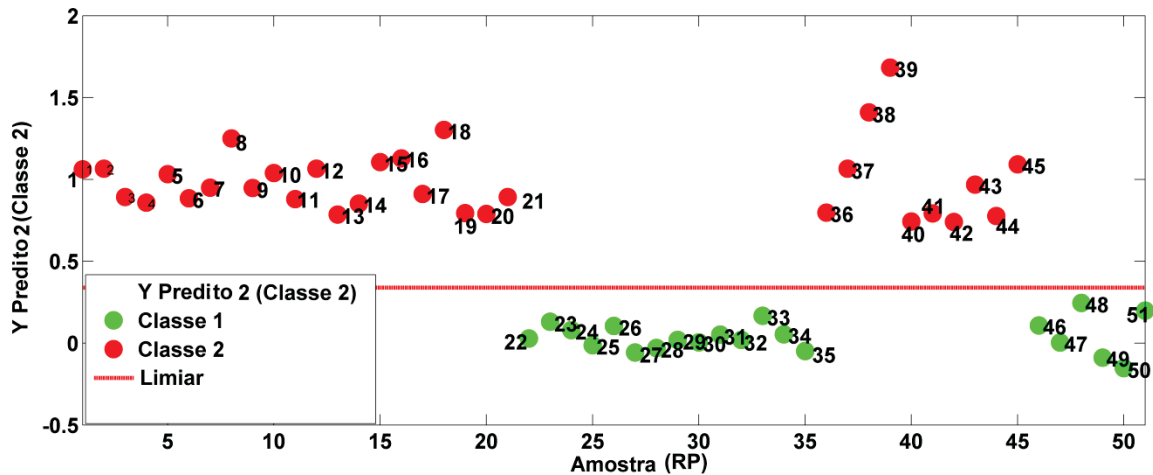
LEGENDA: RMSEC: Raiz quadrada de erro médio de calibração; RMSECV: Raiz quadrada de erro médio de validação cruzada.

FONTE: A autora (2022).

Os resultados dos dois modelos de PLS-DA propriamente ditos, formados por quatro variáveis latentes, para classificação dos fármacos de maior e de menor afinidade com a TR são mostradas nas FIGURAS 26 e 27, através do gráfico de amostras versus y previsto. Nos modelos PLS-DA para classificação dos RPs de alta e de baixa afinidade com a TR, os limiares calculados foram aproximadamente de 0,4

e de 0,6, respectivamente. Assim, os modelos PLS-DA conseguiram prever corretamente todos os fármacos com maior e menor afinidade com a TR. Como não houve erros de classificação, os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia e ASC ROC foram de aproximadamente 100%, como observado acima na TABELA 13.

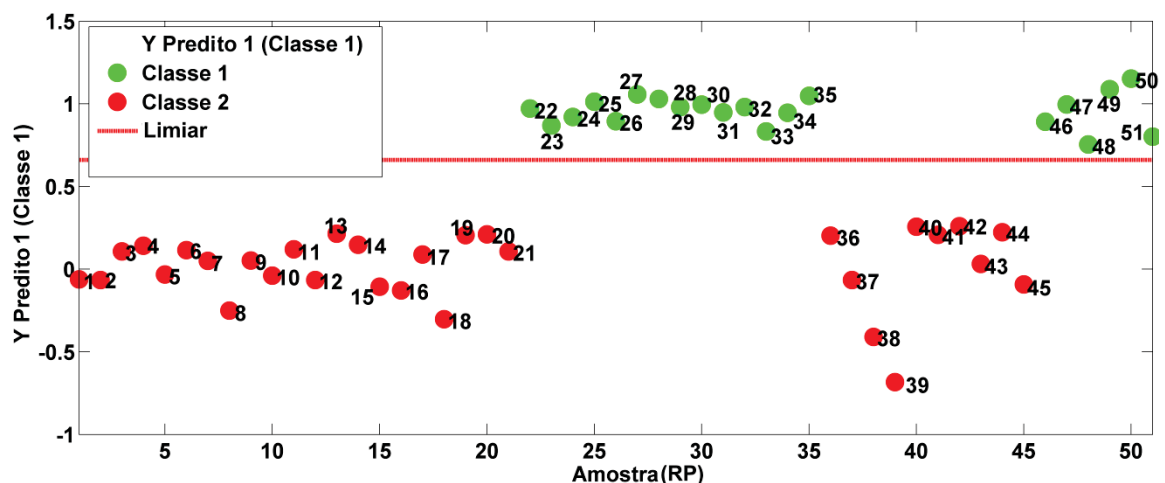
FIGURA 26 – MODELO PLS-DA COM 4 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS RPs DE ALTA AFINIDADE)



LEGENDA: As Classe 1 e 2, representam os compostos de baixa e de alta afinidade, respectivamente. Todos produtos naturais de alta afinidade foram corretamente classificados. Os compostos de classe 1 que estão à direita e a esquerda representam os RPs dos conjuntos de calibração validação, respectivamente. RP: Fármacos para reposicionamento.

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 27 – MODELO PLS-DA COM 4 VARIÁVEIS LATENTES (CLASSIFICAÇÃO DOS RPs DE BAIXA AFINIDADE)



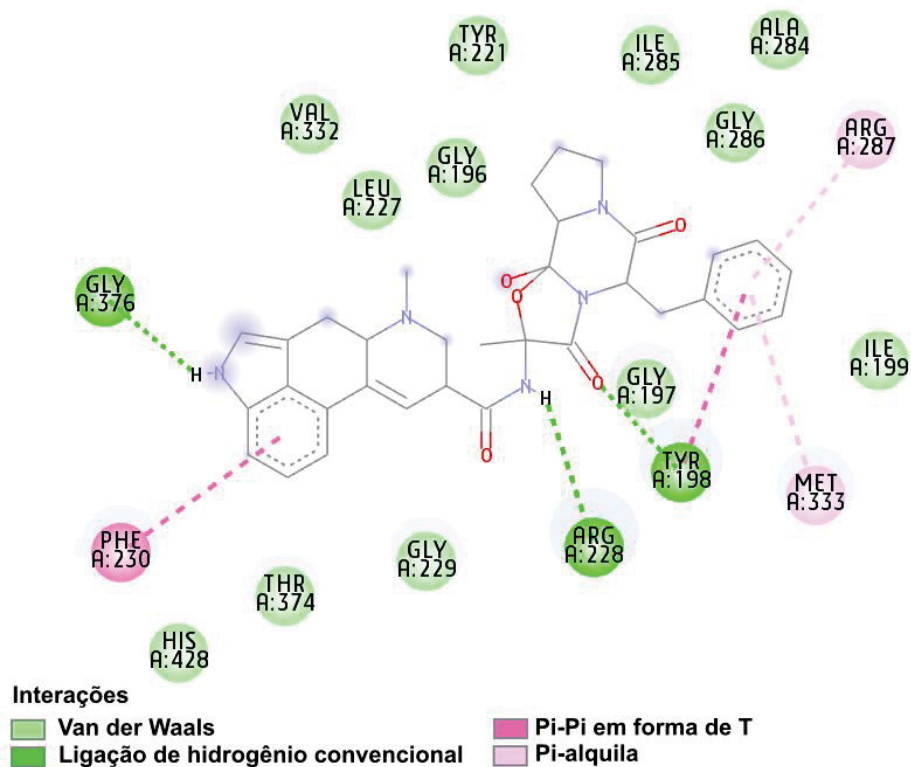
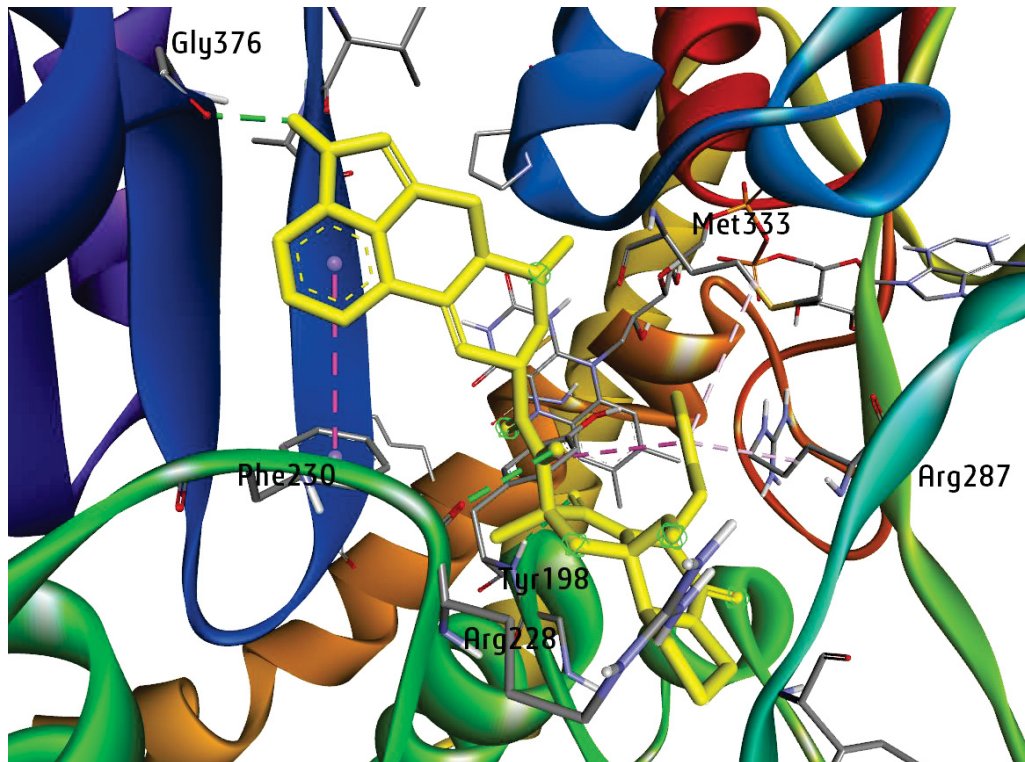
LEGENDA: As Classe 1 e 2, representam os compostos de baixa e de alta afinidade, respectivamente. Todos produtos naturais de alta afinidade foram corretamente classificados. Os compostos de classe 1 que estão à direita e a esquerda representam os RPs dos conjuntos de calibração validação, respectivamente. RP: Fármacos para reposicionamento.

