



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS  
CENTRO DE CIÊNCIAS INTEGRADAS - CCI  
CURSO DE LICENCIATURA EM FÍSICA

**GISLAINE ALVES DA SILVA**

Identificação de potenciais inibidores da Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS)  
para terapia antileishmania: perspectivas a partir de triagem virtual baseada em estrutura e  
dinâmica molecular

ARAGUAÍNA (TO)

2024

**GISLAINE ALVES DA SILVA**

Identificação de potenciais inibidores da Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) para terapia antileishmania: perspectivas a partir de triagem virtual baseada em estrutura e dinâmica molecular

Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Licenciatura em Física da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obter o título de licenciado em Física.  
Prof<sup>o</sup>. Dr. Danilo da Silva Olivier.

ARAGUAÍNA (TO)

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Geração de Ficha Catalográfica SGFC-UFNT  
**Gerado automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

A474i Alves da Silva, Gislaine.

Identificação de potenciais inibidores da Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) para terapia antileishmania: perspectivas a partir de triagem virtual baseada em estrutura e dinâmica molecular / Gislaine Alves da Silva. - Centro de Ciências Integradas - CCI, TO, 2024.

77 f.

Monografia Graduação (Graduação - em Física) -- Universidade Federal do Norte do Tocantins, 2024.

Orientador: Danilo da Silva Olivier.

1. Doenças Tropicais Negligenciadas. 2. Leishmaniose Tegumentar. 3. Dinâmica Molecular.

**CDD 530**

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.


**Gislaine Alves da Silva**

Identificação de Potenciais Inibidores da Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) para Terapia Antileishmania: perspectivas a partir de Triagem Virtual Baseada em Estrutura e Dinâmica Molecular

Monografia apresentada à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas (CCI), curso de Licenciatura em Física. Foi avaliada para a obtenção do título de licenciada em Física e aprovada em sua forma final pela orientadora e pela banca examinadora.


Data da aprovação: 24 de fevereiro de 2025

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **DANILO DA SILVA OLIVIER**  
Data: 24/02/2025 18:33:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Danilo da Silva Olivier - Orientador (UFNT)

Documento assinado digitalmente  
 **REGINA LELIS DE SOUSA**  
Data: 24/02/2025 18:57:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Lélis de Sousa - Membro interno (UFNT)

Documento assinado digitalmente  
 **ERICA CUPERTINO GOMES**  
Data: 25/02/2025 11:33:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erica Cupertino Gomes - Membro interno (UFNT)

*Dedico esta monografia aos meus amados pais, maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste Trabalho de Conclusão de Curso foi uma jornada desafiadora e enriquecedora, viabilizada pelo apoio e contribuição de muitas pessoas.

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança ao longo desse percurso. À minha família, em especial aos meus pais, por seu amor incondicional, apoio emocional e compreensão durante os momentos de maior dedicação a este projeto. Seu incentivo foi essencial para que eu pudesse seguir em frente.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Danilo S. Olivier, por sua paciência, orientação e dedicação, cujos ensinamentos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Também agradeço às professoras Profa. Dr<sup>a</sup>. Regina Lélis e Profa. Dr<sup>a</sup>. Érica Cupertino, pela contribuição à minha formação acadêmica e pelo compartilhamento de conhecimentos valiosos que enriqueceram minha trajetória.

Sou igualmente grato aos meus amigos e colegas de turma, especialmente a Marcos Oliveira, Kaio Cesar e Edson da Silva M., pelo apoio, pelas trocas de ideias e pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve e motivadora.

Aos profissionais e instituições que contribuíram com dados, informações e recursos técnicos, agradeço pela disponibilidade e colaboração, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Além disso, este trabalho contou com o suporte da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da PROPESQ/UFNT, através do Edital nº 032/2022, e com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT), assim como o auxílio financeiro da PROEX/UFNT, via Edital nº 001/2024.

Por fim, expresso minha gratidão a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta conquista. Este trabalho é fruto de um esforço coletivo, e cada contribuição foi essencial para sua realização.

Com gratidão, Gislaine A. Silva

*“De tudo ao meu amor serei atento antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto que mesmo em face  
do maior encanto dele se encante mais meu pensamento.  
Quero vivê-lo em cada vão momento e em seu louvor hei de espalhar meu canto e rir meu riso e  
derramar meu pranto ao seu pesar ou seu contentamento...”*  
*(Soneto de Fidelidade, Vinicius de Moraes, 1960)*

## RESUMO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) englobam cerca de 20 enfermidades prevalentes em regiões de baixa renda, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Dentre elas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) se destaca como uma doença crônica que afeta a pele e as cartilagens, sendo endêmica em 88 países, com 90% dos casos concentrados em seis nações, incluindo o Brasil. Nos últimos 21 anos, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) registrou mais de um milhão de casos de LT, com uma média anual de 52.645 notificações, posicionando o Brasil como o país com maior incidência. O objetivo central deste estudo foi identificar moléculas com potencial ação bloqueadora da enzima Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) de *Leishmania amazonensis*, utilizando técnicas computacionais de *Virtual Screening*, *Docking Molecular* e Dinâmica Molecular. A DHFR-TS é uma enzima essencial para a biossíntese de pirimidinas, e sua inibição pode levar à incorporação excessiva de uracila no DNA, resultando em morte celular do parasita. No entanto, ainda não há um modelo estrutural experimentalmente resolvido para a DHFR-TS. Para preencher essa lacuna, este estudo propôs um modelo estrutural da DHFR-TS por homologia, utilizando o servidor *Swiss-Model* e a DHFR-TS de *Trypanosoma cruzi* como referência, devido à similaridade de 69,22%. O modelo foi refinado por meio de simulações de Dinâmica Molecular (DM) realizadas no *AMBER22*, com o campo de forças FF19SB, durante 100 ns. Em seguida, foi realizada uma triagem virtual utilizando a base de dados *DrugBank*, que contém 9.213 compostos. Esses compostos foram analisados por meio de ancoragem molecular no *AutoDock Vina*, com base no modelo refinado. Os melhores compostos foram selecionados com base na função de pontuação do *AutoDock Vina* e avaliados detalhadamente no *Pymol* e no *Discovery Studio* para identificar interações proteína-ligante. Dessa triagem, dez moléculas com energias de ligação variando entre -10,5 e -8,1 kcal/mol foram identificadas como potenciais inibidoras da DHFR-TS. Esses compostos apresentaram interações significativas com aminoácidos-chave no sítio ativo da enzima e com outros resíduos importantes, destacando-se como candidatos promissores para o desenvolvimento de fármacos. Os resultados obtidos fornecem uma base sólida para futuras investigações, como a realização de simulações de DM dos complexos proteína-ligantes. Além disso, este estudo demonstra a viabilidade de integrar técnicas computacionais, como modelagem molecular, simulações de DM e triagem virtual, para acelerar a descoberta de novos agentes terapêuticos contra doenças negligenciadas, como a LT.

**Palavras-chave:** Doenças Tropicais Negligenciadas; Leishmaniose Tegumentar; Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase; Inibição Enzimática; Dinâmica Molecular.

## ABSTRACT

Neglected Tropical Diseases (NTDs) encompass approximately 20 prevalent illnesses in low-income regions, as defined by the World Health Organization (WHO). Among these, Cutaneous Leishmaniasis (CL) stands out as a chronic disease affecting the skin and cartilage, endemic in 88 countries, with 90% of cases concentrated in six nations, including Brazil. Over the past 21 years, the Pan American Health Organization (PAHO) has reported over one million cases of CL, with an annual average of 52,645 notifications, positioning Brazil as the country with the highest incidence. The central objective of this study was to identify molecules with potential blocking action against the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (DHFR-TS) enzyme of *Leishmania amazonensis*, using computational techniques such as Virtual Screening, Molecular Docking, and Molecular Dynamics. DHFR-TS is an essential enzyme for pyrimidine biosynthesis, and its inhibition can lead to excessive uracil incorporation into DNA, resulting in parasite cell death. However, there is still no experimentally resolved structural model for DHFR-TS. To address this gap, this study proposed a structural model of DHFR-TS through homology modeling, using the Swiss-Model server and the DHFR-TS of *Trypanosoma cruzi* as a reference, due to their 69.22% similarity. The model was refined through Molecular Dynamics (MD) simulations performed in AMBER22 with the FF19SB force field, over 100 ns. Subsequently, a virtual screening was conducted using the DrugBank database, which contains 9,213 compounds. These compounds were analyzed through molecular docking in AutoDock Vina, based on the refined model. The top compounds were selected based on the scoring function of AutoDock Vina and evaluated in detail using PyMOL and Discovery Studio to identify protein-ligand interactions. From this screening, ten molecules with binding energies ranging from -10.5 to -8.1 kcal/mol were identified as potential DHFR-TS inhibitors. These compounds showed significant interactions with key amino acids in the enzyme's active site and other important residues, emerging as promising candidates for drug development. The results provide a solid foundation for future investigations, such as MD simulations of protein-ligand complexes. Furthermore, this study demonstrates the feasibility of integrating computational techniques, such as molecular modeling, MD simulations, and virtual screening, to accelerate the discovery of new therapeutic agents against neglected diseases like CL.

**Keywords:** Neglected Tropical Diseases; Cutaneous Leishmaniasis; Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase; Enzyme Inhibition; Molecular Dynamics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura geral de um aminoácido: o grupo carboxila (COOH) está em vermelho, o grupo amino (NH <sub>3</sub> ) está em azul, o carbono ( $\alpha$ ) está em cinza, o grupo R está em roxo e o átomo de hidrogênio (H) em branco. . . . .	22
Figura 2	– Ligação peptídica ocorre entre o grupamento -COOH de um aminoácido com o grupamento -NH <sub>2</sub> de outro. . . . .	23
Figura 3	– Apresentação dos 20 aminoácidos naturais que compõe as proteínas e classificações conforme suas propriedades químicas. . . . .	25
Figura 4	– Exemplo das estruturas que compõe uma proteína . . . . .	26
Figura 5	– Reações realizadas pela DHFR-TS. . . . .	29
Figura 6	– Representação esquemática do <i>Virtual Screening</i> . . . . .	41
Figura 7	– Alinhamento das sequências primárias da DHFR-TS com o modelo 3IRM. Fonte: Servidor web <i>Swiss-Model</i> . . . . .	45
Figura 8	– Estrutura gerada por homologia para a enzima bifuncional DHFR-TS da <i>Leishmania amazonensis</i> , as cores azul e verde representam os domínios da DHFR e TS respectivamente. . . . .	46
Figura 9	– Root Mean Square Deviation (RMSD). Na cor laranja está o resultado da DM1 e na cor magenta está o resultado da DM2. . . . .	47
Figura 10	– Flutuação quadrática Média das raízes (RMSD e Estrutura secundária (DSSP)).	48
Figura 11	– Raio de Giro (RG) para estudo da compactação das estruturas proteicas durante a simulação da dinâmica molecular. . . . .	49
Figura 12	– Área de superfície acessível ao solvente (Surf) em angströms quadrado para as duas réplicas da DHFR-TS durante a simulação. . . . .	51
Figura 13	– Análise de agrupamento (clustering) e distribuição das populações conformacionais para duas simulações de DM. . . . .	52
Figura 14	– Alinhamento estrutural dos modelos representativos com maior porcentagens do <i>cluster</i> . a ordem da DM estão respectivamente representadas nas cores laranja e rosa. . . . .	53
Figura 15	– Representação em 3D e 2D do composto DB12622 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2. . . . .	57

Figura 16 – Representação em 3D e 2D do composto DB11913 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2. . . . .	59
Figura 17 – Representação em 3D e 2D do composto DB12513 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2. . . . .	61
Figura 18 – Representação em 3D e 2D do composto DB11829 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2. . . . .	62
Figura 19 – Representação em 3D e 2D do composto DB06888 em interação com os modelos obtidos da: A) Modelo 1 e B) modelo 2. . . . .	64
Figura 20 – Diagrama de interação de 16 compostos comuns a todas as cinco réplicas, ordenados por pontuação de energia (da mais alta para a mais baixa) pela classificação dos resultados da primeira dinâmica molecular. . . . .	66

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>LEISHMANIOSE</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS</b>	<b>21</b>
2.2.1	Estrutura das Proteínas	25
2.2.2	Algumas funções Biológicas das Proteínas	27
<b>2.3</b>	<b>DIHIDROFOLATO REDUTASE - TIMIDILATO SINTASE</b>	<b>27</b>
2.3.1	Papel da DHFR no Metabolismo do Folato e Síntese de Timidina	28
<b>2.4</b>	<b>MODELAGEM E INTERAÇÕES BIOMOLECULARES</b>	<b>29</b>
2.4.1	Modelagem por Homologia	30
2.4.2	Dinâmica Molecular - DM	31
2.4.3	<i>Docking Molecular</i>	34
2.4.4	<i>Virtual Screening</i> - VS	35
2.4.5	Interação Proteína-ligante	36
2.4.6	Ferramentas computacionais utilizadas	38
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>MODELAGEM POR HOMOLOGIA</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b><i>DOCKING MOLECULAR E VIRTUAL SCREENING</i></b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR (MD)</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISE</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>MODELAGEM POR HOMOLOGIA E DINÂMICA MOLECULAR</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b><i>VIRTUAL SCREENING</i></b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) constituem um grupo de cerca de 20 enfermidades infecciosas e parasitárias reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Essas doenças afetam desproporcionalmente populações que vivem em regiões tropicais e subtropicais, predominantemente em situação de pobreza extrema. A vulnerabilidade social é um traço marcante nos territórios endêmicos, onde há sérias deficiências no acesso à água potável, ao saneamento básico, a moradias seguras e a serviços de saúde de qualidade (Yamey; Torrele, 2002; Organization, 2023).

De acordo com estimativas da OMS, cerca de 1,5 bilhão de pessoas em mais de 149 países são atingidas por uma ou mais dessas enfermidades, resultando em aproximadamente 200 mil mortes por ano (Organization, 2023). No entanto, o impacto das DTNs vai além da letalidade: elas provocam incapacidades físicas e mentais, sofrimento crônico, estigmatização social e sérias perdas econômicas, tanto individuais quanto coletivas. Esses efeitos criam um ciclo vicioso, no qual a pobreza facilita a propagação das doenças, e estas, por sua vez, perpetuam a exclusão social e econômica das comunidades afetadas.