FONTE: A autora (2022).

### 4.3.3 Análise da qualidade das interações

Dentre os 30 RPs que tiveram melhores resultados de interação com a TR (energia de afinidade  $\leq -9$  kcal/mol), os fármacos saquinavir, fosaprepitanto, RP18 (sem nomenclatura), paliperidona, eltrombopag, netupitanto, imatinibe, ibrutinibe, tedizolide, RP23 (sem nomenclatura) e o azul de tripano foram descartados por apresentarem ligações desfavoráveis na interação com o alvo molecular. Entre os 19 restantes, a ergotamina, dihidroergotamina e doxazosina são os que aparentam ter mais vantagens, considerando a necessidade de fármacos de baixo custo e mais seguros que os disponíveis atualmente para o tratamento da leishmaniose. Assim, os resultados do *docking* molecular em 3D e diagramas 2D da ergotamina, dihidroergotamina e doxazosina são apresentados nas FIGURAS 28, 29 e 30.

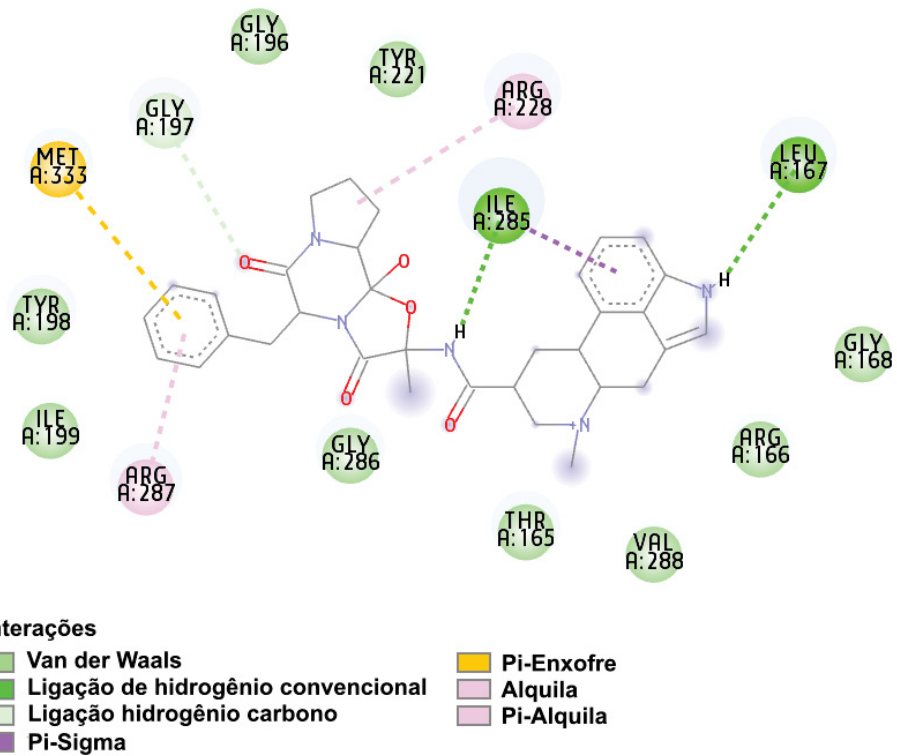
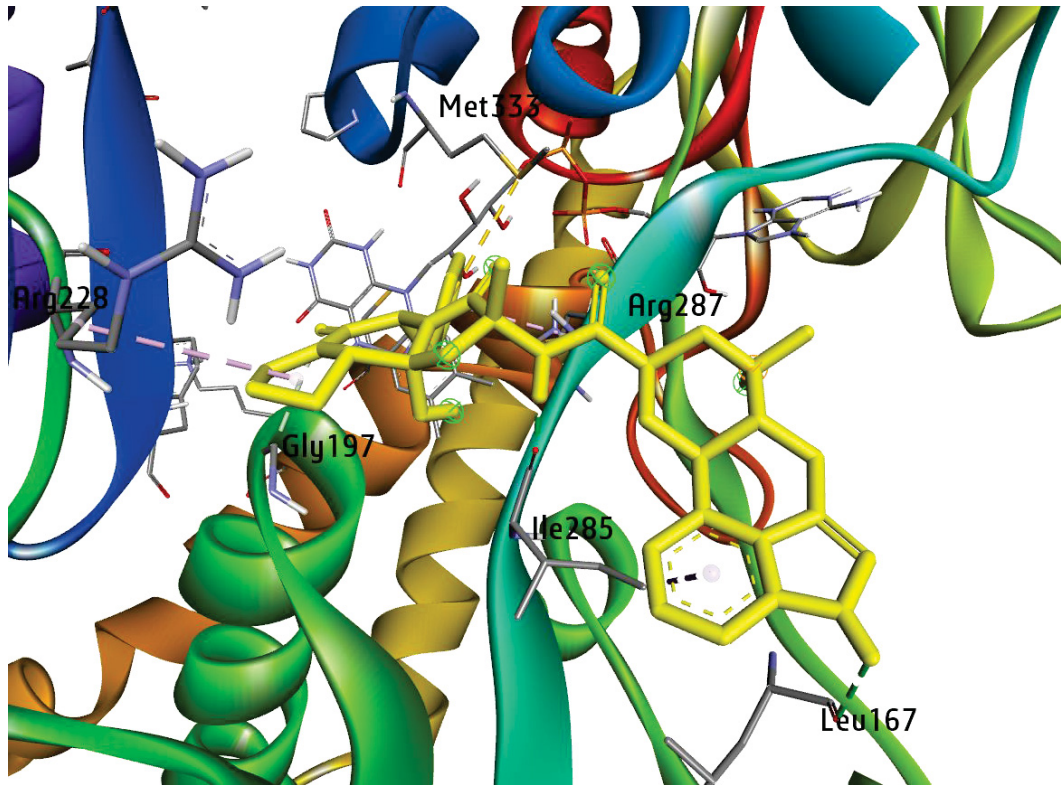
FIGURA 28 – DOCKING MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DA ERGOTAMINA.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A estrutura em amarelo corresponde ao PN53, encaixado no sítio ativo da enzima TR, representada pela estrutura de  $\alpha$ -hélices e fitas. Logo abaixo, pode-se visualizar a estrutura 2D da molécula, com os aminoácidos envolvidos na interação identificados.

FIGURA 29 – DOCKING MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DA DIHIDROERGOTAMINA.

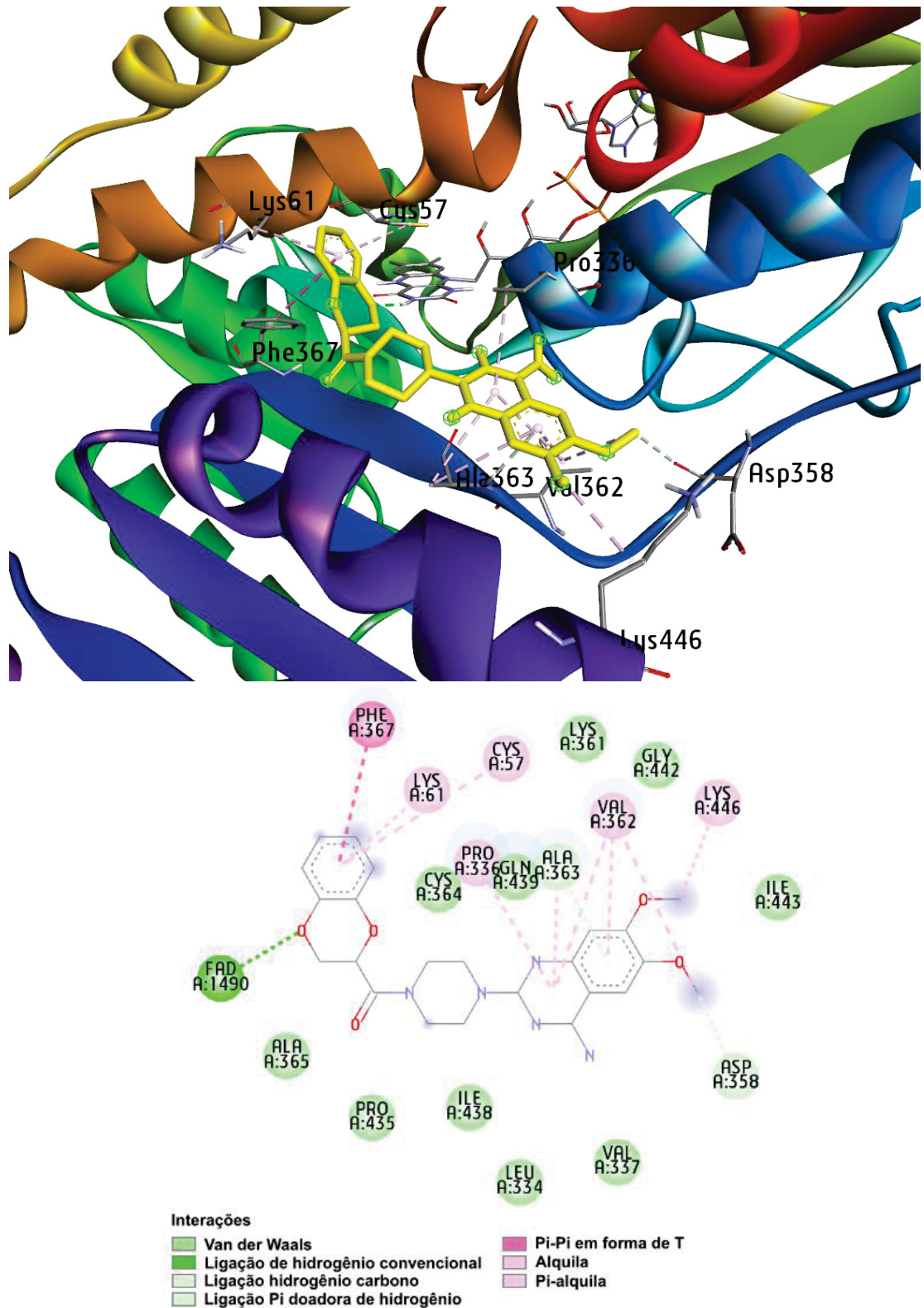


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A estrutura em amarelo corresponde ao PN53, encaixado no sítio ativo da enzima TR, representada pela estrutura de  $\alpha$ -hélices e fitas. Logo abaixo, pode-se visualizar a estrutura 2D da molécula, com os aminoácidos envolvidos na interação identificados.



FIGURA 30 – DOCKING MOLECULAR E DIAGRAMA 2D DA DOXAZOSINA.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: A estrutura em amarelo corresponde ao PN53, encaixado no sítio ativo da enzima TR, representada pela estrutura de  $\alpha$ -hélices e fitas. Logo abaixo, pode-se visualizar a estrutura 2D da molécula, com os aminoácidos envolvidos na interação identificados.

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, existem cerca de 25 compostos disponíveis para o tratamento da leishmaniose em humanos, mas todos eles estão associados com problemas de toxicidade, custo, recidivas ou de adesão a terapia (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). Única doença negligenciada ainda em expansão, ocorrem casos novos da leishmaniose a cada ano com manifestações graves, especialmente se associada a infecções concomitantes (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015; BENCHIMOL et al., 2019). Dessa forma, foram testados 8.846 PNs e 1.576 fármacos aprovados pelo FDA (os últimos em busca de moléculas que pudessem ser reposicionadas terapeuticamente para o tratamento da leishmaniose, referidas como RPs) através de ensaios *in silico* guiados por ML. O alvo terapêutico selecionado foi a enzima TR devido a sua relevância na biologia do parasito: esta macromolécula é essencial na defesa do *Leishmania spp.* frente à EROS, e, além disto, não está presente nos hospedeiros, o que a torna um alvo ideal para fármacos antileishmania (BAIOCCO et al., 2009).

Os resultados obtidos através da triagem virtual das duas bases de dados (PNs e RPs) foram validados por *docking* molecular, utilizando-se para isto de diferentes *softwares* nas análises, e obtendo-se resultados semelhantes. O modelo matemático utilizado para levar a cabo as análises foi o de mecânica molecular. Este modelo segue as leis da física clássica, e, portanto, observa apenas os núcleos dos átomos. Tal abordagem foi escolhida porque representa um modelo mais rápido, que pode ser aplicado a moléculas grandes e bancos de dados extensos, sem grande gasto computacional (PATRICK, 2013; VANOMMESLAEGHE; GUVENCH; MACKERELL, 2014). De forma semelhante, os cálculos de *docking* precisam ser rápidos, factíveis e acurados, visto o número de ligantes envolvidos. Das três abordagens principais de *docking* molecular existentes foi escolhida a mais comum, onde o alvo é considerado rígido e os ligantes flexíveis. Nesta abordagem, alguns *softwares* utilizam algoritmos genéticos e evolucionários ou de Monte Carlo para fazer a busca de conformações junto ao processo de docagem. Neste estudo, foram utilizados algoritmos genéticos, onde os chamados “cromossomos” não determinam apenas a conformação, mas também a posição e orientação dos ligantes no sítio de ligação, além de fazer translação e rotação do ligante através de mutações e *cross-overs* (PATRICK, 2013; ROSENFELD; VAJDA; DELISI, 1995).

Os *softwares* de *docking* podem ter funções de pontuação com vieses importantes, gerando falsos positivos (SIEG; FLACHSENBERG; RAREY, 2019). Além disso, o alvo pode sofrer mudanças conformacionais quando da ligação do ligante no seu sítio ativo, o que pode resultar em falsos negativos, já que o alvo é considerado rígido nos cálculos (FERREIRA et al., 2010). Para resolver tais barreiras, a abordagem de ML tem sido amplamente utilizada na literatura para prever a afinidade entre alvo e ligantes, com acurácia maior que *softwares* de *docking* convencionais (LI et al., 2020; SIEG; FLACHSENBERG; RAREY, 2019). Assim, foram utilizados os algoritmos de ML de PCA, LDA, PLS-DA, ANN, DT, KNN e SIMCA para validar o *docking* realizado. Pelos métodos de PCA e PLS-DA, foi possível discriminar os ligantes (PNs e RPs) de alta e de baixa afinidade com a TR, reproduzindo os resultados encontrados na triagem virtual e *docking* molecular, enquanto os demais algoritmos tiveram baixo desempenho na predição dos compostos promissores e não promissores. O modelo de PLS-DA de classificação dos compostos de alta afinidade com o alvo molecular teve sensibilidade, especificidade e acurácia de 100%, 98% e 99%, respectivamente, para PNs e 100% em todos os parâmetros para RPs. De fato, Mendez, Broadhurst e Reink (2019) observaram o número de publicações por ano utilizando os diferentes métodos de ML, e concluíram que a partir de 2006 o PLS é o algoritmo mais utilizado. Além disso, o PLS tem interpretação mais fácil, treinamento mais rápido, *softwares* de uso livre disponíveis e diversas vantagens frente aos demais algoritmos de ML (MENDEZ; BROADHURST; REINKE, 2019; RUIZ-PEREZ et al., 2020).

No estudo acerca dos produtos naturais, 61 apresentaram alta afinidade com a enzima TR. Com efeito, os produtos naturais e seus derivados são fonte de novos fármacos para o tratamento de diversas condições clínicas: cerca de 50% dos fármacos aprovados pelo FDA entre 1981 e 2014 eram derivados de produtos naturais (KHAN, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2020). Assim, os PNs de maior afinidade com a enzima TR foram submetidos a análise de *drug-likeness* e de perfil farmacocinético. Para os fármacos de reposicionamento isto não foi necessário visto que são moléculas já aprovadas pelo FDA, e, portanto, com características fármaco-similares e perfis adequados. Dos 61 PNs abaixo da linha de corte considerada para a afinidade com a macromolécula ( $\leq -9$  kcal/mol) e RMSD menores que 2 Å, 31 tiveram bom desempenho nas análises de *drug-likeness* realizadas, ou seja: têm características de fármaco, atendendo concomitantemente às regras de Lipinski e Veber. Esta linha de corte foi considerada arbitrariamente tanto para os PNs quanto para os RPs, visto



possibilitar um número de moléculas factível de ser analisado no presente estudo. Vale ressaltar que substâncias destes bancos de dados com energias de ligação maiores que -9 kcal/mol poderiam ter bom desempenho nas análises subsequentes, e, portanto, estudos de maior dimensão considerando-as nas análises podem ser posteriormente realizados. Além disso, o valor de RMSD de 2 Å é padrão na literatura como valor ideal, sendo que quanto menor o RMSD, maior a similaridade entre as estruturas estudadas. Por fim, as regras de Lipinski e Veber para o estudo de *drug-likeness* foram utilizadas em conjunto afim de prover maior robustez ao estudo.