Embora concentradas em áreas com clima quente e baixa renda — como América do Sul, África Subsaariana, Sudeste Asiático e partes do Oriente Médio —, as DTNs não são exclusivas do Sul Global. Casos também têm sido registrados em regiões de países desenvolvidos, especialmente em áreas marginalizadas, com condições precárias de habitação e saneamento, ou em comunidades de imigrantes vindos de zonas endêmicas (Organization, 2023; Hotez *et al.*, 2007). No Brasil, doenças como Dengue, Malária, Leishmaniose e Doença de Chagas representam sérios desafios para o sistema público de saúde (Martins-Melo *et al.*, 2018; Lindoso; Lindoso, 2009).

As DTNs apresentam características que contribuem para sua perpetuação. Uma delas é a sua estreita correlação com ambientes marcados pela carência de infraestrutura básica — como ausência de redes de esgoto, coleta regular de lixo, drenagem pluvial e fornecimento de água tratada —, que favorecem a proliferação de vetores e microrganismos patogênicos (Yamey; Torrele, 2002; Organization, 2010). Apesar da gravidade do problema, muitas dessas enfermidades poderiam ser controladas ou eliminadas por meio de intervenções relativamente simples e de baixo custo, como campanhas de vacinação, melhorias nas habitações, ações

educativas e programas de controle vetorial.

Entretanto, a persistência das doenças negligenciadas se deve não apenas a fatores estruturais, mas também a uma conjuntura de negligência política, falta de investimentos e desinteresse da indústria farmacêutica, que tende a priorizar doenças com maior retorno financeiro (Feasey; Wansbrough-Jones; Mabey; Solomon, 2010; Hotez *et al.*, 2007). Essa falta de incentivo ao desenvolvimento de medicamentos e estratégias terapêuticas inovadoras é um dos maiores entraves enfrentados pelas políticas de enfrentamento às DTNs.

As causas dessas doenças são diversas e envolvem diferentes grupos de patógenos — helmintos, bactérias, vírus e protozoários. No cenário brasileiro, destacam-se os vírus responsáveis por Dengue, Zika e Chikungunya, e os protozoários causadores da Leishmaniose e da Doença de Chagas. Apesar de apresentarem estruturas biológicas variadas, muitos desses microrganismos compartilham alvos bioquímicos semelhantes, como enzimas essenciais à sua sobrevivência e reprodução. A identificação e inibição desses alvos têm sido uma das principais estratégias na busca por terapias mais eficazes, especialmente para a Leishmaniose (Andrade *et al.*, 2019; Islan *et al.*, 2017; Weng; Chen; Wang, 2018; Ong; Roy; Andrews; Gasser, 2019).

Nesse sentido, frente aos altos custos e à complexidade do desenvolvimento de novos medicamentos, estratégias alternativas como o reposicionamento de fármacos têm ganhado destaque. Essa abordagem consiste em redirecionar medicamentos já aprovados ou em fases avançadas de desenvolvimento para o tratamento de outras doenças, aproveitando seu perfil de segurança previamente estabelecido (Pushpakom *et al.*, 2019). Tal estratégia se mostra promissora especialmente em contextos de doenças negligenciadas, pois permite acelerar a chegada de novos tratamentos à população e reduzir os investimentos financeiros envolvidos. Trabalhos recentes demonstram importantes avanços nessa área, com foco em doenças como a Leishmaniose (Andrade *et al.*, 2019; Winkler, 2021).

Além disso, o uso de tecnologias computacionais tem revolucionado a pesquisa biomédica. Técnicas como *Virtual Screening* permitem realizar triagens virtuais de milhares de compostos para identificar candidatos com maior potencial de se ligarem a alvos terapêuticos específicos. Um exemplo de alvo promissor é a enzima bifuncional diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS), essencial para a replicação do DNA em parasitas tripanossomatídeos. Essa enzima catalisa reações críticas para a biossíntese de nucleotídeos, e sua inibição compromete a divisão celular dos parasitas (Vickers; Beverley, 2011; Gilbert, 2002).

Diferente dos seres humanos, em que as funções de DHFR e TS são executadas por

proteínas distintas, os tripanossomatídeos expressam essas duas funções em uma única enzima, codificada por um gene único (Ivanetich; Santi, 1990). Essa peculiaridade estrutural oferece uma oportunidade para o desenvolvimento de inibidores seletivos que afetem exclusivamente o parasita, minimizando os efeitos colaterais nos hospedeiros humanos (Vickers; Beverley, 2011; Shamshad; Bakri; Mirza, 2022). Compostos antifolatos como metotrexato, pirimetamina e trimetoprima ilustram o potencial dessa abordagem (Vickers; Beverley, 2011; Shamshad; Bakri; Mirza, 2022).

Por fim, ferramentas como modelagem molecular, simulações de dinâmica molecular, *docking* e análise de propriedades farmacocinéticas contribuem para reduzir o tempo e os custos no processo de descoberta de novos fármacos (Andrade *et al.*, 2019; Winkler, 2021). Tais métodos representam uma convergência entre biologia molecular, química computacional e inteligência artificial, abrindo novas possibilidades para o combate às DTNs, especialmente em contextos onde os recursos são escassos e as soluções precisam ser viáveis e acessíveis.

Este trabalho está organizado da seguinte forma:

O capítulo 1, apresenta a introdução do estudo, destacando a relevância da pesquisa no contexto das Doenças Tropicais Negligenciadas, com ênfase especial na Leishmaniose Tegumentar. Também são apresentados a justificativa e os objetivos do trabalho, situando a enzima DHFR-TS como alvo terapêutico estratégico.

O capítulo 2 desenvolve o referencial teórico, abordando os principais conceitos sobre a Leishmaniose, incluindo sua etiologia, epidemiologia e terapias disponíveis. São discutidos os fundamentos bioquímicos da enzima DHFR-TS e os princípios das ferramentas computacionais aplicadas à triagem de fármacos.

No capítulo 3, descreve-se a metodologia empregada, detalhando as técnicas computacionais utilizadas, como a modelagem por homologia para gerar a estrutura da DHFR-TS, simulações de dinâmica molecular para avaliar sua estabilidade, e técnicas de *docking* molecular e triagem virtual para identificar potenciais inibidores. Ferramentas como *AutoDock Vina*, *Amber22*, *CPPTRAJ*, *PyMOL* e *Discovery Studio* foram utilizadas para análise das interações e dinâmica conformacional.

O capítulo 4 apresenta e analisa os resultados obtidos, desde a modelagem da enzima até a identificação dos compostos com maior afinidade. São exploradas suas propriedades químicas e interações com a DHFR-TS, com base em dados de *docking* e simulações de dinâmica molecular.

Por fim, o capítulo 5 reúne as considerações finais, discutindo os principais achados,

suas implicações terapêuticas e perspectivas para pesquisas futuras. Também são abordadas as limitações da metodologia empregada.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Tegumentar, particularmente em sua forma cutânea, representa um sério desafio de saúde pública em diversas regiões do mundo, especialmente na América do Sul, África, Ásia e Oriente Médio. No Brasil, a situação é agravada pela circulação de diferentes espécies do parasita, como a *Leishmania amazonensis*, que contribuem para a persistência e complexidade epidemiológica da doença em áreas endêmicas. Os impactos da Leishmaniose vão muito além da esfera clínica: a enfermidade provoca deformidades físicas, estigmatização social e prejuízos emocionais e econômicos, afetando de forma desproporcional populações em situação de vulnerabilidade.

A ausência de vacinas profiláticas eficazes, a toxicidade dos medicamentos disponíveis, a crescente resistência parasitária aos tratamentos convencionais — como os antimoniais pentavalentes — e a limitada inovação farmacológica nas últimas décadas evidenciam um cenário preocupante. Muitos dos fármacos utilizados apresentam efeitos adversos graves, baixa especificidade e custo elevado, tornando o tratamento longo, oneroso e, por vezes, ineficaz. Nesse contexto, a busca por terapias mais seguras, acessíveis e eficazes torna-se uma prioridade urgente, especialmente em países endêmicos como o Brasil, onde a carga da doença é alta e os sistemas de saúde enfrentam limitações estruturais.

A identificação de novos alvos moleculares tem se mostrado uma estratégia promissora para superar esses entraves. A enzima bifuncional diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) destaca-se como um desses alvos relevantes por sua função essencial na síntese de timidina e na replicação do DNA do parasita. A inibição dessa enzima pode comprometer de forma seletiva o metabolismo dos tripanossomatídeos, interrompendo seu ciclo de vida e levando à morte celular, com reduzido impacto sobre as células humanas.

Aliada a isso, a incorporação de ferramentas computacionais ao processo de descoberta de fármacos tem revolucionado a pesquisa biomédica. Abordagens como a triagem virtual (Virtual Screening) e a modelagem molecular permitem avaliar, de forma ágil e precisa, a interação entre compostos candidatos e seus alvos terapêuticos, otimizando recursos e acelerando o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentro dessa perspectiva, o reposicionamento de fármacos — isto é, a redestinação de medicamentos já aprovados ou em fases avançadas de estudo

para novas indicações — emerge como uma alternativa estratégica e viável, especialmente em se tratando de doenças negligenciadas, para as quais o investimento industrial é historicamente limitado.

Essa abordagem é particularmente relevante para contextos com poucos recursos, onde a rapidez na implementação de soluções terapêuticas pode representar a diferença entre o controle e a expansão da doença. Considerando ainda o cenário de mudanças climáticas e o aumento da mobilidade global, a Leishmaniose tende a ultrapassar suas fronteiras históricas, com riscos potenciais de expansão para regiões até então não endêmicas, como países da Europa e da América do Norte.

Dessa forma, este estudo justifica-se pela urgência em desenvolver novas alternativas terapêuticas para a Leishmaniose Tegumentar, utilizando tecnologias de triagem computacional e reposicionamento de fármacos como ferramentas centrais. Trata-se de uma proposta alinhada aos esforços globais por inovação em saúde pública, com potencial para oferecer soluções mais eficazes, seguras e acessíveis à população, mitigando os impactos sanitários, sociais e econômicos da doença e contribuindo para o enfrentamento das Doenças Tropicais Negligenciadas como um todo.

## **1.2 OBJETIVO**

Identificar moléculas com potencial ação bloqueadora da enzima Dihidrofolato Redutase Timidilato Sintase (DHFR-TS) da *Leishmania amazonensis* utilizando técnicas computacionais de *Virtual Screening*, *Docking Molecular* e Dinâmica molecular.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

O referencial teórico constitui a conceitual and científica base that sustents the investigation proposed, fornecendo a panorama abrangente sobre os conhecimentos já estabelecidos. Neste capítulo, será abordados os principais conceitos, teorias e evidências científicas relacionadas à Leishmaniose Tegumentar, com ênfase em sua etiologia, epidemiologia e os desafios associados ao seu tratamento. Além disso, será tratado sobre os aminoácidos e os quatro níveis de estrutura das proteínas, com foco na enzima DHFR-TS, que tem se destacado como um alvo promissor no desenvolvimento de fármacos contra a leishmaniose.

Explora também os mecanismos e ferramentas computacionais utilizadas para avançar no desenvolvimento de novos medicamentos, com destaque para os *softwares* empregados em pesquisas baseadas em simulações computacionais, *in silico*, como modelagem molecular, dinâmica molecular, triagem virtual e *docking* molecular. Essas abordagens permitem prever interações entre proteínas e ligantes, otimizando a identificação de compostos com potencial terapêutico. A revisão desse arcabouço teórico é fundamental para contextualizar a pesquisa, justificar sua relevância e orientar a busca por soluções mais eficazes no combate à doença.

### 2.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses constituem um grupo de doenças crônicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae*. Esses parasitas são transmitidos aos hospedeiros vertebrados, incluindo seres humanos, por meio da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos (Dostálová; Volf, 2012). Essas enfermidades representam um grave problema de saúde pública global, devido ao alto índice de negligência, elevadas taxas de morbidade e mortalidade, e à complexidade de seu controle (Alvar *et al.*, 2012; Salam; Al-Shaqha; Azzi, 2014).

A ocorrência de surtos epidemiológicos está associada a diversos fatores, como migrações populacionais, urbanização rápida e desordenada, e condições individuais de risco, incluindo a coinfeção com o HIV (Lindoso; Moreira; Cunha; Queiroz, 2018). Além disso, condições socioeconômicas precárias e a falta de acesso a serviços básicos de saúde aumentam o risco de contrair a doença (Okwor; Uzonna, 2016).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam

conforme a espécie de *Leishmania* infectante e as condições imunológicas do hospedeiro (Silva *et al.*, 2022). Clinicamente, podem ser classificadas em duas formas principais:

Leishmaniose Tegumentar (LT): Causada por espécies como *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. infantum*; *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis*.

Leishmaniose Visceral (LV): Também conhecida como Kalazar, é causada principalmente por espécies do complexo *L. donovani*, incluindo *L. infantum* e *L. chagasi* (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Estima-se que aproximadamente 1 bilhão de pessoas vivam em áreas de risco para a transmissão das leishmanioses, com 12 milhões de indivíduos diretamente afetados em todo o mundo (Organization, 2020). A leishmaniose é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas (DTNs), sendo a segunda maior causa de mortes por doenças parasitárias, superada apenas pela malária, e uma das principais causas de morbidade em regiões endêmicas (Alvar *et al.*, 2012). Anualmente, ocorrem entre 50 mil e 90 mil casos de leishmaniose visceral, com mais de 90% dos casos registrados em países como Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (Burza; Croft; Boelaert, 2018). A mortalidade associada à leishmaniose visceral pode variar entre 5% e 20%, dependendo do acesso a diagnóstico e tratamento, especialmente em regiões mais vulneráveis (Organization, 2020).

A leishmaniose tegumentar, classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), dentre as três categorias, de acordo com seu impacto na saúde pública e potencial de disseminação, como uma doença emergente de categoria 1, que é a categoria que representa um risco significativo a saúde global, concentra a maioria dos casos em regiões tropicais e subtropicais, com destaque para o Brasil, Síria, Afeganistão e países do Mediterrâneo (Organization, 2020). A forma mucocutânea da doença, que pode causar lesões graves e desfigurantes, registra cerca de 20 mil a 30 mil casos anuais, principalmente no Brasil, Peru e Bolívia (Reithinger *et al.*, 2007).

A transmissão das leishmanioses ocorre predominantemente por meio de insetos flebotomíneos hematófagos da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Cerca de trinta espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são vetores da doença, sendo encontradas em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Guimarães *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 1998; Singh; Sacks; Sundar, 2014). No Brasil, esses insetos são popularmente conhecidos como mosquito-palha, tatuquira ou birigui (Goto; Lindoso, 2010).