Posteriormente, os 31 PNs que apresentaram alta afinidade com a TR e características fármaco-similares foram avaliados quanto a seus perfis farmacocinéticos. Assim, utilizando-se dos critérios de exclusão - biodisponibilidade oral menor que 20%, alta probabilidade de penetração pela BHE, inibidores fortes de 2 ou mais CYPs ou médios de 3 ou mais CYPs e presença de toxicidade de qualquer tipo -, chegou-se a três compostos líderes: os denominados PN43, PN53 e PN59, de códigos ZINC, respectivamente, ZINC000247978460, ZINC000253611308 e ZINC000257511790. De acordo com a base de dados ZINC15, nenhuma das três moléculas foram utilizadas em ensaios clínicos nem tem outras publicações relacionadas. O PN43 está disponível comercialmente e pode ser adquirido através da empresa AnalytiCon Discovery NP, o PN53 pela Sigma Aldrich e o PN59 através da Hairu Chemical. Assim, os três produtos naturais podem ser facilmente obtidos para utilização em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os antimoniais pentavalentes, principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, tem o seguinte mecanismo molecular de ação: o Sb(III) presente em suas estruturas interage com a Cys52, a Cys57, a Thr335 e a Hys461', inibindo a redução da tripanotona pela TR e resultando no dano oxidativo ao parasito (BAIOCCO et al., 2009). No estudo de *docking* molecular, observou-se a interações do tipo ligação de hidrogênio do PN43 com os resíduos Cys364 e glicina 376 (Gly376), do PN53 com os resíduos Gly229, Thr374, Gly376 e valina 362 (Val362) e do PN59 com o resíduo Arg287, que explicam suas energias de interação com a enzima e provável mecanismo molecular de ação.

No estudo de reposicionamento de fármacos, por sua vez, dos 1576 RPs pesquisados, 20 apresentaram alta afinidade com o centro ativo do alvo molecular e interações intermoleculares favoráveis. Estes fármacos pertencem a diferentes

classes farmacêuticas, como por exemplo: antineoplásicos, antirretrovirais, alcaloides, entre outras.

A substância que teve maior afinidade pelo centro ativo da TR dentre os 20 fármacos foi a ergotamina. A ergotamina é um alcaloide do esporão-do-centeio, utilizado para tratar a enxaqueca. Possui atividade vasoconstritora (GRAHAM; WOLFF, 1938), efeito na inflamação neurogênica (BUZZI et al., 1991; BUZZI; MOSKOWITZ, 1991) e ação nos neurônios serotoninérgicos centrais (HOSKIN; KAUBE; GOADSBY, 1996; IVERSEN et al., 1990; TFELT-HANSEN, 2001). É utilizada amplamente em diversos países no tratamento da enxaqueca, e é considerada um fármaco seguro se prescrito na dose correta e esporadicamente, na ausência de contraindicações. Apresenta efeitos adversos como náuseas, efeitos uterinos e enxaqueca de rebote (MAASSENVANDENBRINK et al., 1998). Em consequência, é contraindicada na gravidez, falência renal ou hepática, doença vascular coronariana, cerebral ou periférica, reações de hipersensibilidade, sepse ou hipertensão não controlada (LIPTON, 1997; SCOTT, 1992). Não foi encontrado literatura que relacionasse a ergotamina com a leishmaniose nem com outras parasitoses.

A segunda molécula que teve maior afinidade com a TR foi a dihidroergotamina (DHE). A DHE é um derivado da ergotamina, utilizado no tratamento da enxaqueca como um agente simpatolítico mais potente que a primeira (TFELT-HANSEN; SAXENA, 2000). Causa substancialmente menos náuseas e vômitos que a ergotamina (BERDE; STÜRMER, 1978), menos casos de reincidência da condição clínica e menos dores de cabeça de rebote (WINNER et al., 1993, 1996).

Vale destacar a presença da doxazosina entre as moléculas de maior afinidade com a TR, visto ser um medicamento barato, de uso bem estabelecido no tratamento da hipertensão e com poucos eventos adversos nas dosagens utilizadas para este fim. Além disso, este fármaco tem sido utilizado com sucesso em idosos, negros, fumantes e pacientes com doenças concomitantes como disfunção renal, hipercolesterolemia, Diabetes Mellitus não-insulino dependente e doenças respiratórias. A doxazosina ainda promove uma pequena queda do colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, além de aumento na lipoproteína de alta densidade (HDL) e razão HDL/colesterol total. Os seus efeitos adversos mais comuns são tontura, dor de cabeça, fadiga, mal-estar e sonolência. (FULTON; WAGSTAFF; SORKIN, 1995). Não foi encontrado literatura que relacionasse a doxazosina com a leishmaniose nem com outras parasitoses.

A ergotamina interage por ligações de hidrogênio com os aminoácidos Tyr198, Arg228 e Gly376 do sítio ativo da TR, além de fazer interações de *van der Waals* com diversos aminoácidos e do tipo empilhamento  $\pi$  em T com a fenilalanina 230 (Phe230), enquanto a dihidroergotamina — de estrutura similar — faz ligações de hidrogênio dos seus grupamentos amina com a isoleucina 285 (Ile285) e leucina 167 (Leu167). A doxazosina faz uma ligação de hidrogênio com o FAD, além de interagir com a TR por ligações de *van der Waals* com diversos aminoácidos do sítio ativo da enzima e empilhamento  $\pi$  em T com a Phe367. Tais interações poderiam causar a inibição da redução da tripanotona pela TR e consequente dano oxidativo ao parasito, de forma semelhante ao mecanismo molecular de ação dos antimoniais pentavalentes.

O conivaptano – terceira molécula de maior afinidade com a TR encontrada na base de dados de RP – também tem ação vasoconstritora. Foi aprovado pelo FDA em 2005 para o tratamento da hiponatremia euvolêmica. É bem tolerado, sendo que o principal efeito adverso está relacionado a flebite, inflamação e trombose. No entanto, sua administração deve ser endovenosa e requer hospitalização, além de ter preço elevado (WALTER; BONK, 2007).

Em quarto lugar, o alectinibe é um medicamento oral utilizado no tratamento do câncer de pulmão avançado de células não pequenas (NSCLC) (MCKEAGE, 2015). O ponatinibe também está presente na lista dos fármacos com maior afinidade com a TR, sendo outra molécula usada no tratamento de neoplasias, bem como o nilotinibe, erismodegibe, cabozantinibe e o palbociclibe. No entanto, a maioria destes fármacos tem custo elevado, o que representa um problema no tratamento de uma doença negligenciada como a leishmaniose (DEININGER, 2008; DHILLON, 2015; FU et al., 2013; LACY; MILES; NGUYEN, 2017; MASSARO; MOLICA; BRECCIA, 2018).

Além desses, dois fármacos de ação antirretroviral — da classe dos inibidores de protease — puderam ser observados entre os 20 fármacos de maior afinidade com a TR e ligações favoráveis: o indinavir e o tipranavir (KING; ACOSTA, 2006; NOBLE; FAULDS, 1996; PLOSKER; NOBLE, 1999). O maraviroc, antirretroviral da classe dos inibidores da CCR5, também apareceu na lista (PERRY, 2010). No tratamento do HIV, os antirretrovirais são normalmente usados em associações, de forma a diminuir os efeitos adversos e facilitar a adesão dos pacientes. No Brasil, alguns esquemas posológicos são fornecidos pelo Sistema Único de Saúde. Considerando os casos de

coinfecção pelo *Leishmania* spp. e HIV, a alta afinidade destes fármacos com a enzima TR pode ser um fato relevante.

Os métodos convencionais de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos são lentos e onerosos, enquanto os métodos *in silico* permitem prever — em um curto espaço de tempo e com gasto muito menor — quais moléculas podem ser promissoras dentre milhares testadas simultaneamente, aumentando as chances de sucesso na descoberta de novos fármacos. Em suma, dentre os 10.422 compostos testados nesta pesquisa, foram encontradas seis potenciais novas entidades químicas antileishmania: PN43, PN53, PN59, RP1 (ergotamina), RP2 (dihidroergotamina) e RP21 (doxazosina), utilizando-se de métodos *in silico* guiados por *machine learning*. Claramente, devido à complexidade e dinâmica dos sistemas biológicos (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007a, b), fazem-se necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para reforçar as evidências encontradas e avaliar a possibilidade de uso terapêutico destas moléculas no tratamento da leishmaniose.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os 10.422 compostos testados nesta pesquisa, foram encontradas seis potenciais novas entidades químicas antileishmania: PN43, PN53, PN59, RP1 (ergotamina), RP2 (dihidroergotamina) e RP21 (doxazosina), utilizando-se de métodos *in silico* guiados por *machine learning*.

Os métodos *in silico* podem simular praticamente qualquer etapa do desenvolvimento e descoberta de novos fármacos e têm sido amplamente utilizados pela indústria farmacêutica. Utilizando-se essa metodologia, é possível encontrar moléculas promissoras dentre milhares testadas simultaneamente – com menor gasto de recursos e tempo que em metodologias convencionais – aumentando as taxas de sucesso na descoberta de novos fármacos (SHEKHAR, 2008).