Cães e mamíferos silvestres, como roedores, marsupiais, edentados e primatas, atuam

como reservatórios dos parasitas. Embora a transmissão vetorial seja a mais comum, outras formas menos frequentes incluem transfusão de sangue, acidentes ocupacionais<sup>1</sup>, infecções venéreas e transmissão congênita (Elmahallawy *et al.*, 2014; Owens *et al.*, 2001).

A *Leishmania amazonensis* (La) é uma das espécies causadora da leishmaniose tegumentar (LT), que afeta principalmente a pele e as mucosas do indivíduo, levando a úlceras e lesões que podem ser desfigurantes. Esta doença é endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais, com destaque para áreas da América Latina, incluindo o Brasil, onde a *Leishmania amazonensis* é uma das principais causadoras da forma tegumentar da doença (Brasil, 2017; Grimaldi; Tesh, 1993).

A leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania amazonensis* é uma doença que apresenta diferentes manifestações clínicas, variando de lesões cutâneas simples a formas mais graves e desfigurantes. A forma mais comum é caracterizada por úlceras de bordas elevadas e fundo necrosado, frequentemente crônicas na ausência de tratamento. Essas lesões, predominantes em áreas expostas como rosto, braços e pernas, podem causar prurido, dor e, em casos mais graves, sintomas sistêmicos como febre prolongada, perda de peso e linfadenopatia (Gontijo; Carvalho, 2003).

Embora mais raras, formas mucocutâneas podem surgir, resultando na destruição das mucosas das vias respiratórias superiores, como nariz, boca e faringe, com potencial para causar deformidades significativas. Casos mais severos podem levar à disseminação das lesões para outras partes do corpo ou órgãos internos, embora isso seja incomum com *L. amazonensis* (Silveira; Lainson; Corbett, 2004; Barral *et al.*, 1991).

O diagnóstico é feito por meio de exame clínico e confirmado por técnicas laboratoriais, como a identificação do parasita em biópsias por microscopia direta, cultura ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Testes sorológicos também podem ser úteis para detectar anticorpos ou antígenos específicos (Organization, 2020; Brasil, 2017).

O tratamento geralmente envolve o uso de medicamentos antimoniais, como o antimoniato de meglumina, administrados por via intramuscular ou intravenosa. Outras opções incluem anfotericina B, miltefosina e terapia combinada, dependendo da gravidade e localização das lesões. Em casos selecionados<sup>2</sup>, terapias tópicas ou fototerapia podem ser eficazes (Sundar; Chakravarty, 2013; Koff; Rosen, 1994; Amato *et al.*, 2007).

<sup>1</sup> Acidentes ocupacionais refere-se a acidentes de trabalho seja por profissionais de laboratório, profissionais da saúde, trabalhadores em áreas endêmicas e manipulações de animais

<sup>2</sup> Lesões leves e localizadas, Pacientes com Contraindicações a Tratamentos Sistêmicos, Resistência ou Falha ao Tratamento Convencional e em casos de preferência do paciente

A prevenção da leishmaniose tegumentar baseia-se no controle dos mosquitos flebotomíneos, com o uso de repelentes, inseticidas e medidas de proteção individual em áreas endêmicas (Organization, 2020; Brasil, 2017).

Além do impacto físico, a doença afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Lesões visíveis, como as no rosto, frequentemente levam a estigmatização, problemas psicossociais e isolamento social. Cicatrizes e deformidades resultantes também podem gerar ansiedade, depressão e incapacidade laboral, contribuindo para um impacto econômico e social considerável (David; Craft, 2009).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania amazonensis* (La) representa um desafio de saúde pública. A falta de acesso a medidas preventivas, a expansão das áreas endêmicas e as dificuldades no diagnóstico e tratamento continuam sendo obstáculos significativos. O tratamento atual da leishmaniose tegumentar baseia-se principalmente no uso de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina, e em alternativas como a anfotericina B e a miltefosina. No entanto, essas terapias apresentam uma série de problemas que comprometem sua eficácia e acessibilidade. (Brasil, 2017; Koff; Rosen, 1994).

Um dos principais desafios do tratamento da leishmaniose tegumentar é a toxicidade e os efeitos colaterais associados aos medicamentos. Os antimoniais pentavalentes, por exemplo, podem causar cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e pancreatite, limitando seu uso em pacientes com comorbidades (Koff; Rosen, 1994; Amato *et al.*, 2007), enquanto a anfotericina B, apesar de eficaz, pode levar a nefrotoxicidade e reações infusionais, exigindo monitoramento rigoroso (Sundar; Chakravarty, 2013). Além disso, há relatos de resistência do parasita aos antimoniais, especialmente em regiões endêmicas, comprometendo a eficácia do tratamento (Croft; Coombs, 2003). A longa duração do tratamento (20 a 30 dias) dificulta a adesão do paciente e aumenta o risco de abandono (Brasil, 2017), enquanto o acesso limitado a medicamentos e infraestrutura em áreas remotas agrava o controle da doença .

Pacientes com formas graves, como as mucocutâneas ou disseminadas, enfrentam desafios adicionais, pois requerem tratamentos mais agressivos e caros, como a anfotericina B lipossomal, nem sempre disponível no sistema público de saúde (Amato *et al.*, 2007). Diante desses desafios, investir em pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias, métodos de diagnóstico mais rápidos e estratégias eficazes de controle vetorial é essencial para reduzir a carga dessa doença. A busca por medicamentos menos tóxicos, de administração mais simples e com menor risco de resistência é uma prioridade para melhorar o manejo da leishmaniose tegumentar no Brasil e em

outras regiões endêmicas (Brasil, 2017; Koff; Rosen, 1994).

## 2.2 AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células, representando aproximadamente 50% ou mais de seu peso seco. Estão presentes em todas as partes de todas as células, desempenhando funções fundamentais para a lógica celular. Devido à sua relevância tanto qualitativa quanto quantitativa, as proteínas têm sido amplamente investigadas, permitindo avanços significativos no entendimento de sua síntese e aproveitamento metabólico (Nelson; Cox, 2014).

Os  $\alpha$ -aminoácidos, que são os blocos constituintes de peptídeos e proteínas, possuem uma estrutura comum: um grupo funcional carboxila (-COOH), um grupo amino (-NH<sub>2</sub>) e um átomo de hidrogênio (-H), todos ligados ao carbono- $\alpha$  conforme ilustrado na figura 1. Além disso, cada aminoácido possui um grupo-R (cadeia lateral) específico, também ligado ao carbono- $\alpha$ , o que confere a esse carbono uma geometria tetraédrica e, na maioria dos casos, uma configuração assimétrica<sup>3</sup> (quiral). A exceção é a glicina, cujo grupo-R é simplesmente um átomo de hidrogênio, tornando o carbono- $\alpha$  simétrico. A diversidade dos aminoácidos é determinada pela natureza química do grupo-R, que varia em tamanho, forma, carga e reatividade (Nelson; Cox, 2014; Berg; Tymoczko; Stryer., 2008).

---

<sup>3</sup> A assimetria (ou quiralidade) na configuração dos aminoácidos é conferida pela presença de quatro grupos químicos diferentes ligados ao carbono- $\alpha$  (carbono central).

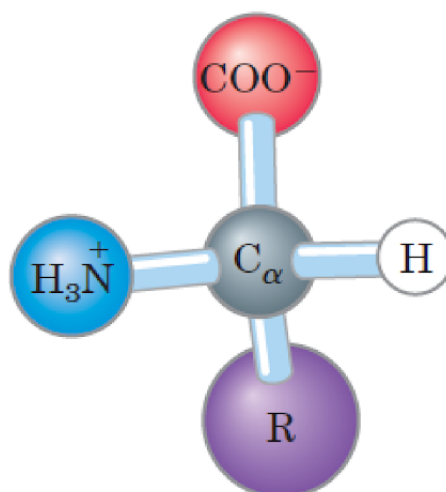


Figura 1 – Estrutura geral de um aminoácido: o grupo carboxila (COOH) está em vermelho, o grupo amina (NH<sub>3</sub>) está em azul, o carbono ( $\alpha$ ) está em cinza, o grupo R está em roxo e o átomo de hidrogênio (H) em branco.

Fonte:(Nelson; Cox, 2014).

A união de dois aminoácidos resulta na formação de um dipeptídeo, enquanto a combinação de três aminoácidos origina um tripeptídeo, e assim por diante. A medida que vários aminoácidos se unem, forma-se uma cadeia polipeptídica. Existem 20 aminoácidos conhecidos (Alanina, Arginina, Aspartato, Asparagina, Cisteína, Fenilalanina, Glicina, Glutamato, Glutamina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Prolina, Serina, Tirosina, Treonina, Triptofano e Valina), que são componentes das moléculas de proteínas, com sua síntese regulada por processos genéticos que envolvem a replicação do DNA e a transcrição do RNA (Nelson; Cox, 2014; Marques, 2014).

Metade dos aminoácidos são sintetizada pelo organismo para suprir as necessidades celulares. Aqueles que não são sintetizados devem ser obtidos por meio da dieta e são denominados aminoácidos essenciais, enquanto os aminoácidos que são sintetizados pelo organismo são classificados como não essenciais. Em um sistema de ligação peptídica o primeiro aminoácido da cadeia peptídica é aquele que possui o grupamento amino-terminal e o último, o que possui o livre o grupamento carboxila-terminal. O grupamento R sempre ocupa posição oposta ao próximo aminoácido na cadeia, devido ao Carbono- $\alpha$  ( $C\alpha$ ) ser assimétrico, o que vai contribuir para a forma tridimensional da proteína como pode ser observado na figura 2.

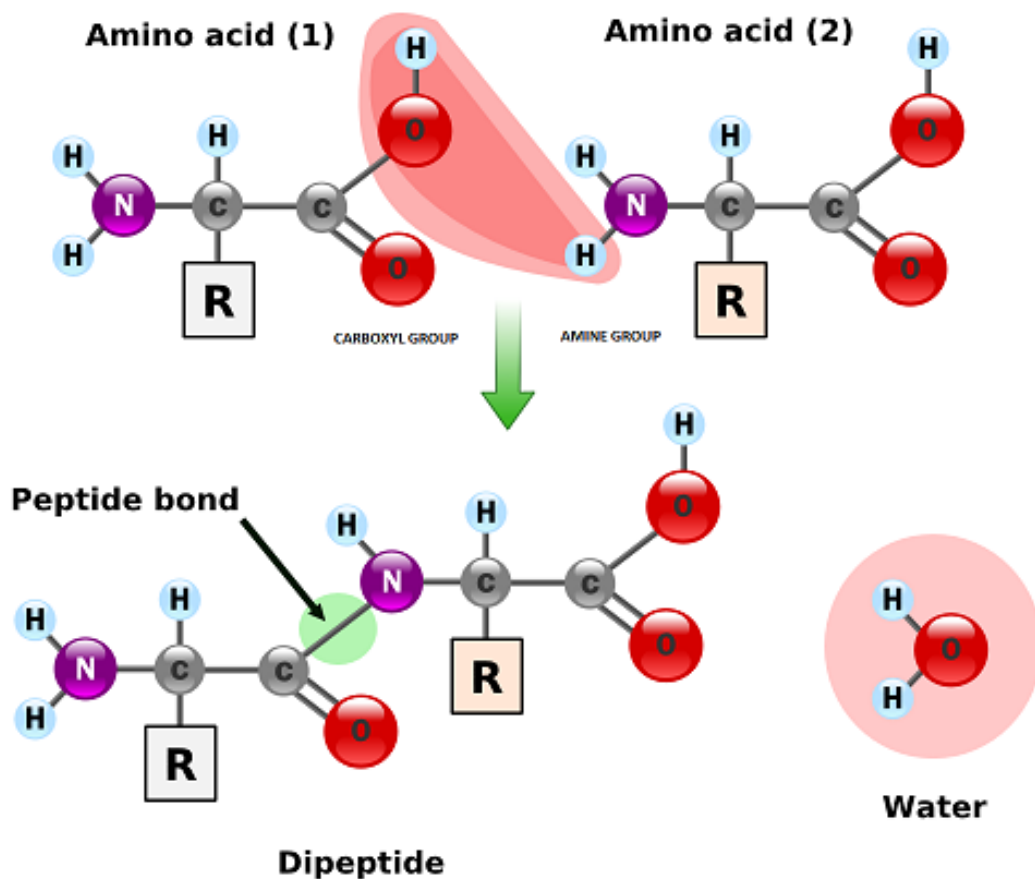


Figura 2 – Ligação peptídica ocorre entre o grupamento -COOH de um aminoácido com o grupamento -NH<sub>2</sub> de outro.

Fonte:(Nelson; Cox, 2014).

O estudo da composição e da polaridade do grupamento R permite classificar os aminoácidos em quatro categorias distintas (ver figura 3):

a) **Aminoácidos com grupamento R apolar ou hidrofóbico:** são os menos solúveis, devido à ausência de grupamentos hidrofílicos no grupamento R. Esses aminoácidos incluem:

- Cadeia alifática hidrocarbonada: alanina, leucina, isoleucina, valina e prolina;
- Anel aromático: fenilalanina e triptofano;
- Tioéter: metionina;
- Hidrogênio: glicina.

A alanina é o aminoácido mais solúvel deste grupo, enquanto a prolina, na realidade, é um iminoácido, cujo grupamento R é um substituinte do amino grupo. A glicina é o aminoácido mais simples, pois seu grupamento R consiste apenas em um átomo de hidrogênio (apolar), sendo

também o único aminoácido que não possui carbono assimétrico. Embora seja geralmente classificada como apolar, em algumas situações é considerada polar, devido à sua certa solubilidade conferida pelo grupamento funcional.

b) **Aminoácidos com grupamento R polar não-carregado:** possuem grupamentos hidrofílicos na cadeia carbonada que não se ionizam, mas conferem maior solubilidade ao aminoácido. Esses incluem:

- Hidroxila: serina, treonina e tirosina;
- Grupo amida: asparagina e glutamina;
- Sulfidrila ou tiol: cisteína.

A cisteína e a tirosina possuem os grupamentos R mais polares, sendo, portanto, os mais solúveis desta classe. A cisteína frequentemente ocorre nas proteínas na sua forma oxidada, a cistina, na qual os grupamentos sulfidrila (-SH) estão unidos, formando pontes dissulfeto (S-S), que são ligações covalentes importantes para a estabilização da estrutura proteica. A asparagina e a glutamina são amidas do ácido aspártico e do ácido glutâmico, respectivamente.

c) **Aminoácidos com grupamento R polar carregado positivamente (básicos):** incluem lisina, arginina e histidina. Todos possuem um grupamento R com seis carbonos, e a carga positiva está localizada em um átomo de nitrogênio no grupamento R.

d) **Aminoácidos com grupamento R polar carregado negativamente (ácidos):** incluem o ácido aspártico e o ácido glutâmico, que são frequentemente denominados aspartato e glutamato, respectivamente, devido à sua ionização em pH fisiológico. Nesse processo, os aminoácidos adquirem carga negativa no grupamento carboxila (-COO-).

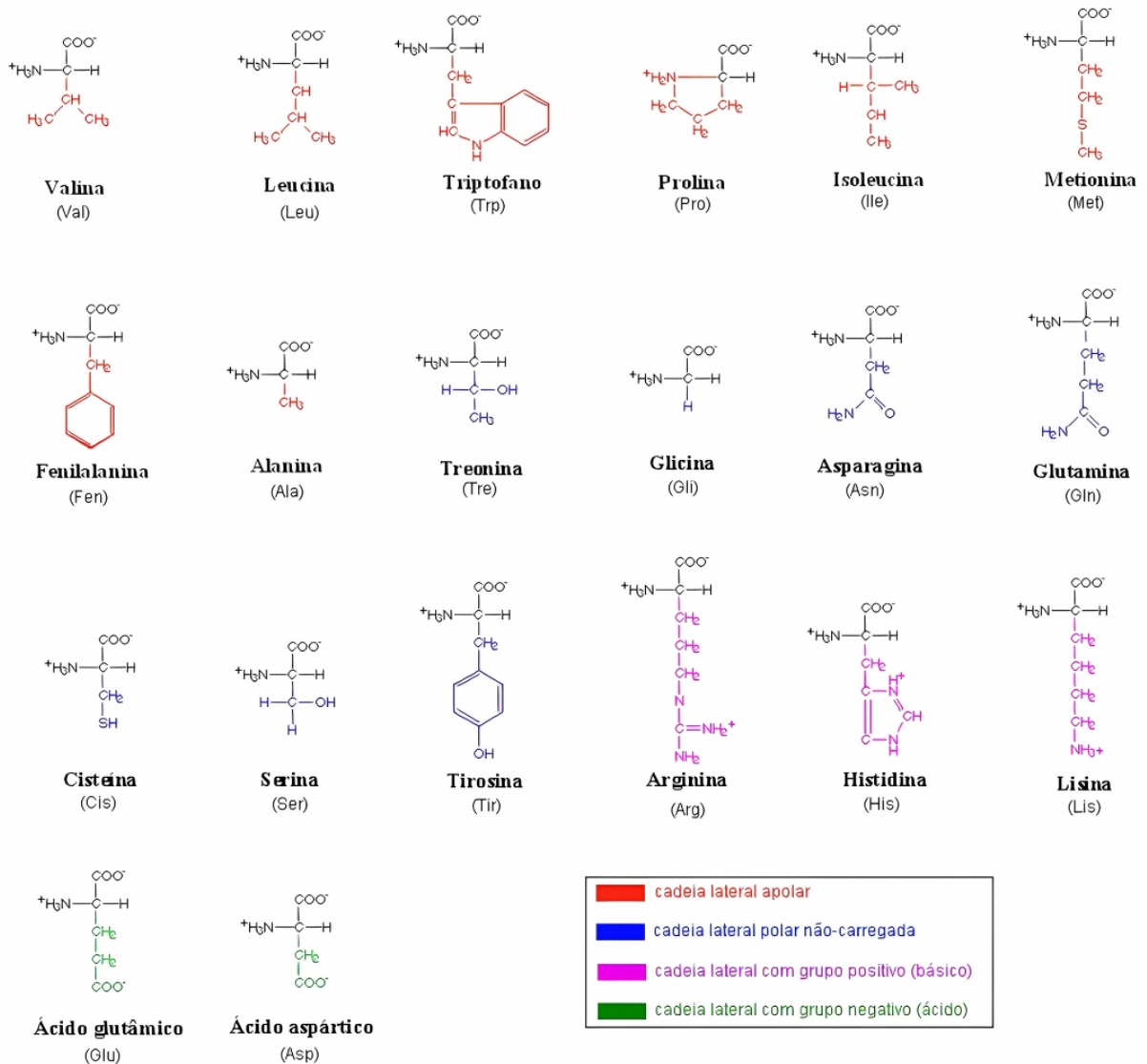


Figura 3 – Apresentação dos 20 aminoácidos naturais que compõem as proteínas e classificações conforme suas propriedades químicas.

Fonte: Adaptado de (InfoEscola, 2020)

## 2.2.1 Estrutura das Proteínas

A flexibilidade das proteínas é proporcionada pela característica anfótera dos aminoácidos e pela modificação da carga do grupamento R, o que resulta em uma conformação estrutural diversificada e variada interação entre os aminoácidos. O (C $\alpha$ ), por ser assimétrico e ligado a quatro grupos diferentes, permite rotação livre em seu eixo, conferindo versatilidade à proteína e tornando sua estrutura tridimensional essencial para sua função. No entanto, essa flexibilidade é limitada por interações químicas entre as cadeias peptídicas e os grupamentos R.

A complexidade da estrutura molecular das proteínas é geralmente dividida em níveis

organizacionais:

1. **Estrutura Primária:** Refere-se à sequência linear de aminoácidos determinada pela sequência de nucleotídeos do DNA. A ordem dos aminoácidos, do N-terminal<sup>4</sup> ao C-terminal<sup>5</sup>, é crucial para a função da proteína, como exemplificado pela substituição de valina por glutamato na hemoglobina, que causa anemia falciforme.

2. **Estrutura Secundária:** Descreve a conformação da cadeia polipeptídica, podendo assumir formas como a  $\alpha$ -hélice ou a folha- $\beta$  pregueada, estabilizadas por pontes de hidrogênio entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dos aminoácidos. Proteínas podem conter ambos os tipos de organização secundária.

3. **Estrutura Terciária:** Relaciona-se à conformação tridimensional estável da proteína, determinada por interações químicas, como ligações covalentes, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de *van der Waals*. Essas interações estabilizam a estrutura enovelada da proteína.

4. **Estrutura Quaternária:** Aplica-se a proteínas oligoméricas, compostas por várias cadeias polipeptídicas, cujas interações não covalentes entre as cadeias são essenciais para a função biológica. A hemoglobina é um exemplo de proteína com estrutura quaternária.

Esses níveis de organização podem ser visualizados de forma esquemática na figura 4, que ilustra como cada nível contribui para a formação da estrutura final da proteína.

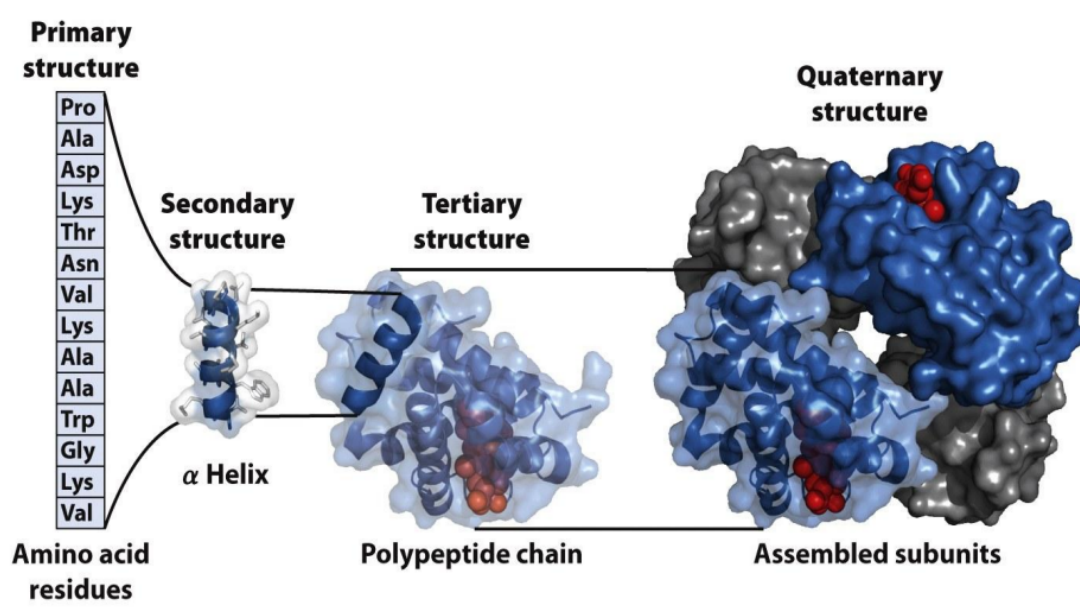


Figura 4 – Exemplo das estruturas que compõe uma proteína  
Fonte:(Nelson; Cox, 2014).

<sup>4</sup> É a extremidade da cadeia peptídica que possui o grupo amino livre (-NH<sub>2</sub>).

<sup>5</sup> É a extremidade da cadeia peptídica que possui o grupo carboxila livre (-COOH)

## 2.2.2 Algumas funções Biológicas das Proteínas

As proteínas desempenham uma variedade de funções biológicas essenciais nos organismos vivos. Atuam como catalisadores biológicos, enzimas que aceleram reações químicas, como é o caso da ribonuclease, que quebra moléculas de RNA, e da tripsina, que digere proteínas. No transporte de moléculas, destacam-se a hemoglobina, que transporta oxigênio dos pulmões para os tecidos, e a mioglobina, que armazena oxigênio nos músculos e o libera para as mitocôndrias conforme necessário. Além disso, as proteínas também possuem um papel nutritivo e de reserva energética, como a gliadina, presente nas sementes de trigo, que auxilia na germinação; a zeína, encontrada no milho; e a ovoalbumina, proteína da clara do ovo que serve como fonte de nutrientes para o embrião.

As proteínas contráteis, como a actina e a miosina, desempenham funções de movimento, sendo fundamentais para a contração muscular, enquanto as dineínas atuam em movimentações intracelulares. Estruturalmente, conferem forma e sustentação aos tecidos, como é o caso do colágeno e da elastina nos tecidos conjuntivos e das  $\alpha$  e  $\beta$ -queratinas em cabelos, unhas e penas. Além disso, transportam elétrons no metabolismo celular, como os citocromos, que transferem elétrons das coenzimas NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e FADH<sub>2</sub> (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) para o oxigênio na cadeia respiratória.

Na defesa dos organismos, as proteínas atuam contra patógenos e predadores. Por exemplo, as toxinas de serpentes imobilizam ou matam presas e predadores, enquanto a ricina, presente nas sementes de mamona, protege a planta contra herbívoros. Já os anticorpos, produzidos pelos linfócitos B, defendem o organismo contra antígenos como bactérias e vírus.

Por fim, as proteínas reguladoras são fundamentais no controle metabólico. A insulina, por exemplo, é um hormônio proteico que regula os níveis de glicose no sangue. Quando esses níveis estão elevados, a insulina é secretada pelas células  $\beta$  do pâncreas, facilitando a entrada da glicose nas células e seu armazenamento como glicogênio. Assim, as proteínas desempenham papéis indispensáveis para a manutenção e o funcionamento dos organismos vivos.

## 2.3 DIHIDROFOLATO REDUTASE - TIMIDILATO SINTASE

As enzimas dihidrofolato redutase (DHFR) e timidilato sintase (TS) desempenham papéis críticos no metabolismo intermediário, sendo essenciais para a síntese de nucleotídeos e, conseqüentemente, para a replicação do DNA. Devido à esta funcionalidade, essas enzimas são alvos importantes para a quimioterapia. Fármacos como o metotrexato, que inibe a DHFR,

e os metabólitos do 5-fluorouracil, que inibem a TS, são amplamente utilizados no tratamento de tumores humanos (Chabner; Roberts, 2005; Blakley, 1995). Além disso, antifolatos como o trimetoprim e a pirimetamina são empregados no tratamento de infecções causadas por patógenos, como bactérias e parasitas (Schweitzer; Dicker; Bertino, 1990; Field; Stover, 2018).

Na maioria dos organismos, a DHFR e a TS existem como entidades moleculares separadas. A DHFR é geralmente um monômero de aproximadamente 20 kDa, enquanto a TS é um dímero composto por subunidades de 35 kDa (Carreras; Santi, 1995). No entanto, na *Leishmania* e outros protistas, essas enzimas são fundidas em um complexo bifuncional DHFR-TS, formado por um homodímero de uma cadeia polipeptídica que varia entre 54 e 100 kDa (Nare; Luba; Hardy; Beverley, 1997; Knighton *et al.*, 1994). Essa organização única confere ao complexo propriedades bioquímicas distintas, como a canalização metabólica, que aumenta a eficiência da reação ao direcionar o substrato diretamente de uma atividade enzimática para outra (Stroud; Finer-Moore, 2003). Além disso, o complexo DHFR-TS exibe ligação díspar a inibidores como o metotrexato e o 2'-desoxi-5-fluorouridina monofosfato (5-FdUMP) (Knighton *et al.*, 1994; Stroud; Finer-Moore, 2003).

Estudos moleculares e bioquímicos detalhados têm revelado características únicas do complexo DHFR-TS em *Leishmania*, que podem ser exploradas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos. Por exemplo, a pirimetamina, um inibidor da DHFR do *Plasmodium*, demonstra a viabilidade de inibir seletivamente enzimas de patógenos sem afetar as enzimas humanas (Field; Stover, 2018). Portanto, a compreensão das propriedades estruturais e funcionais do complexo DHFR-TS em *Leishmania* pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos antileishmania mais eficazes e específicos.

### 2.3.1 Papel da DHFR no Metabolismo do Folato e Síntese de Timidina

A dihidrofolato redutase (DHFR) é uma enzima chave no metabolismo do folato, essencial para a produção de timidina, um dos componentes do DNA (Blakley, 1995; Carreras; Santi, 1995). Sua função principal é reduzir o diidrofolato (DHF) a tetraidrofolato (THF), utilizando o cofator NADPH como doador de elétrons (figura 5). Após essa redução, o THF é convertido em metileno-THF, que atua como doador de grupos metil na reação catalisada pela timidilato sintase (TS). Nessa reação, o monofosfato de desoxiuridina (dUMP) é metilado para formar monofosfato de timidina (TMP), um precursor essencial para a síntese de DNA. Durante esse processo, o metileno-THF é oxidado de volta a DHF, reiniciando o ciclo (Figura 5).