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta especialmente as populações dos países mais pobres, embora esteja espalhada pelo mundo todo. A OMS, não porventura, publicou um plano de metas de prevenção, controle, eliminação e erradicação da leishmaniose e de outras doenças negligenciadas, para ser levado à cabo de 2021 a 2030 (OMS, 2021). Portanto, a descoberta de moléculas que possam auxiliar no tratamento de doenças tão devastadoras é um tema de atualíssima relevância, e o uso de metodologias não onerosas para isto — como os métodos *in silico* — é ainda mais saliente.

### 6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A ampliação do estudo *in silico* pode ser realizada através da avaliação da relação quantitativa estrutura/atividade (QSAR) dos compostos de alta afinidade com a enzima TR, bem como estudos de dinâmica molecular. Além disso, a investigação particularizada das demais moléculas que apresentaram alta afinidade de ligação com o alvo molecular — ainda que suas outras características avaliadas *in silico* tenham sido desfavoráveis — poderia levar ao encontro de mais candidatas à novas entidades químicas antileishmania. Claramente, devido à complexidade e dinâmica dos sistemas biológicos (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007a, b), fazem-se necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a possibilidade de uso terapêutico das moléculas destacadas neste trabalho para o tratamento da leishmaniose.

## REFERÊNCIAS

- AARA, N. et al. Clinico-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in bikaner, Rajasthan, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 1, p. 111–115, jul. 2013. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3748465/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23811111/). Acesso em: 13 out. 2021.
- AGARWAL, S.; DUGAR, D.; SENGUPTA, S. Ranking Chemical Structures for Drug Discovery: A New Machine Learning Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 5, p. 716–731, 24 maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci9003865>. Acesso em: 13 out. 2021.
- AGUIAR-PULIDO, V. et al. Evolutionary Computation and QSAR Research. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 9, n. 2, p. 206–225, jun. 2013.
- ALAM, S.; YAO, N. The impact of preprocessing steps on the accuracy of machine learning algorithms in sentiment analysis. **Computational and Mathematical Organization Theory**, v. 25, set. 2019.
- AL-SALEM, W. S. et al. Cutaneous leishmaniasis and conflict in Syria. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 931–933, 2016.
- ALI, J. et al. Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 420–428, fev. 2012.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P.. **Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis**. **Advances in Parasitology**. [S.l.]: Adv Parasitol. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16735166/>. Acesso em: 26 out. 2021.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, dez. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17023215/>. Acesso em: 27 out. 2021.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis: Description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1026–1034, set. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453817/>. Acesso em: 13 out. 2021.
- AMATO, V. et al. [Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate]. **Annales de dermatologie et de venerologie**, v. 125, n. 8, p. 492–495, ago. 1998.
- ANTEZANA, G. et al. Electrocardiographic Alterations during Treatment of Mucocutaneous Leishmaniasis with Meglumine Antimoniate and Allopurinol.

**Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 31–33, 1992.

ASHKAN, M. M.; RAHIM, K. M. Visceral leishmaniasis in paediatrics: a study of 367 cases in southwest Iran: <http://dx.doi.org/10.1258/td.2007.070259>, v. 38, n. 3, p. 186–188, 1 jul. 2008. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/td.2007.070259>. Acesso em: 11 out. 2021.

BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1 dez. 1986. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/154/6/1003/839844>. Acesso em: 13 out. 2021.

BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Anal. Methods**, v. 5, n. 16, p. 3790–3798, 2013.

BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 23 abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm900185q>. Acesso em: 13 out. 2021.

BALANÍA-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, abr. 1998.

BANERJEE, P. et al. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2018.

BARRATT, G.; LEGRAND, P. Comparison of the Efficacy and Pharmacology of Formulations of Amphotericin B Used in Treatment of Leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 527–530, dez. 2005.

BENCHIMOL, J. L. et al. Leishmaniasis: Historical configuration in Brazil with an emphasis on the visceral disease, from the 1930s to the 1960s. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi: Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, 2019.

BERDE, B; STÜRMEER, E. Introduction to the Pharmacology of Ergot Alkaloids and Related Compounds as a Basis of Their Therapeutic Application. In: BERDE, B; SCHILD, H O (Org.). **Ergot Alkaloids Relat. Compd.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1978. p. 1–28. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-66775-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66775-6_1). Acesso em: 01 mar. 2022.

BERKHOLZ, D. S. et al. Catalytic Cycle of Human Glutathione Reductase Near 1 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 382, n. 2, p. 371–384, 3 out. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18638483/>. Acesso em: 7 out. 2021.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BERMAN, J. D. **Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clinical Infectious Diseases**. [S.l.]: Clin Infect Dis, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9145744/>. Acesso em: 27 out. 2021.



BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, n. 1, p. 33–38, jan. 2005.

BERMAN, J; DIETZE, R. Treatment of Visceral Leishmaniasis with Amphotericin B Colloidal Dispersion. **Chemotherapy**, v. 45 Suppl 1, p. 54–66, jun. 1999.

BHATTACHARYA, S. K et al. Efficacy and Tolerability of Miltefosine for Childhood Visceral Leishmaniasis in India. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 2, p. 217–221, jan. 2004.

BOND, C. S. et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81–89, 15 jan. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10368274/>. Acesso em: 7 out. 2021.

BRADLEY, M.; WALSH, C. T.; BÜCHELER, U. S. Redox Enzyme Engineering: Conversion of Human Glutathione Reductase into a Trypanothione Reductase. **Biochemistry**, v. 30, n. 25, p. 6124–6127, 1 jun. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2059620/>. Acesso em: 7 out. 2021.

BRAGA, A. S. da C.; JUNIOR, A. C. de C. T.; RABELLO, A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 55–59, 2013.

BRAGA, R. C. et al. Pred-hERG: a novel web-accessible computational tool for predicting cardiac toxicity. **Mol Inform**, v. 34, n. 10, p. 698–701, 2015.

BRYCE, R. A. What Next for Quantum Mechanics in Structure-Based Drug Discovery? **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2114, p. 339–353, 2020.

BURDACK, J. et al. Systematic Comparison of the Influence of Different Data Preprocessing Methods on the Performance of Gait Classifications Using Machine Learning. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 260, abr. 2020.

BUZZI, M. G. et al. Further Characterization of the Putative 5-HT Receptor Which Mediates Blockade of Neurogenic Plasma Extravasation in Rat Dura Mater. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, n. 2, p. 1421–1428, jun. 1991.

BUZZI, M. G.; MOSKOWITZ, M. A. Evidence for 5-HT<sub>1B/1D</sub> Receptors Mediating the Antimigraine Effect of Sumatriptan and Dihydroergotamine. **Cephalgia: An International Journal of Headache**, v. 11, n. 4, p. 165–168, set. 1991.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de l' «Ulcers de Bauru» avec le bouton d'Orient. **Bull Soc Path Exot**, v. 2, p. 255–256, 1909.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.

CDC. **Parasites:** Leishmaniasis. 2020a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 15 out. 2021.

\_\_\_\_\_. **Parasites:** Leishmaniasis biology. 2020b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 05 ago. 2021.

\_\_\_\_\_. **Parasites:** Leishmaniasis disease. 2020c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>. Acesso em: 10 ago. 2021.

\_\_\_\_\_. **Parasites:** Leishmaniasis life cycle. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 21 ago. 2022.

CHAPPUIS, F. et al. **Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?** *Nature Reviews Microbiology*. [S.l.]: Nat Rev Microbiol, nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938629/>. Acesso em: 27 out. 2021.

COBRE, A. de F. et al. Diagnosis and prediction of COVID-19 severity: can biochemical tests and machine learning be used as prognostic indicators? *Computers in Biology and Medicine*, v. 134, mai. 2021.

COCCHI, M.; BIANCOLILLO, A.; MARINI, F. Chemometric Methods for Classification and Feature Selection. *Comprehensive Analytical Chemistry*, v. 82, p. 265–299, 1 Jan. 2018.

COLLIN, S. et al. Conflict and kala-azar: Determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, n. 5, p. 612–619, 1 mar. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14986243/>. Acesso em: 13 out. 2021.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis: Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. [S.l.]: Trends Parasitol, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14580961/>. Acesso em: 27 out. 2021.

CUNHA, A. M. da; CHAGAS, E. C. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* sp. *Hospital (Rio J)*, v. 11, p. 3–9, 1937.

CUNNINGHAM, D. D. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi Boil. *Sci Mem Med Offic Army India*, v. 1, p. 21–31, 1885.

CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione Reductase from *Leishmania donovani* Purification, Characterisation and Inhibition by Trivalent Antimonials. *European Journal of Biochemistry*, v. 230, n. 2, p. 460–468, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7607216/>. Acesso em: 7 out. 2021.

DAHLIN, J. L; INGLESE, J.; WALTERS, M. A. Mitigating Risk in Academic Preclinical Drug Discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 14, n. 4, p. 279–294, abr. 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V.. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117–1121, jun. 2016.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by *docking* with PyRx. **Methods in Molecular Biology**, v. 1263, n. January, p. 243–250, 2015.