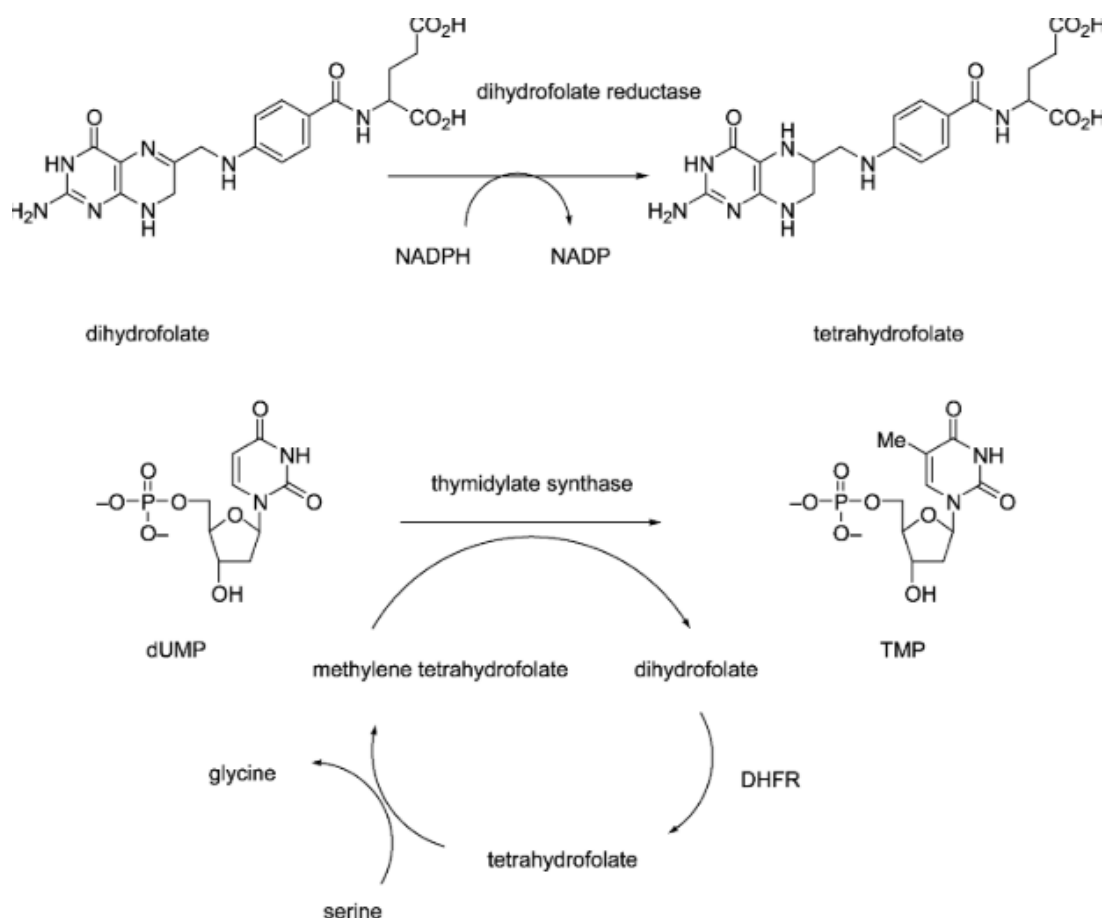


Figura 5 – Reações realizadas pela DHFR-TS.

A inibição da DHFR interrompe a síntese de timidina, impedindo a replicação do DNA e levando à morte celular. Além disso, a inibição da DHFR resulta no acúmulo de dUMP, que é convertido em trifosfato de desoxiuridina (dUTP). Altos níveis de dUTP levam à incorporação incorreta de uracila no DNA, sobrecarregando os mecanismos de reparo celular, como a enzima uracila-DNA-glicosilase. Esse acúmulo de uracila no DNA causa danos genômicos irreparáveis, culminando em morte celular (Field; Stover, 2018).

## 2.4 MODELAGEM E INTERAÇÕES BIOMOLECULARES

Recursos computacionais que descrevem as propriedades de um processo natural são denominados métodos *in silico*. Esses métodos utilizam simulações como suporte, empregando técnicas computacionais para modelar sistemas biológicos. Tal abordagem favorece o estudo de moléculas e contribui para o aumento de candidatos potenciais a novos fármacos.

### 2.4.1 Modelagem por Homologia

A modelagem por homologia é um método amplamente utilizado para construir modelos estruturais tridimensionais (3D) de uma proteína-alvo a partir de uma estrutura previamente determinada e semelhante. Esse procedimento é bem documentado na literatura e baseia-se no princípio de que a conformação estrutural de proteínas é conservada dentro de uma mesma família ao longo do processo evolutivo. Pequenas variações na sequência de aminoácidos geralmente resultam em alterações sutis na estrutura tridimensional, o que permite a aplicação desse método com confiança (Bareiro, 2013).

Na prática, a modelagem por homologia envolve a construção de um modelo 3D de uma sequência-alvo com base em uma proteína homóloga cuja estrutura tenha sido determinada experimentalmente. O método se fundamenta na probabilidade de que proteínas com sequências similares possuam estruturas tridimensionais semelhantes (Rocha, 2011). Quando uma sequência homóloga com estrutura resolvida está disponível, a modelagem comparativa ou por homologia torna-se o método preferencial para a predição da estrutura da proteína-alvo (Rocha, 2011).

O processo de modelagem por homologia pode ser resumido nas seguintes etapas:

1. Identificar proteínas homólogas com estruturas conhecidas;
2. Selecionar o melhor modelo ou um conjunto de modelos candidatos;
3. Melhorar o alinhamento de sequências múltiplas (ASM) entre as proteínas envolvidas;
4. Construir o modelo de homologia, ajustando inserções e deleções de resíduos de aminoácidos;
5. Validar<sup>6</sup> o modelo gerado para garantir sua qualidade e precisão (Rakesh; Joseph; Bhaskara; Srinivasan, 2016).

Na modelagem por homologia, dois conceitos são fundamentais: a identidade sequencial e o recobrimento. A identidade sequencial refere-se à porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos entre a proteína-alvo e a proteína de referência, enquanto o recobrimento descreve a extensão em que a proteína-alvo se sobrepõe à estrutura da proteína de referência. É importante destacar que baixos valores de identidade e recobrimento podem resultar em modelos de baixa qualidade, distantes da conformação natural da proteína. Para garantir a confiabilidade do modelo,

<sup>6</sup> Valida por meio de: Análise de Qualidade Global, verificação de estereoquímica, comparação com o modelo de referência, análise de interações Moleculares entre outros (Rakesh; Joseph; Bhaskara; Srinivasan, 2016).

recomenda-se que a identidade sequencial entre a proteína-alvo e a proteína-molde seja de, no mínimo, 30% (Nayeem; Sitkoff; Krystek, 2006).

#### 2.4.2 Dinâmica Molecular - DM

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica de simulação computacional utilizada para estudar o movimento de partículas em sistemas complexos. Baseada nas leis de Newton, a DM modela sistemas em nível atômico ou molecular, permitindo a representação de sólidos, líquidos e gases (Costa, 2015; Silva, 2012). Essa abordagem tem se destacado como uma ferramenta eficaz para investigar a estrutura de proteínas, sua flexibilidade conformacional, interações moleculares, padrões de solvatação e propriedades de superfície, aspectos que não podem ser observados diretamente em estruturas cristalinas (Silva, 2012).

Em essência, a DM descreve a variação do comportamento molecular ao longo do tempo, gerando uma trajetória contínua. Essa trajetória reflete propriedades específicas da molécula em estudo, como a formação de estruturas secundárias, a orientação de cadeias laterais, a conformação de alças e a energia de interação entre moléculas. A ideia central é que essas propriedades não são estáticas, mas dinâmicas, podendo variar em soluções biológicas (Verli, 2014).

A visão de uma proteína em seu estado nativo como uma molécula completamente rígida é equivocada. Nesse estado, as proteínas apresentam movimentos internos que podem estar diretamente relacionados à sua função biológica (Costa, 2015). A DM permite capturar essa flexibilidade molecular, fornecendo modelos mais próximos da realidade biológica.

A dinâmica molecular (DM) é uma das principais ferramentas para o estudo teórico de moléculas biológicas, fornecendo informações detalhadas sobre como as proteínas se movem e mudam de forma em condições fisiológicas. Por meio de simulações computacionais, a DM permite observar as flutuações conformacionais da proteína, ou seja, como sua estrutura tridimensional varia ao longo do tempo. Além disso, ela ajuda a identificar as diferentes configurações energéticas que a proteína pode adotar. Essas configurações incluem desde estados de menor energia (mais estáveis) até conformações de maior energia (menos estáveis), que a proteína pode assumir temporariamente durante sua dinâmica. A DM também mostra como a proteína flutua em torno dos estados de menor energia, revelando sua flexibilidade e adaptabilidade em um ambiente biológico realista (Costa, 2015).

Uma das grandes vantagens da DM é sua capacidade de modelar diversos sistemas

biomoleculares, como proteínas, membranas e seus complexos, descrevendo o ambiente solvente de forma explícita ou implícita (incluindo água e íons). Isso é possível graças a métodos integradores estáveis que resolvem equações de movimento, fornecendo ferramentas para analisar trajetórias e exportar resultados em formatos compatíveis com softwares de visualização e análise de dados.

Neste estudo, a dinâmica molecular foi aplicada com base nos princípios da mecânica clássica, conforme descrito pela equação  $F = \frac{dp}{dt}$ , onde  $F$  é a força atuando sobre cada partícula do sistema,  $p = m \cdot v$  é o momento linear (quantidade de movimento),  $m$  é a massa da partícula,  $v$  é sua velocidade e  $t$  é o tempo. A partir do campo de força definido, as forças que atuam sobre cada átomo são calculadas como o gradiente negativo da energia potencial ( $U$ ) em relação às suas posições ( $\mathbf{r}_i$ ):

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N), \quad (1)$$

onde  $\mathbf{F}_i$  é a força sobre o átomo  $i$ ,  $\nabla_{\mathbf{r}_i}$  é o operador gradiente em relação à posição  $\mathbf{r}_i$ , e  $U$  é a energia potencial do sistema, que depende das posições de todos os  $N$  átomos. A equação que determina a aceleração de uma partícula é:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}, \quad (2)$$

onde  $\mathbf{r}_i$  é a posição da partícula  $i$ ,  $m_i$  é sua massa e  $\mathbf{F}_i$  é a força resultante sobre ela.

Integrando as equações de movimento, obtêm-se as velocidades ( $\mathbf{v}_i$ ), cuja integração subsequente fornece as novas posições dos átomos. Com essas novas posições e velocidades, calcula-se a energia potencial ( $U$ ) e a energia cinética ( $K$ ) do sistema. A repetição desse procedimento ao longo do tempo gera a trajetória, definida como o conjunto de posições e velocidades de cada partícula em diferentes instantes.

O processo de simulação por DM pode ser dividido nas seguintes etapas:

1. Preparação do sistema: Envolve a seleção da amostra e a geração da configuração inicial das moléculas, garantindo que a estrutura esteja adequadamente ajustada para o início da simulação.
2. Minimização de energia: Nesta etapa, são calculadas as forças exercidas sobre cada partícula com base nas interações intermoleculares. O objetivo é relaxar a estrutura, conduzindo-a a uma conformação de menor energia e maior estabilidade.

3. Aquecimento e equilibração: Inclui o aquecimento isovolumétrico da amostra, o transporte de partículas e o estabelecimento do equilíbrio termodinâmico. Essa etapa garante que o sistema atinja condições adequadas antes da simulação principal.
4. Simulação: Realiza-se a simulação sob condições específicas de ensembles (conjuntos de parâmetros termodinâmicos), com controle das propriedades do sistema e armazenamento das configurações obtidas durante as trajetórias moleculares.
5. Análise dos resultados: Consiste na interpretação detalhada dos dados gerados pelas trajetórias atômicas, permitindo a obtenção de informações sobre as propriedades do sistema e seus comportamentos dinâmicos.

A análise e interpretação dos resultados obtidos por meio da dinâmica molecular (DM) representam um dos maiores desafios nesse campo de estudo. Para garantir a eficácia do processo, é essencial dispor de informações prévias sobre o sistema em análise, as quais orientam o planejamento, a execução e a validação da simulação. O tipo de análise aplicado está diretamente relacionado à natureza do problema investigado, exigindo a seleção de métodos adequados para extrair *insights* relevantes.

Dentre as diversas ferramentas de análise possíveis, destacam-se as seguintes:

- **Root Mean Square Deviation (RMSD):** Mede o desvio médio quadrático entre a estrutura da proteína ao longo da simulação e uma estrutura de referência. Essa métrica quantifica o quanto a conformação da proteína se desvia da referência ao longo do tempo, fornecendo uma visão geral da estabilidade estrutural.
- **Root Mean Square Fluctuation (RMSF):** Descreve as flutuações médias na posição de átomos ou resíduos ao longo da simulação. Essa análise é particularmente útil para identificar regiões da proteína com maior flexibilidade, como alças ou terminais, que podem estar envolvidas em processos funcionais.
- **Raio de Giro (RG):** Avalia a compactação da estrutura proteica durante a simulação. Um aumento ou diminuição no raio de giro pode indicar expansão ou contração da molécula, respectivamente, fornecendo insights sobre mudanças conformacionais significativas.
- **Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA):** Mede a área da superfície da proteína exposta ao solvente. Essa métrica é crucial para entender a acessibilidade de regiões

específicas da molécula ao meio externo, o que pode influenciar interações moleculares e processos de ligação.

- **Cluster:** Agrupa conformações semelhantes utilizando algoritmos de classificação baseados em critérios de similaridade. Essa abordagem permite identificar padrões conformacionais recorrentes ao longo da simulação, facilitando a análise de estados intermediários ou transições entre conformações.

Essas análises, quando combinadas, fornecem uma visão abrangente do comportamento dinâmico da proteína, permitindo a identificação de características estruturais e funcionais que não seriam acessíveis por meio de técnicas estáticas, como a cristalografia de raios-X. A escolha das métricas adequadas depende dos objetivos do estudo, mas todas contribuem para uma interpretação mais robusta e detalhada dos resultados da DM.

### 2.4.3 Docking Molecular

O *Docking Molecular* é uma simulação computacional amplamente utilizada para prever as diferentes forças intermoleculares e as afinidades de pequenas moléculas em relação ao sítio de ligação de um complexo receptor/ligante. Essa técnica, classificada como uma simulação de acoplamento molecular, tem como objetivo prever a orientação e a conformação mais estável de um ligante ao se ligar a um receptor. O receptor, geralmente, é uma proteína ou uma molécula de ácido nucleico, enquanto o ligante pode ser uma pequena molécula ou outra proteína.