DAS, V. N. R. et al. A Controlled, Randomized Nonblinded Clinical Trial to Assess the Efficacy of Amphotericin B Deoxycholate as Compared to Pentamidine for the Treatment of Antimony Unresponsive Visceral Leishmaniasis Cases in Bihar, India. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, n. 1, p. 117–124, fev. 2009.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. 23 fev. 2001, [S.I.]: Acta Trop, 23 fev. 2001. p. 103–116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11230820/>. Acesso em: 7 out. 2021.

DAWIT, G.; SHISHAY, K. Epidemiology, public health impact and control methods of the most neglected parasite diseases in Ethiopia: A review. **World Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 94–102, 2014.

DE PAULA, C. D. R. et al. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 365–371, 2003.

DEININGER, M. W. Nilotinib. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 13, p. 4027–4031, 1 jul. 2008.

DELANEY, J. S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000–1005, 2004.

DEREURE, J. et al. Visceral leishmaniasis in Sudan: First identifications of Leishmania from dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 154–155, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10897352/>. Acesso em: 7 out. 2021.

DESJEUX, P. **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** [S.I.]: Trans R Soc Trop Med Hyg. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11490989/>. Acesso em: 7 out. 2021. , 2001

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. <https://doi.org/10.1179/000349803225002499>, v. 97, n. SUPPL. 1, out. 2013. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/000349803225002499>. Acesso em: 11 out. 2021.

DESJEUX, P. et al. Report of the post Kala-Azar dermal leishmaniasis (PKDL) consortium meeting, New Delhi, India, 27-29 June 2012. 2013, [S.l.]: Parasit Vectors, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23819611/>. Acesso em: 13 out. 2021.

DHILLON, S. Palbociclib: First Global Approval. **Drugs**, v. 75, n. 5, p. 543–551, 2015.

DOMAN, T. N. et al. Molecular *Docking* and High-Throughput Screening for Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase-1B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2213–2221, maio 2002.

DONG, J. et al. Admetlab: A platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2018.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 2, p. 79, 1903. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2513550/>. Acesso em: 5 out. 2021.

DU, R. et al. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2016.

EIGENVECTOR. **Solo**. Disponível em: <https://eigenvector.com/software/solo/>. Acesso em: 5 jan 2022.

EKINS, S; MESTRES, J; TESTA, B. In Silico Pharmacology for Drug Discovery: Applications to Targets and Beyond. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 21–37, set. 2007a.

\_\_\_\_\_. In Silico Pharmacology for Drug Discovery: Methods for Virtual Ligand Screening and Profiling. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 9–20, set. 2007b.

ELMAHALLAWY, E.; AGIL, A. Treatment of Leishmaniasis: A Review and Assessment of Recent Research. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 17, p. 2259–2275, 2015.

EPHROS, M. et al. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 278–282, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9925518/>. Acesso em: 27 out. 2021.

ERTL, P; ROHDE, B; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714–3717, out. 2000.

ESFANDIARPOUR, I.; DABIRI, S. H. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Recidivans with a Combination of Allopurinol and Meglumine Antimoniate: A Clinical

and Histologic Study. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 8, p. 848–852, ago. 2007.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A.M. **Pharmacokinetics. Biochemical Pharmacology**. [S.l.]: Biochem Pharmacol, jan. 2014.

FAVILLA, S. et al. Assessing Feature Relevance in NPLS Models by VIP. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 129, p. 76–86, 15 Nov. 2013.

FERREIRA, R. S et al. Complementarity between a *Docking* and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4891–4905, jul. 2010.

FU, J. et al. NPV-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial mesenchymal transition and self-renewal of glioblastoma initiating cells by regulating miR-21, miR-128, and miR-200. **Neuro-Oncology**, v. 15, n. 6, p. 691–706, 1 jun. 2013.

FULTON, B.; WAGSTAFF, A. J.; SORKIN, E. M. Doxazosin. **Drugs**, v. 49, n. 2, p. 295–320, 1995.

GASSER, R. A. et al. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 83–90, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7519887/>. Acesso em: 27 out. 2021.

GERTRUDES, J. C. et al. Machine Learning Techniques and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 25, p. 4289–4297, 2012.

GOAD, L. J.; HOLZ, G. G. J.; BEACH, D. H. Sterols of Leishmania Species. Implications for Biosynthesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 10, n. 2, p. 161–170, fev. 1984.

GONG, F. et al. Data Preprocessing for Chromatographic Fingerprint of Herbal Medicine with Chemometric Approaches. **Analytical Letters**, v. 38, n. 14, p. 2475–2492, nov. 2005.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

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

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 1996. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291099-1352%28199601%299%3A1%3C1%3A%3AAID-JMR241%3E3.0.CO%3B2-6>. Acesso em: 11 jun. 2022.



- GOODWIN, L. G.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochemical Journal**, v. 37, n. 2, p. 198–209, 1 jul. 1943. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16747617/>. Acesso em: 7 out. 2021.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current Diagnosis and Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, abr. 2010.
- GRAHAM, J. R.; WOLFF, H. G. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. **Archives of Neurology & Psychiatry**, v. 39, n. 4, p. 737–763, 1938. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1938.02270040093005>. Acesso em: 10 mar. 2022.
- GRECH, V. et al. Visceral leishmaniasis in Malta - An 18 year paediatric, population based study. **Archives of Disease in Childhood**, v. 82, n. 5, p. 381–385, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10799428/>. Acesso em: 11 out. 2021.
- GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12150849/>. Acesso em: 26 out. 2021.
- GUERRA, J. A. de O. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, mar. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21408116/>. Acesso em: 13 out. 2021.
- HANWELL, M. D et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.
- HATFIELD, M. P. D.; LOVAS, S. Conformational Sampling Techniques. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 20, p. 3303–3313, 2014.
- HAY, M. et al. Clinical Development Success Rates for Investigational Drugs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40–51, jan. 2014.
- HERWALDT, B. L.; BERMAN, J. D. Recommendations for Treating Leishmaniasis with Sodium Stibogluconate (Pentostam) and Review of Pertinent Clinical Studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 3, p. 296–306, mar. 1992.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, set. 2018.
- HOSKIN, K. L.; KAUBE, H.; GOADSBY, P. J. Central Activation of the Trigeminovascular Pathway in the Cat Is Inhibited by Dihydroergotamine. A c-Fos and Electrophysiological Study. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 119, p. 249–256, fev. 1996.

HUNTER, W. N. et al. Targeting metabolic pathways in microbial pathogens: Oxidative stress and anti-folate drug resistance in trypanosomatids. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 3, p. 607-610, jun. 2003.

HUNTER, W. N. et al. Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, n. 1, p. 322–333, 5 set. 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1522596/>. Acesso em: 7 out. 2021.

IOWA STATE UNIVERSITY/COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE. Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral). **Iowa State University**, p. 1–11, 2009. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>. Acesso em: 20 out. 2021.

IVERSEN, H. K. et al. Arterial Responses during Migraine Headache. **Lancet (London, England)**, v. 336, n. 8719, p. 837–839, out. 1990.

JACOBY, E. M. et al. Crystal Structure of the Trypanosoma Cruzi Trypanothione Reductase.Mepacrine Complex. **Proteins**, v. 24, n. 1, p. 73–80, jan. 1996.

JAKALIAN, A.; JACK, D. B.; BAYLY, C. I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: II. Parameterization and Validation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 1623–1641, Dec. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12395429/>. Acesso em: 11 jun. 2022.

JHA, T. K. et al. Miltefosine, an Oral Agent, for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795–1800, dez. 1999.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 210, n. 1, p. 163–180, 5 nov. 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2585516/>. Acesso em: 7 out. 2021.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, fev. 1969.

KHALIL, E. A. G. et al. Antimony-Induced Cerebellar Ataxia. **Saudi Medical Journal**, v. 27, n. 1, p. 90–92, jan. 2006.

KHAMIS, M. A.; GOMAA, W.; AHMED, W. F. Machine Learning in Computational Docking. **Artificial Intelligence in Medicine**, v. 63, n. 3, p. 135–152, mar. 2015.

KHAN, H. Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 19, n. 3, p. 216–219, jul. 2014.

KING, J. R.; ACOSTA, E. P. Tipranavir. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 7, p. 665–682, 2006.

KIRCHMAIR, J. et al. Evaluation of the performance of 3D triagem virtual protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection - What can we



learn from earlier mistakes? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 22, n. 3–4, p. 213–228, 2008.

KITCHEN, D. B. et al. *Docking* and scoring in triagem virtual for drug discovery: Methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

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

RIDLEY, D. S. Leishmania and leishmaniasis. **Pathog. Lepr. Relat. Dis.** Nova York: Elsevier, 1988. p. 175–180. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780723610311500229>. Acesso em: 7 out. 2021.

LACY, S. A.; MILES, D. R.; NGUYEN, L. T. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cabozantinib. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 56, n. 5, p. 477–491, 2017.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Org.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. Londres: Academic press, 1987. p. 2–104.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: Side Effects and Toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, dez. 2009.

LANTWIN, C. B. et al. The Structure of Trypanosoma cruzi trypanothione Reductase in the Oxidized and NADPH Reduced State. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 18, n. 2, p. 161–173, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8159665/>. Acesso em: 7 out. 2021.

LEE, L. C.; LIONG, C.; JEMAIN, A. A. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 163, n. Complete, p. 64–75, 2017.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational Methods in Drug Discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694–2718, 2016.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2213, p. 1252–1254, 1903.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, ago. 2005.

LESYNG, B.; MCCAMMON, J. A. Molecular Modeling Methods. Basic Techniques and Challenging Problems. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 60, n. 2, p. 149–167, nov. 1993.

LI, H. et al. Machine-learning scoring functions for structure-based drug lead optimization. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 10, n. 5, p. e1465, 2020.

LIMA, C. H. da S. **1o dia do ciclo de seminário - Química farmacêutica & medicinal**. 2020. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=jdstyc3L-jw>. Acesso em: 21 ago. 2022.

LIMA, M. I. S. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 3, p. 227–232, mar. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19911167/>. Acesso em: 27 out. 2021.

LINARES, G.; RAVASCHINO, E.; RODRIGUEZ, J. Progresses in the Field of Drug Design to Combat Tropical Protozoan Parasitic Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 335–360, 30 jan. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16475941/>. Acesso em: 7 out. 2021.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2001.

LIPTON, R. B. Ergotamine Tartrate and Dihydroergotamine Mesylate: Safety Profiles. **Headache**, v. 37, Suppl 1, p. S33-41, 1997.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Efficacy of Sodium Stibogluconate Alone and in Combination with Allopurinol for Treatment of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 677–684, set. 1997.

LO, Y. et al. Machine Learning in Chemoinformatics and Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1538–1546, ago. 2018.

MAASSENVANDENBRINK, A. et al. Coronary Side-Effect Potential of Current and Prospective Antimigraine Drugs. **Circulation**, v. 98, n. 1, p. 25–30, jul. 1998.

MACHADO, P. R. L. et al. Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. 788–793, mar. 2007.

MAIA, E. H. B. et al. Structure-Based Triagem virtual: From Classical to Artificial Intelligence. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 343, 2020.

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

MARTÍNEZ, L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119264, 2015.

MARY, S. J. J. et al. Quantum Chemical Insight into Molecular Structure, NBO Analysis of the Hydrogen-Bonded Interactions, Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), Drug Likeness and Molecular Docking of the Novel Anti COVID-19 Molecule 2-[(4,6-Diaminopyrimidin-2-Yl)Sulfanyl]-N-(4-Fluorophenyl)Acetamide - Dimer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 244, p. 118825, 5 Jan. 2021.

MASSARO, F.; MOLICA, M.; BRECCIA, M. Ponatinib: a review of efficacy and safety. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 9, p. 847–856, 2018.

MATOUSSI, N. et al. Toxicité cardiaque de l'antimoniato de méglumine (Glucantime®). À propos d'une observation. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 37, n. SUPPL. 3, p. 257–259, 2007a.

MATOUSSI, N. et al. Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 37, Suppl 3, p. S257-9, dez. 2007b.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237–246, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10503249/>. Acesso em: 5 out. 2021.

MCKEAGE, K. Alectinib: A Review of Its Use in Advanced ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. **Drugs**, v. 75, n. 1, p. 75–82, 2015.

MENDEZ, K. M.; BROADHURST, D. I.; REINKE, S. N. The application of artificial neural networks in metabolomics: a historical perspective. **Metabolomics**, v. 15, n. 11, p. 1–14, 2019.

MEYER, M.; WILSON, P.; SCHOMBURG, D. Hydrogen Bonding and Molecular Surface Shape Complementarity as a Basis for Protein Docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, n. 1, p. 199–210, 22 Nov. 1996.

MEYERHOFF, A. U. S. Food and Drug Administration Approval of AmBisome (Liposomal Amphotericin B) for Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 42–51, jan. 1999.

MIGUEL, D. C. et al. Clinical isolates of New World Leishmania from cutaneous and visceral leishmaniasis patients are uniformly sensitive to tamoxifen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 93-94, 2011.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153–1169, 2007.

MISHRA, M. et al. Amphotericin versus Pentamidine in Antimony-Unresponsive Kala-Azar. **Lancet**, v. 340, n. 8830, p. 1256–1257, nov. 1992.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1863–1888, nov. 2013.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated *Docking* with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): A decade of progress and future approaches. *International Journal of Infectious Diseases*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 158-177, 2000.

MUSA, A. et al. Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1674, 2012.

NAVIN, T. R. et al. Placebo-Controlled Clinical Trial of Sodium Stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 528–534, mar. 1992.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. 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, 27 mar. 2020.

NGUEWA, P. A. et al. Pentamidine Is an Antiparasitic and Apoptotic Drug That Selectively Modifies Ubiquitin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 10, p. 1387–1400, out. 2005.

NOBLE, S.; FAULDS, D. Saquinavir. **Drugs**, v. 52, n. 1, p. 93–112, 1996.

NOK, A. J. Arsenicals (Melarsoprol), Pentamidine and Suramin in the Treatment of Human African Trypanosomiasis. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. 71–79, maio 2003.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative Lead Discovery Strategies for Tropical Diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, nov. 2006.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, maio 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. Control of the Leishmaniasis. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 949, p. xii–xiii, 1–186, 2010a.

\_\_\_\_\_. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva. **World Health Organization**, p. 172–172, 2010b.

\_\_\_\_\_. **Leishmaniasis country profile — 2015. 2017.** Disponível em: [http://quarry.essi.upc.edu:8080/who/Country/profiles/LEISHMANIASIS\\_CP\\_BRA\\_2015.pdf](http://quarry.essi.upc.edu:8080/who/Country/profiles/LEISHMANIASIS_CP_BRA_2015.pdf). Acesso em: 22 ago. 2022.

\_\_\_\_\_. Leishmaniasis in high-burden countries: na epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Record**. v. 91, n. 22, p. 285–296, 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254451/WER9122.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 nov. 2021.

\_\_\_\_\_. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly Epidemiological Record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>. Acesso em: 20 nov. 2021.

\_\_\_\_\_. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021-2030. Geneva. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acesso em: 15 dez. 2021.

\_\_\_\_\_. **Leishmaniasis**: overview. 2022a. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em: 05 abr. 2022.

\_\_\_\_\_. **Leishmaniasis**: newsroom. 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 05 abr. 2022.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the Clinic, Resistance and New Developments. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, 2004.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-like Death in *Leishmania Donovanii* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, mar. 2004.

PATHAK, M. K.; YI, T. Sodium Stibogluconate Is a Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatases and Augments Cytokine Responses in Hemopoietic Cell Lines. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3391–3397, 15 set. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11544330/>. Acesso em: 27 out. 2021.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 5<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2013.

PATZ, J. A. et al. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1395–1405, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11113264/>. Acesso em: 7 out. 2021.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Functional Cloning of the Miltefosine Transporter. A Novel P-Type Phospholipid Translocase from *Leishmania* Involved in Drug Resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49965–49971, dez. 2003.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of Experimental Resistance of *Leishmania* to Miltefosine: Implications for Clinical Use. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 9, n. 1–2, p. 26–39, 2006.

PERRY, C. M. Maraviroc. **Drugs**, v. 70, n. 9, p. 1189–1213, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/11203940-000000000-00000>. Acesso em: 01 abr. 2022.

PLOSKER, G. L.; NOBLE, S. Indinavir. **Drugs**, v. 58, n. 6, p. 1165–1203, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00003495-199958060-00011>. Acesso em: 01 abr. 2022.

PRENTIS, R. A. ; LIS, Y.; WALKER, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 387–396, mar. 1988. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2125.1988.tb03318.x>. Acesso em: 10 jan. 2022.

PUBCHEM. **Amphotericin b (Compound)**. 2022a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965#section=2D-Structure>. Acesso em: 21 ago 2022.

\_\_\_\_\_. **Glucantime (Compound)**. 2022b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64953#section=2D-Structure>. Acesso em: 21 ago. 2022.

\_\_\_\_\_. **Miltefosine (Compound)**. 2022c. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3599#section=2D-Structure>. Acesso em: 21 ago. 2022.

\_\_\_\_\_. **Pentamidine (Compound)**. 2022d. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735#section=2D-Structure>. Acesso em: 21 ago. 2022.

\_\_\_\_\_. **Sodium stibogluconate (Compound)**. 2022e. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16683012#section=2D-Structure>. Acesso em: 21 ago. 2022.

RAJU, B. V. S. et al. Genetic typing reveals monomorphism between antimony sensitive and resistant *Leishmania donovani* isolates from visceral leishmaniasis or post kala-azar dermal leishmaniasis cases in India. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1559–1568, out. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22752721/>. Acesso em: 27 out. 2021.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227–250, 2013. Annu Rev Entomol. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317043/>. Acesso em: 7 out. 2021.

RÉDA, C.; KAUFMANN, E.; DELAHAYE-DURIEZ, A. Machine Learning Applications in Drug Development. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 241–252, 2020.