Durante o processo de *docking*, são realizados cálculos que envolvem a avaliação da energia de interação entre o ligante e o receptor. Essa energia é calculada considerando forças como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de *van der Waals* e efeitos hidrofóbicos. A energia total de interação ( $E_{\text{total}}$ ) pode ser expressa pela equação:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{vdW}} + E_{\text{eletrostática}} + E_{\text{hidrofóbica}} + E_{\text{ligações de H}}, \quad (3)$$

onde  $E_{\text{vdW}}$  representa a energia das interações de *van der Waals*,  $E_{\text{eletrostática}}$  é a energia das interações eletrostáticas,  $E_{\text{hidrofóbica}}$  é a energia associada às interações hidrofóbicas e  $E_{\text{ligações de H}}$  é a energia das ligações de hidrogênio.

Além disso, o *docking* realiza uma exploração conformacional, na qual diferentes orientações e conformações do ligante no sítio de ligação do receptor são testadas, buscando a configuração que minimize a energia de interação. Essa exploração é feita por meio de métodos

como a busca estocástica (por exemplo, algoritmos genéticos) ou métodos baseados em gradiente, que minimizam a energia usando derivadas da energia total em relação às coordenadas do ligante:

$$\nabla E_{\text{total}} = \frac{\partial E_{\text{total}}}{\partial \mathbf{r}}, \quad (4)$$

onde  $\mathbf{r}$  representa as coordenadas do ligante.

Outro aspecto crucial do *docking* é a predição da afinidade de ligação, que é expressa em termos de energia livre de ligação ( $\Delta G$ ). Essa energia livre indica quão fortemente o ligante se liga ao receptor e é calculada usando funções de pontuação (*scoring functions*), como:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{eletrostática}} + \Delta G_{\text{hidrofóbica}} + \Delta G_{\text{entrópica}} \quad (5)$$

onde  $\Delta G_{\text{entrópica}}$  representa a contribuição entrópica para a ligação.

Esse processo detalha o reconhecimento molecular envolvido nas interações entre as moléculas, fornecendo insights valiosos para o desenvolvimento de fármacos, a compreensão de mecanismos biológicos e a identificação de alvos terapêuticos (Verli, 2014).

A técnica de ancoragem molecular tem sido amplamente empregada devido à sua capacidade de identificar os ligantes de maior afinidade para o sítio de ligação. Ela avalia todas as possíveis combinações utilizando algoritmos de busca baseados na estrutura tridimensional do alvo, em conjunto com bancos de dados de compostos promissores disponíveis. Além disso, essa abordagem oferece uma alternativa eficaz para a redução de custos em procedimentos de estimativa da atividade biológica (Domingues, ).

#### 2.4.4 Virtual Screening - VS

A Triagem Virtual (VS, do inglês *Virtual Screening*) é uma das principais abordagens *in silico* para a identificação de novos compostos com atividade biológica. Trata-se de uma técnica computacional utilizada para identificar estruturas com maior probabilidade de se ligarem a um alvo, normalmente um receptor de proteína ou enzima. Neste processo, são empregados grandes bancos de compostos químicos virtuais, derivados de fontes naturais ou compostos orgânicos disponíveis por meio de portais online, como o *ZINC database*, *DrugBank*, *PubChem* (Verli, 2014).

O método de Triagem Virtual, voltado para a previsão de atividades biológicas, baseia-se em duas abordagens principais:

1. Estrutura do receptor biológico 3D (SBVS, do inglês *Structure-Based Virtual Screening*): Nessa abordagem, o receptor é o alvo, e busca-se identificar ligantes compatíveis com o local de ligação (complexo).
2. Estrutura de ligantes bioativos (LBVS, do inglês *Ligand-Based Virtual Screening*): Aqui, o ligante é o alvo, e busca-se identificar os melhores receptores para a interação.

Na abordagem SBVS, o foco é a identificação de ligantes que se ajustem adequadamente ao sítio ativo do receptor, enquanto na LBVS, o ligante é a chave para encontrar os receptores com melhor interação (Domingues, ). O método utilizado neste estudo é baseado na técnica receptor-ligante, que se fundamenta nas características físico-químicas (químicas, eletrônicas e estruturais) entre o ligante e o sítio ativo da proteína. Esta técnica utiliza dados tridimensionais de alvos terapêuticos. A LBVS possibilita a descoberta de novos ligantes com maior variedade estrutural, que podem ser validados experimentalmente ou representados por um modelo construído a partir de proteínas homólogas com alta identidade (Ferreira; Glaucius; Andricopulo, 2011).

#### 2.4.5 Interação Proteína-ligante

Em 1894, Emil Fischer realizou estudos sobre a especificidade de enzimas e propôs a ideia de que enzimas eram estruturalmente complementares a seus substratos, encaixando-se de forma específica como uma chave em uma fechadura (Fischer, 1894). Essa analogia, conhecida como modelo chave-fechadura, também é aplicada para descrever interações entre fármacos e seus receptores. No entanto, o modelo chave-fechadura sugere que proteínas e ligantes são entidades rígidas, o que não reflete a realidade da flexibilidade molecular. Tanto proteínas quanto ligantes podem adotar diversas conformações durante a interação, um fenômeno que o modelo clássico não considera.

Uma das teorias que explica essa flexibilidade é a teoria do encaixe induzido, proposta por Koshland em 1958. Essa teoria sugere que, durante a interação, o receptor biológico pode se ajustar para reconhecer diversas conformações do ligante dentro do sítio de ligação, resultando em um ajuste mútuo entre as moléculas (Koshland, 1958). Essa ideia foi posteriormente corroborada por estudos que demonstraram a importância da flexibilidade molecular no reconhecimento e na ligação de ligantes a proteínas.

As estruturas tridimensionais das proteínas geralmente requerem uma avaliação e preparação adequadas antes de serem utilizadas em estudos de interação. Esse processo inclui a

análise da qualidade estrutural, a adição de átomos de hidrogênio, a inclusão ou remoção de moléculas de água, bem como a adição de cofatores e moléculas de açúcares (Berman *et al.*, 2000). Após essa etapa, é possível realizar a ancoragem molecular de todos os ligantes presentes no banco de dados a serem testados, ao invés de se limitar a uma única molécula. Ao considerar a flexibilidade do receptor, é possível incluir outras conformações relevantes, levando em conta diferentes modos da proteína e resultando em diversas cavidades (pontos de interação). Isso implica em um número significativamente maior de testes com os compostos do banco de ligantes a serem avaliados durante a triagem (Gordon *et al.*, 2005).

Ligantes e proteínas que apresentam alta afinidade entre si geralmente exibem as seguintes características (Verli, 2014):

1. Alto nível de complementaridade estérica: A proteína e o ligante possuem uma alta porcentagem de suas superfícies de contato molecular, definidas pelos raios de *Van der Waals* atômicos, em contato próximo;
2. Alta compatibilidade entre o ligante e a proteína é crucial para uma interação eficiente. Essa compatibilidade pode ser eletrostática, quando grupos polares ou carregados do ligante interagem com áreas de carga oposta na proteína, ou hidrofóbica, onde regiões apolares do ligante se ligam a áreas hidrofóbicas da proteína, evitando a água. Juntas, essas interações garantem um encaixe preciso e estável no sítio de ligação.;
3. Conformação energeticamente favorável do ligante: O ligante geralmente se liga em uma conformação que minimiza a energia do sistema;
4. Minimização de interações repulsivas: As interações repulsivas entre ligante e proteína são minimizadas, favorecendo a estabilidade do complexo.

Os principais tipos de interações intermoleculares envolvidas no reconhecimento molecular proteína-ligante incluem (Verli, 2014):

1. Ligações de hidrogênio;
2. Interações de *Van der Waals*;
3. Interações iônicas;
4. Interações hidrofóbicas;

5. Interações do tipo cátions- $\pi$ ;
6. Interações envolvendo anéis aromáticos do tipo  $\pi - \pi$  e empilhamento T<sup>7</sup>;
7. Coordenação com íons metálicos.

#### 2.4.6 Ferramentas computacionais utilizadas

Existem sistemas integrados de diversas ferramentas computacionais voltadas para a análise de bancos de dados, como o *DrugBank* e o *Zinc Database*, que armazenam informações detalhadas sobre as interações funcionais de macromoléculas. A utilização dessas ferramentas aumenta significativamente a eficiência no processo de descoberta, podendo reduzir em até 50% os custos e o tempo de pesquisa (Souza, 2012). Entre os softwares empregados neste trabalho, destacam-se:

*UniProt* (Universal Protein): Um banco de dados gratuito, de alta qualidade e abrangente, que fornece informações sobre sequências de proteínas e suas funções. Muitas das entradas são derivadas de projetos de sequenciamento de genomas e incluem dados sobre as funções biológicas das proteínas, obtidos da literatura científica (Strandmark *et al.*, 2017).

*Swiss-Model*: Um servidor web dedicado à modelagem por homologia de estruturas e complexos de proteínas 3D (Waterhouse *et al.*, 2018).

*AMBER*: Um pacote de programas utilizado para aplicações de mecânica molecular, análise de modos normais, dinâmica molecular e cálculos de energia livre, permitindo a simulação de propriedades estruturais e energéticas de moléculas. Neste estudo, foi utilizada a versão 22 deste software (Pearlman *et al.*, 1995).

*PyMOL*: Um *software* que oferece ferramentas para a geração de imagens 3D de alta qualidade de moléculas e macromoléculas biológicas, como proteínas, além de possibilitar a visualização e o alinhamento molecular. Até 2009, aproximadamente 25% das imagens de estruturas de proteínas 3D publicadas na literatura científica foram produzidas com o *PyMOL* (Delano, 2002).

*AutoDockTools*: É um programa especializado em modelagem de docking, focado na interação de ligantes com sítios receptores de macromoléculas, como proteínas. Ele explora

---

<sup>7</sup> É uma interação  $\pi - \pi$  em que anéis aromáticos se posicionam perpendicularmente ou em ângulo, formando um "T". Acontece quando um átomo ou borda de um anel se aproxima do centro do outro, onde a densidade eletrônica  $\pi$  é maior. Embora mais fraco que o empilhamento  $\pi - \pi$  paralelo, ele estabiliza complexos, como as bases nitrogenadas do DNA.

o espaço conformacional dos ligantes ao redor da proteína, prevendo as conformações mais prováveis e calculando rapidamente as energias de interação. Essa ferramenta é amplamente utilizada em áreas como descoberta de medicamentos, verificação de encaixe molecular e triagem virtual (Cosconati *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2009).

*AutoDockVina*: Software que investiga os modos de interação de ligantes, otimizando a energia dentro do sítio ativo da enzima. Diferente do AutoDockTools, o AutoDockVina emprega uma função de pontuação que considera contribuições de energia intra e intermolecular dos compostos, utilizando arquivos no formato PDBQT (Trott; Olson, 2010). Além disso, ele aplica o algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS), um método de otimização que utiliza tanto a função de pontuação quanto suas derivadas em relação a parâmetros como posição, orientação do ligante e valores das torções das ligações (Trott; Olson, 2010). Essa abordagem torna o AutoDockVina mais eficiente e preciso na previsão de interações moleculares.

*Discover Studio*: É um pacote abrangente para análise e modelagem de estruturas moleculares, sequências e outros dados relevantes para pesquisadores. Desenvolvido pela *Dassault Systèmes BIOVIA* (anteriormente *Accelrys*), é amplamente utilizado em pesquisa científica e oferece diversas ferramentas para visualização, edição e análise de dados (Discovery, 2021).

*DrugBank (DB)*: É um banco de dados in silico que fornece uma plataforma de pesquisa detalhada sobre fármacos, integrando informações sobre sequências, estruturas e mecanismos de ação das moléculas, incluindo fármacos biotecnológicos. Desde seu lançamento em 2006, tem sido amplamente utilizado em aplicações como a descoberta de medicamentos in silico (Wishart *et al.*, 2008). O *DrugBank* oferece ferramentas para visualização, classificação, pesquisa e extração de dados, além de uma lista específica de alvos de fármacos. Os compostos são classificados em grupos, e cada um recebe um número de acesso no formato DBXXXX, onde "DB" representa DrugBank e "XXXX" corresponde à numeração atribuída conforme a ordem de entrada do composto.

### 3 METODOLOGIA

Este capítulo descreve as metodologias computacionais utilizadas para modelar, simular e analisar a proteína DHFR-TS da La. A estrutura foi gerada por modelagem por homologia, utilizando a sequência do UniProt e um molde homólogo, seguida de validação e simulações de dinâmica molecular para avaliar a estabilidade. Em seguida, realizou-se docking molecular e triagem virtual com o *AutoDock Vina* e compostos do *DrugBank* para identificar potenciais inibidores. Por fim, as interações e dinâmica conformacional foram analisadas com ferramentas como *Amber22*, *CPPTRAJ*, *PyMOL* e *Discovery Studio*.

#### 3.1 MODELAGEM POR HOMOLOGIA

A estrutura tridimensional da proteína La-DHFR-TS foi gerada por modelagem por homologia, uma vez que sua estrutura experimental não está disponível no banco de dados PDB. Para isso, a sequência primária da proteína foi obtida na base de dados *UniProt* (ID: P16126) e utilizada como entrada no servidor *Swiss-Model*.

Como molde para a modelagem, foi selecionada a estrutura cristalográfica da DHFR-TS de *Trypanosoma cruzi* (PDB ID: 3IMR), devido à alta identidade de sequência (69,22%). O processo de modelagem seguiu os parâmetros padrão do *Swiss-Model*, garantindo a geração de um modelo estrutural baseado no alinhamento da sequência-alvo com a sequência do molde.

A qualidade do modelo foi avaliada inicialmente por métricas fornecidas pelo servidor, além da inspeção visual do alinhamento estrutural e da verificação da estereoquímica dos resíduos. Para uma validação mais robusta, o modelo foi submetido a simulações de dinâmica molecular, permitindo a análise da estabilidade conformacional e do comportamento estrutural ao longo do tempo.

#### 3.2 DOCKING MOLECULAR E VIRTUAL SCREENING

A docagem molecular foi empregada para prever a posição e orientação mais favoráveis de compostos no sítio ativo da proteína DHFR-TS, permitindo a avaliação das interações moleculares e da afinidade de ligação. Essa abordagem é amplamente utilizada na triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos, auxiliando na identificação de potenciais inibidores e na seleção de candidatos promissores para ensaios experimentais, conforme já descrito anteriormente.

Para a realização da triagem virtual, foi utilizado o *software AutoDock Vina*, que permite a busca otimizada de conformações com base na energia de ligação. A biblioteca de ligantes utilizada consistiu em 9.213 compostos provenientes do *DrugBank*. Durante as simulações, a proteína foi tratada como rígida, enquanto os compostos permaneceram flexíveis, possibilitando a exploração de diferentes orientações no sítio catalítico. Para cada composto, foram geradas até nove poses, sendo a melhor configuração selecionada com base na menor energia de ligação. A função utilizada é dada pela seguinte equação:

$$g(C_{inter}) = \frac{C_{inter}}{1 + wN_{rot}} \quad (6)$$

Sendo  $N_{rot}$  representa o número de ligações rotacionáveis no ligante, com um peso associado  $w$ . A componente  $C_{inter}$  é a função que incorpora as contribuições da energia livre de ligação. Para a classificação dos ligantes, utiliza-se a função  $g$  do software, denominada afinidade, que reflete a capacidade de cada ligante de atingir a menor energia de interação e, consequentemente, a conformação de mínima energia.

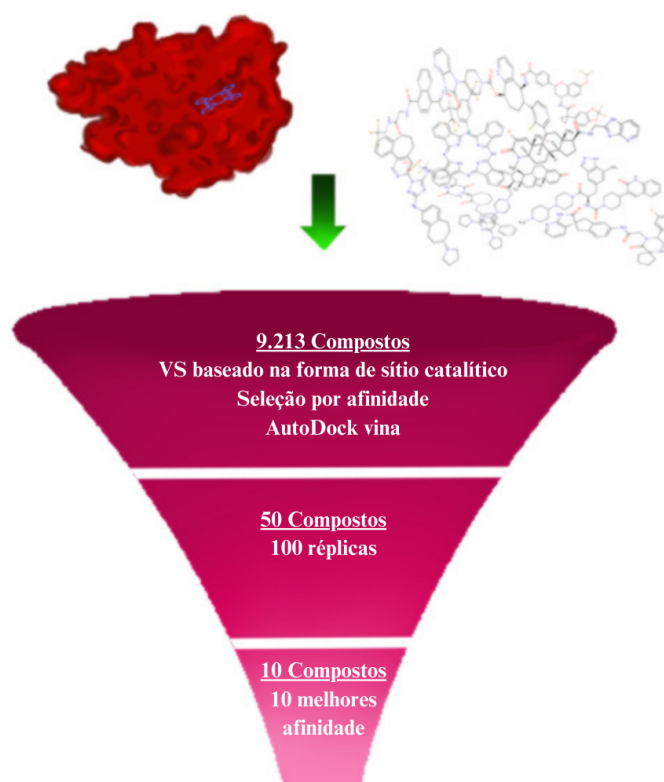


Figura 6 – Representação esquemática do *Virtual Screening*.

Na etapa inicial, 50 moléculas foram selecionadas com base na menor energia de interação calculada pelo *AutoDock Vina*. Essas moléculas foram submetidas a 100 simulações

individuais para avaliar a consistência das conformações obtidas. Os compostos foram ranqueados considerando a afinidade de ligação e a taxa de sucesso, refletida pela porcentagem de simulações que resultaram na conformação de menor energia e sua repetição em diferentes simulações.

A triagem virtual, baseada na estrutura do receptor, focou no sítio ativo da proteína, onde a proteína foi tratada como rígida (ou seja, sua estrutura não mudou durante a simulação), enquanto os compostos (ligantes) foram considerados flexíveis, permitindo que se ajustassem livremente ao sítio de ligação. Para definir a região de interesse, foi utilizada uma caixa de docking com coordenadas tridimensionais centradas em  $x = 18,526$ ,  $y = -7,449$ ,  $z = -3,713$  e dimensões<sup>1</sup> de 16 (eixo x), 20 (eixo y) e 16 Å (eixo z). Essa caixa delimitou o espaço onde os compostos foram testados, garantindo que a busca fosse focada no sítio ativo.

Além disso, interações com possíveis cofatores fora do sítio ativo foram desconsideradas, pois sua inclusão poderia interferir no cálculo da energia total de ligação, afetando a precisão dos resultados. Essa abordagem garantiu que a análise se concentrasse apenas nas interações mais relevantes entre a proteína e os compostos testados.

A Figura 6 ilustra as etapas do processo de triagem virtual, no qual todas as estruturas tridimensionais da biblioteca foram testadas sem alterações.

### 3.3 SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR (MD)

Para obter uma representação estabilizada da estrutura a DHFR-TS, foi realizada duas dinâmicas moleculares utilizando o pacote computacional *Amber22*, com simulação em pH 7,4. A proteína foi centralizada e solvatada em uma caixa d'água octaédrica, com uma distância de 15 Å entre a superfície da caixa e qualquer átomo da proteína, preenchida com moléculas de água modeladas pelo TIP3P. Durante o processo de preparação da DHFR-Ts, foi verificado que não era necessário adicionar íons, e o campo de força ff19SB foi empregado para representar os potenciais interatômicos, gerando os arquivos de topologia e coordenadas. O sistema totalizou 26.357 átomos, sendo 4.055 da enzima e 22.302 da água.

Para a etapa de simulação, inicialmente realizou-se a minimização 1 (min1) na qual a proteína foi minimizada sob restrição com uma constante de força  $w_t = 5,0$  kcal/mol, na minimização 2 (min2), nesta etapa é reiniciada a primeira minimização, mas sem restrições e

<sup>1</sup> As dimensões seguem as unidades do sistemas no qual foi realizada a triagem virtual, por esta razão o texto não cita unidades de medidas.

sem constante de força, permitindo a livre movimentação do sistema. Na etapa de aquecimento e equilíbrio, os resíduos da proteína foram inicialmente simulados sob restrição, seguidos por uma segunda etapa de equilíbrio com número de partículas, pressão e temperatura constantes (NpT), sem aplicação de forças ou restrições. A temperatura foi ajustada pelo termostato de *Langevin* para 298 K, com o objetivo de alcançar um equilíbrio termodinâmico. E por último a etapa de produção foi conduzida em duas fases sequenciais de 100 ns cada, com temperatura de 298 K, pressão de 1 atm, intervalo de tempo de 2 fs e sem restrições sobre a conformação da proteína. Para avaliar estatisticamente a estabilidade da proteína, foram realizadas duas réplicas da dinâmica molecular, com coleta de dados das trajetórias a cada 10 ps durante o período total da simulação.

### 3.4 ANÁLISE

Para uma caracterização estrutural completa da proteína DHFR-TS, nosso estudo iniciou com uma validação rigorosa do modelo tridimensional utilizando o servidor *Swiss-Model*, que forneceu avaliações quantitativas detalhadas sobre a qualidade e a plausibilidade estrutural do modelo. Complementando esta etapa inicial, realizamos simulações por dinâmica molecular empregando o pacote *Amber22*, que nos permitiu investigar minuciosamente o comportamento dinâmico do sistema em condições fisiológicas simuladas, capturando as flutuações conformacionais essenciais para compreender a estrutura da proteína.

As análises das trajetórias de dinâmica molecular foram conduzidas utilizando o algoritmo CPPTRAJ do *AmberTools*, uma ferramenta robusta e amplamente reconhecida para processamento de grandes volumes de dados de simulações. Através de uma abordagem analítica multidimensional, avaliamos a estabilidade global do sistema calculando o RMSD (*Root Mean Square Deviation*), que nos permitiu monitorar a convergência do sistema e avaliar a estabilidade temporal da estrutura proteica em relação à sua conformação inicial. Paralelamente, o estudo do raio de giro forneceu informações valiosas sobre a compactação global da proteína ao longo da simulação, revelando eventuais mudanças na organização espacial da estrutura.

A dinâmica local foi minuciosamente caracterizada através do cálculo do RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), que nos permitiu mapear com precisão a flexibilidade residual específica, identificando domínios estruturais críticos e regiões com maior mobilidade. Esta análise foi cuidadosamente correlacionada com parâmetros estruturais complementares como a área superficial acessível ao solvente (SASA), revelando padrões dinâmicos de exposição de

resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos durante o processo de simulação, o que foi fundamental para compreender os mecanismos de interação molecular.

Para uma compreensão mais profunda da diversidade conformacional, implementamos uma análise de agrupamento utilizando o método *K-means*, que nos permitiu identificar e classificar sistematicamente os estados conformacionais mais representativos adotados pela proteína durante a simulação. Esta análise sofisticada foi baseada em matrizes de distância atômica e critérios de otimização rigorosos, garantindo a identificação precisa das conformações mais relevantes do ponto de vista termodinâmico e funcional.

Os modelos representativos obtidos desta análise conformacional foram subsequentemente submetidos a estudos detalhados de *docking molecular*, empregando protocolos computacionais de alta precisão. As interações proteína-ligante foram caracterizadas através de uma combinação de análises energéticas, incluindo o cálculo preciso das energias de ligação, e análises geométricas que avaliaram padrões de ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e os efeitos do ambiente solvente, proporcionando uma visão abrangente dos mecanismos de reconhecimento molecular.

Para a visualização integrada e interpretação dos resultados, adotamos uma estratégia multifacetada utilizando os *softwares PyMOL* para análises estruturais qualitativas de alta resolução e o *Discovery Studio* para caracterização detalhada das interações moleculares em nível atômico. Adicionalmente, realizamos análises comparativas abrangentes com estruturas homólogas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), o que nos permitiu contextualizar nossos achados dentro do panorama estrutural conhecido para esta família de proteínas, identificando tanto características conservadas quanto particularidades estruturais da DHFR-TS em estudo.

Esta abordagem metodológica abrangente e multidisciplinar nos proporcionou não apenas uma validação robusta do modelo estrutural da DHFR-TS, mas também *insights* profundos sobre sua dinâmica conformacional intrínseca e padrões de interação molecular. Os resultados obtidos estabelecem uma base para estudos subsequentes de desenho racional de ligantes e modificação estrutural direcionada, abrindo novas perspectivas para a investigação desta importante proteína. A integração das diversas técnicas computacionais empregadas neste trabalho demonstrou ser uma estratégia poderosa para o estudo de sistemas biomoleculares complexos, combinando precisão estrutural com compreensão dinâmica do comportamento molecular.

## 4 RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir da construção por homologia do modelo inicial, triagem virtual realizada para identificar compostos candidatos à inibição da enzima DHFR-TS de *Leishmania amazonensis*. Utilizando técnicas de *Virtual Screening* e *Docking Molecular*, os compostos foram avaliados com base na afinidade de ligação aos modelos estruturais da enzima, obtidos por meio das simulações por dinâmica molecular. Com o intuito de apresentar os principais compostos obtidos durante a fase de teste da triagem virtual com base em parâmetros como energia de interação e taxa de sucesso nas simulações.

### 4.1 MODELAGEM POR HOMOLOGIA E DINÂMICA MOLECULAR

Inicialmente, a modelagem por homologia foi utilizada para prever a estrutura tridimensional das proteínas, com base em sequências conhecidas. Modelos foram gerados a partir de proteínas de referência com alta similaridade, e refinados para refletir variações nas sequências alvo.

Em diversos pontos do alinhamento (ver figura 7) há regiões de alta identidade, nas quais os aminoácidos são idênticos (indicados pela presença de letras iguais nas duas linhas), e outras regiões nas quais ocorrem substituições (aminoácidos diferentes) ou inserções/deleções, indicadas pelos hífen (gaps) na sequência.

```

Alvo MSRAAAkFkEU PMPVTkADFAPPSeu RAFSEU VVAeu DkQHGEU GDGESEU PCRVPEDMAFFkDQTTeu eu RNkk - PP      69
3irm.2.A ----- FkEU MPETVAEGTReu Aeu RAfSeu VVAIDeHGeu GDGRSEU PCNVPEDMkFFRDeu TTTeu eu RgkNVkP      66

Alvo TDkkRNAVVMGRkTCESVPVkfFRPeu kGReu NVVeu SSKATVEEueu APeu P - EEkRAAAQDEU VVVNGGeu AAAY      138
3irm.2.A kRNAVVMGRkTCSEU PkFRPeu PGRReu NVVe) SSteu TQTeu eu Dseu PDEEkRNe) HADSeu VAVNGGeu EQAeu      136

Alvo Reu eu ARPPYCSSEU ETAYCVGGAQVYADAMeu SPCVEkeu QEVYeu TREU HTTAPACTRFFFPFPEN - - - AATAC      204
3irm.2.A Reu eu ASPNYTPSeu ETVYGeu GGGSVYAE) RPPCVHe) eu QAEU YRTTeu) RASESSCSV) FFRVPSGTEAAAGEU E) C)      206

Alvo Deu ASSQGRrkSAVDGeu E - - FEEU CkYVPRNHEERQYeu Eueu EU DREU MktGEU AkEDRTGVGTeu Seu FGAQMRf Seu R      272
Alvo QRETE) SEEE) SA - NNGE T) KYFFEK) PRN) EEEQYeu Seu VDREU) R) G) N) V) k) ) DRTGV) GTeu Seu FGAQMRf) Seu R)      275

3irm.2.A DNReu Peueu TTKrVFCRGVCEEueu CFeu RGETNAQeueu ADkDEU HEU CDGNGSREFeu DSRGeu TENTEMDeu GPVYGF      342
Alvo N) Reu Peueu TTKrVFCRGVCEEueu CFeu RGET) A) k) eu ) DkGVHeu CD) NG) S) RA) Feu DS) R) Geu TEYEEM) Deu GPVYGF      345

3irm.2.A QCRHFGAEYRGeu EANYDGEGVDQEU kFEU VETEU kANPNDRReu eu FTACNPCAeu HkMAeu PPChueu AQFYVNTEk      412
Alvo QCRHFGAAYTHHDANYDQG) Deu k) Feu VETeu k) NPDDR) Reu F) TACNPS) Aeu PR) MAeu PP) Chueu AQFYV) - N      413

3irm.2.A S) Eueu SC) Meu YQRSCDM) Geu GVPFNEU ASY) Aueu TEU) eu EU AkAT) Geu R) P) Geu V) H) Teu GDAHVYRS) H) DAeu kAQeu ERVP      482
Alvo HA) Eueu SC) Meu YQRSCDM) Geu GVPFNEU ASY) Aueu TEU) eu EU AkAT) Geu R) P) Geu V) H) Teu GDAHVYRS) H) V) E) PC) NE) Q) eu kRVPRA      483

Alvo FP) Teu VFkEERQ) Feu EDY) Eueu MDMEVU DYVPHPEU kMEMAV      520
Alvo FP) Teu V) R) R) R) E) Feu EDY) E) G) D) M) E) V) DYAPY) P) PEU SMkMAV      521
3irm.2.A

```

Figura 7 – Alinhamento das sequências primárias da DHFR-TS com o modelo 3IRM. Fonte: Servidor web *Swiss-Model*.