ROBERTS, C. W. et al. Fatty Acid and Sterol Metabolism: Potential Antimicrobial Targets in Apicomplexan and Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 129–142, fev. 2003.

RODRIGUES, T.; BERNARDES, G. J. L. Machine Learning for Target Discovery in Drug Development. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 56, p. 16–22, jun. 2020.



RODRIGUEZ, L. V. et al. A Randomized Trial of Amphotericin B Alone or in Combination with Itraconazole in the Treatment of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 4, p. 525–528, 1995.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of. **Parasitology**, p. 495–507, 2002.

ROHOUSOVA, I. et al. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 8 jul. 2015. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0976-1>. Acesso em: 7 out. 2021.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251, 1 dez. 2014. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4241529/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794042/). Acesso em: 7 out. 2021.

ROSE, Peter W. et al. The RCSB Protein Data Bank: Integrative View of Protein, Gene and 3D Structural Information. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794042/>. Acesso em: 11 jun. 2022.

ROSENFELD, R.; VAJDA, S.; DELISI, C. Flexible *Docking* and Design. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 677–700, 1995.

ROSS, R. Further notes of Leishman's bodies. **Br Med J**, v. 2, p. 1401, 1903a.

\_\_\_\_\_. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v. 2, p. 1261–1262, 1903b.

RUIZ-PEREZ, D. et al. So you think you can PLS-DA? **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. Suppl 1, p. 1–10, 2020.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by Chemotherapeutic Agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, nov. 2011.

SAROUFIM, M. et al. Ongoing epidemic of cutaneous leishmaniasis among Syrian refugees, Lebanon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1712–1715, 2014.

SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. **Foundations of parasitology**. 8<sup>o</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2009.

SCOTT, A. K. Dihydroergotamine: A Review of Its Use in the Treatment of Migraine and Other Headaches. **Clinical Neuropharmacology**, v. 15, n. 4, p. 289–296, ago. 1992.



SEHNAL, D. et al. Mol\* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W431–W437, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W431/6270780>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SHAHIAN, M.; ALBORZI, A. Effect of Meglumine Antimoniate on the Pancreas during Treatment of Visceral Leishmaniasis in Children. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 15, n. 6, p. CR290-3, jun. 2009.

SHAKYA, N.; SANE, S. A.; GUPTA, S. Antileishmanial Efficacy of Fluconazole and Miltefosine in Combination with an Immunomodulator Picroliv. **Parasitology Research**, v. 108, n. 4, p. 793–800, abr. 2011.

SHAMES, S. L. et al. Trypanothione Reductase of Trypanosoma congolense: Gene Isolation, Primary Sequence Determination, and Comparison to Glutathione Reductase. **Biochemistry**, v. 27, n. 14, p. 5014–5019, 1 jul. 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3167026/>. Acesso em: 7 out. 2021.

SHEKHAR, C. In Silico Pharmacology: Computer-Aided Methods Could Transform Drug Development. **Chem. Biol.**, v. 15, p. 413, 2008.

SIEG, J.; FLACHSENBERG, F.; RAREY, M. In Need of Bias Control: Evaluating Chemical Data for Machine Learning in Structure-Based Triagem virtual. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 3, p. 947–961, mar. 2019.

SILICOS-IT. **SILICOS-IT: chemoinformatics services and software**. Disponível em: <http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/index.html>. Acesso em: 31 out. 2021.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of Miltefosine as an Oral Treatment for Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100 Suppl, p. S17-20, dez. 2006.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R.. Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, dez. 2004.

SINGH, U. K. et al. Miltefosine in Children with Visceral Leishmaniasis: A Prospective, Multicentric, Cross-Sectional Study. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 73, n. 12, p. 1077–1080, dez. 2006.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, maio 2004.

\_\_\_\_\_. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. E57-61, out. 2001.

\_\_\_\_\_. Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 3, p. 350–356, 2007.

SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100 Suppl, p. S34-40, dez. 2006.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15: Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 11, p. 2324–2337, 2015.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

SUN, T.; ZHANG, Y. Pentamidine Binds to TRNA through Non-Specific Hydrophobic Interactions and Inhibits Aminoacylation and Translation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 5, p. 1654–1664, mar. 2008.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B Lipid Complex in the Management of Antimony Unresponsive Indian Visceral Leishmaniasis. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 47, n. 2, p. 186–188, fev. 1999.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 377–383, fev. 2004.

\_\_\_\_\_. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21255828/>. Acesso em: 27 out. 2021.

\_\_\_\_\_. New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single-Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short-Course Oral Miltefosine. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 8, p. 1000–1006, out. 2008.

\_\_\_\_\_. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1739–1746, nov. 2002.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: An update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53-63, jan. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23256501/>. Acesso em: 26 out. 2021.

\_\_\_\_\_. Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Kala-Azar. **The National Medical Journal of India**, v. 25, n. 2, p. 85–89, 2012.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral Leishmaniasis: Current Therapeutic Modalities. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 345–352, mar. 2006.

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of Miltefosine for the Treatment of Kala-Azar in India. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 5, p. 394–395, maio 2005.

BIOVIA, Dassault Systèmes. **Discovery Studio Visualizer**, 21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes, 2020.

TALEVI, A. et al. Machine Learning in Drug Discovery and Development Part 1: A Primer. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 129–142, mar. 2020.

TAM, B. et al. Discovery of small-molecule inhibitors targeting the ribosomal peptidyl transferase center (PTC) of *M. tuberculosis*. **Chem. Sci.**, v. 10, n. 38, p. 8764–8767, 2019.

TFELT-HANSEN, P. Ergotamine, Dihydroergotamine: Current Uses and Problems. **Current Medical Research and Opinion**, v. 17 Suppl 1, p. s30-4, 2001.

TFELT-HANSEN, P.; SAXENA, P. R. Ergot Alkaloids in the Acute Treatment of Migraines. In: J, Olesen; P, Tfelt-Hansen; KMA, Welch (Org.). **The Headaches**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 399–409.

THAKUR, C. P. et al. A Prospective Randomized, Comparative, Open-Label Trial of the Safety and Efficacy of Paromomycin (Aminosidine) plus Sodium Stibogluconate versus Sodium Stibogluconate Alone for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 429–431, 2000.

\_\_\_\_\_. Epidemiological, Clinical and Therapeutic Features of Bihar Kala-Azar (Including Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 391–398, 1984.

THAKUR, C. P.; KUMAR, K. Efficacy of Prolonged Therapy with Stibogluconate in Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 91, p. 144–148, mar. 1990.

THAKUR, C. P.; KUMAR, M.; PANDEY, A. K. Comparison of Regimes of Treatment of Antimony-Resistant Kala-Azar Patients: A Randomized Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 4, p. 435–441, out. 1991.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TORRES, D. C. et al. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 727–733, ago. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20478409/>. Acesso em: 27 out. 2021.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of *docking* with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. NA-NA, 2009.

USHA, T. et al. Recent Updates on Computer-Aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 30, p. 3296–3307, 2017.

- VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192–204, 2003.
- VAN GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010. United States.
- VANOMMESLAEGHE, K.; GUVENCH, O.; MACKERELL, A. D. J. Molecular Mechanics. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 20, p. 3281–3292, 2014.
- VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2615–2623, 2002.
- WADHONE, P. et al. Miltefosine Promotes IFN-Gamma-Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7146–7154, jun. 2009.
- WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D. H.; BIRLEY, M. H. Deforestation effects on vector-borne disease. **Parasitology**, v. 106, n. S1, p. S55–S75, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8488073/>. Acesso em: 7 out. 2021.
- WALTER, K. A.; BONK, M. E. Conivaptan: New treatment for hyponatremia. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 64, n. 13, p. 1385–1395, 2007.
- WINNER, P. et al. A Double-Blind Study of Subcutaneous Dihydroergotamine vs Subcutaneous Sumatriptan in the Treatment of Acute Migraine. **Archives of Neurology**, v. 53, n. 2, p. 180–184, fev. 1996.
- \_\_\_\_\_. Office-Based Treatment of Acute Migraine with Dihydroergotamine Mesylate. **Headache**, v. 33, n. 9, p. 471–475, out. 1993.
- WORTMANN, G. et al. A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 261–267, 1 ago. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12115091/>. Acesso em: 27 out. 2021.
- WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 17 set. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15252045/>. Acesso em: 7 out. 2021.
- XIONG, G. et al. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W5–W14, 2021.
- ZHANG, Y. et al. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. **Protein science**, v. 5, n. 1, p. 52–61, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8771196/>. Acesso em: 7 out. 2021.
- ZHANG, Y. et al. A Combined Drug Discovery Strategy Based on Machine Learning and Molecular Docking. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 5, p. 685–699,

1 May 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30688405/>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of Liposomal Amphotericin B against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 752–756, abr. 1997.

ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of Renal Impairment on the Pharmacokinetics of Antimony in Hamsters. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, n. 8, p. 793–800, dez. 2004.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: Clinical presentation and differential diagnosis. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 1, p. 136–143, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10886148/>. Acesso em: 13 out. 2021.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 87–98, fev. 2003.