A identidade entre sequências quantifica o número de resíduos de aminoácidos idênticos

entre elas, enquanto o recobrimento refere-se à proporção da proteína modelada que se sobrepõe à proteína de referência. O modelo tridimensional da DHFR-TS foi desenvolvido com base na estrutura da Diidrofolato Redutase Timidilato Sintase de *Trypanosoma cruzi* (PDB ID: 3IMR), selecionada como molde pelo servidor *Swiss-Model* (<<https://swissmodel.expasy.org/>>) devido à alta identidade de 69,22%. Com isso, o modelo final da homologia foi construído, conforme ilustrado na figura 8.

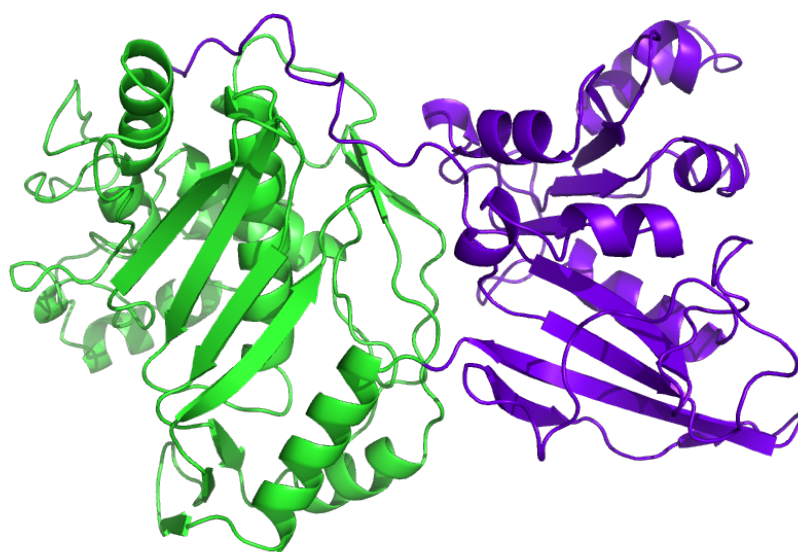


Figura 8 – Estrutura gerada por homologia para a enzima bifuncional DHFR-TS da *Leishmania amazonensis*, as cores azul e verde representam os domínios da DHFR e TS respectivamente.

Embora a proteína molde e a enzima em estudo apresentem alta similaridade, optou-se por refinar o modelo obtido por meio de simulações de Dinâmica Molecular. Foram realizadas duas simulações, cada uma com duração de 100 ns, com o objetivo de avaliar a estabilidade do modelo e permitir o relaxamento da estrutura apresentada. Após a modificação da temperatura, não foram observadas alterações conformacionais significativas.

Inicialmente, as alterações conformacionais ao longo das simulações foram analisadas por meio do desvio quadrático médio, calculado a partir das posições dos átomos em cada etapa das simulações, permitindo uma comparação entre as estruturas ao longo do tempo e destacando possíveis mudanças conformacionais. A figura 9 ilustra o comportamento do RMSD durante as simulações, fornecendo uma visão clara da evolução da estrutura do modelo e possibilitando a

avaliação de sua estabilidade temporal.

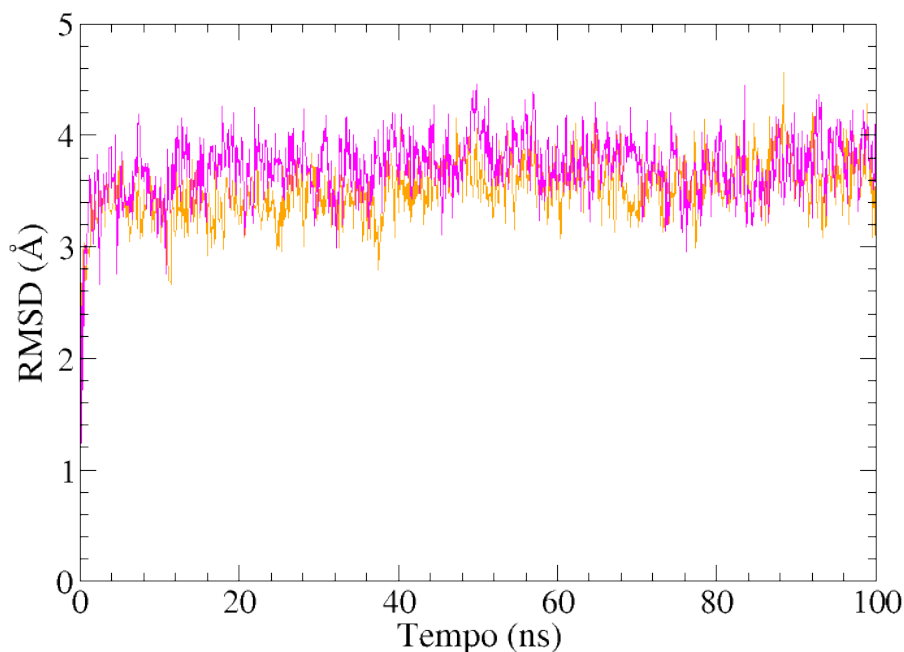


Figura 9 – Root Mean Square Deviation (RMSD). Na cor laranja está o resultado da DM1 e na cor magenta está o resultado da DM2.

O RMSD, que mede o desvio estrutural da proteína em relação à sua conformação inicial ao longo do tempo, é uma janela para entender como a proteína se adapta e se estabiliza no ambiente simulado. No gráfico ilustrado na figura 9, o eixo x representa o tempo da simulação, variando de 0 a 100 nanossegundos (ns), enquanto o eixo y mostra o valor do RMSD em angströms (Å).

Nos primeiros 5 ns, observa-se um aumento rápido no RMSD, de aproximadamente 1 Å para cerca de 3 Å, um comportamento típico do relaxamento inicial da proteína no ambiente simulado. Após essa fase inicial, o RMSD se estabiliza em valores entre 3 e 4,5 Å, indicando que a proteína atingiu um estado de equilíbrio. Pequenas flutuações nessa faixa são naturais e refletem a mobilidade intrínseca da proteína. Curiosamente, a curva magenta apresenta uma variação um pouco mais acentuada em comparação à curva laranja, sugerindo que uma das simulações por DM ou partes da estrutura pode ser ligeiramente mais flexível.

A estabilização torno de 3-4,5 Å é um sinal encorajador, indicando que a proteína mantém sua estrutura global ao longo do tempo, sem grandes alterações conformacionais que comprometam sua integridade. Se a estrutura estivesse instável, esperaríamos um crescimento

contínuo do RMSD ou flutuações irregulares significativas, o que não é observado aqui. Essa diferença entre as curvas abre caminho para uma análise mais detalhada, como a flutuação por resíduo (RMSF), de acordo com a figura 10 que pode ajudar a identificar regiões específicas da proteína que contribuem para essa flexibilidade adicional.

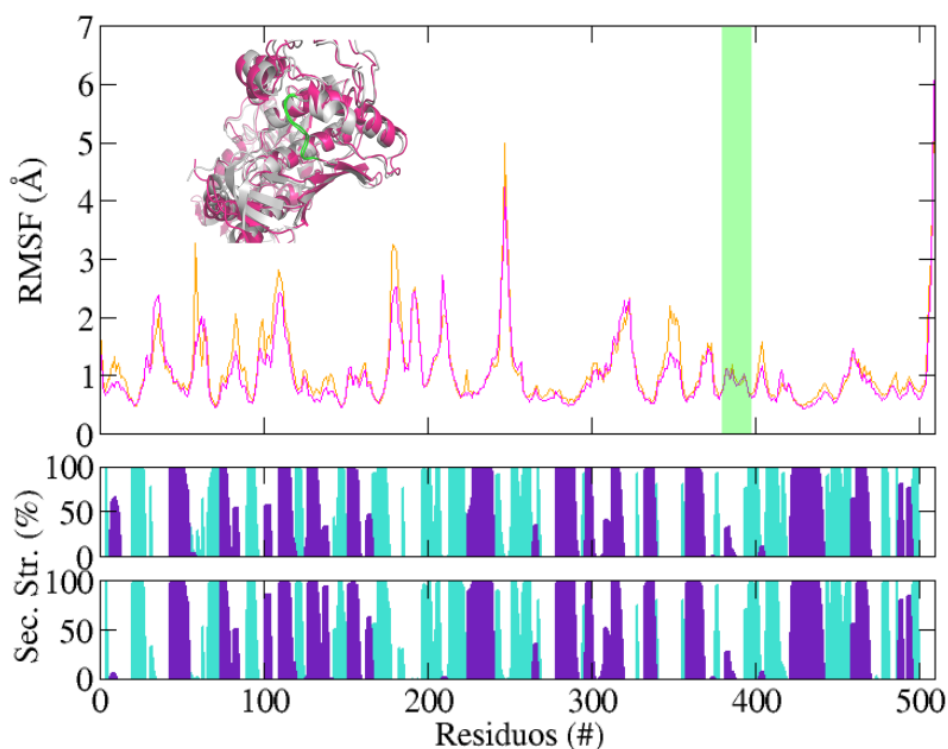


Figura 10 – Flutuação quadrática Média das raízes (RMSD e Estrutura secundária (DSSP)).

Nas análises de RMSF e DSSP, os perfis de flutuação das dinâmicas moleculares foram semelhantes, com picos pronunciados nos resíduos 200, 300 e 400, que correspondem a regiões de laços na estrutura da enzima, justificando a maior flutuação nesses trechos. O gráfico de RMSF (Root Mean Square Fluctuation) complementa a análise do RMSD ao fornecer uma visão mais detalhada da flexibilidade estrutural do modelo de DHFR-TS para a *Leishmania amazonensis* ao longo das dinâmicas moleculares. Enquanto o RMSD oferece uma visão geral da estabilidade da proteína, o RMSF mede a flutuação média de cada resíduo em relação à sua posição de referência, revelando a mobilidade local da proteína. A maioria dos resíduos apresentou valores de RMSF entre 1 Å e 2 Å, confirmando a estabilidade global observada no RMSD, mas regiões específicas, como os resíduos 200, 300 e 400, exibiram flutuações maiores, atingindo cerca de 5 Å. Picos superiores a 4 Å indicam regiões de maior flexibilidade, associadas a laços, áreas conhecidas por sua dinâmica intrínseca.

Vale destacar que a região dos resíduos 390-395, apesar de ser um laço, manteve uma certa estabilidade, o que é favorável, pois corresponde ao sítio ativo da enzima, como indicado na figura 10 em verde. O gráfico inferior, que apresenta a análise da estrutura secundária ao longo da simulação, reforça essa interpretação. A alternância entre diferentes conformações, como  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ , sugere que certas regiões podem ser propensas a mudanças estruturais, possivelmente relacionadas à sua função biológica. A imagem sobreposta da estrutura tridimensional da proteína, com destaque em rosa, permite visualizar essas regiões móveis no contexto da arquitetura global da DHFR-TS.

Com o intuito de analisar a estabilidade estrutural da DHFR-TS ao longo de duas simulações de dinâmica molecular foi realizada uma análise do raio de giro (RG). O qual mede a compactação da estrutura proteica ao longo do tempo, sendo um parâmetro essencial para avaliar a estabilidade conformacional e possíveis mudanças no estado estrutural da proteína. Na figura 11, o eixo x representa o tempo da simulação em nanosegundos (ns), variando de 0 a 100 ns, enquanto o eixo y indica o valor do raio de giro em angströms ( $\text{\AA}$ ). Duas curvas são apresentadas, assim como nas figuras anteriores, esta apresenta os resultados de duas DM.

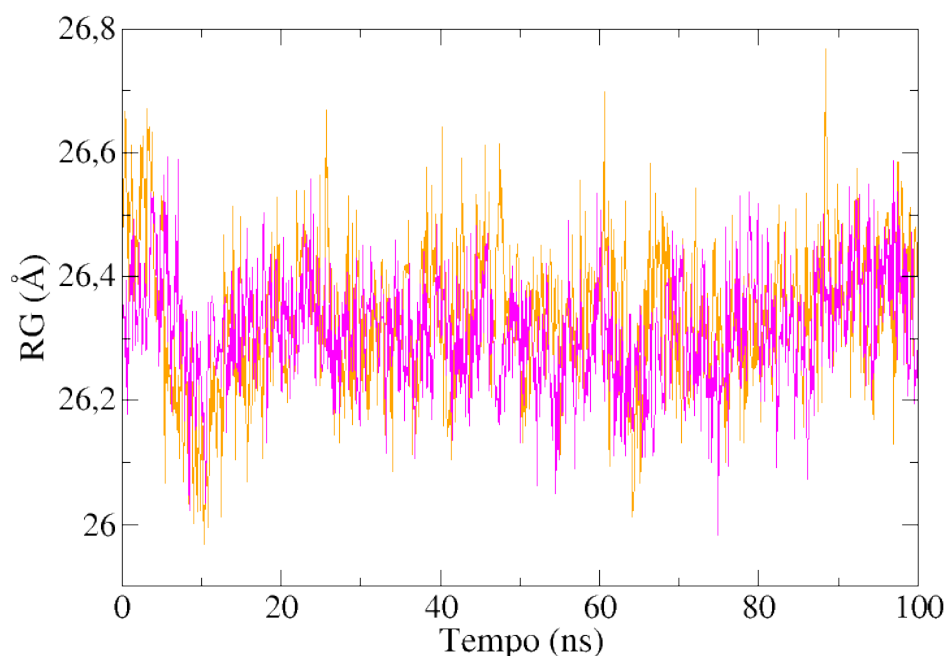


Figura 11 – Raio de Giro (RG) para estudo da compactação das estruturas proteicas durante a simulação da dinâmica molecular.

Observa-se que o RG permanece relativamente estável ao longo da simulação, variando

dentro de um intervalo pequeno, aproximadamente entre 26,0 e 26,6 Å. Esse comportamento indica que a proteína mantém sua compactação estrutural sem apresentar grandes expansões ou colapsos. Pequenas flutuações no RG são normais e refletem a dinâmica natural da proteína no ambiente simulado. A ausência de uma tendência ascendente ou descendente ao longo do tempo sugere que a estrutura global da DHFR-TS não sofreu grandes modificações conformacionais durante a simulação.

A estabilização do raio de giro em torno de 26,2-26,4 Å indica que a proteína não sofreu desdobramento nem colapso significativo, o que é um indicativo positivo de estabilidade estrutural. Caso houvesse um aumento progressivo do RG, isso poderia sugerir um processo de desnaturação ou expansão da proteína, enquanto uma redução contínua poderia indicar um colapso conformacional. A similaridade entre as curvas magenta e laranja reforça a robustez dos resultados, sugerindo que ambas as simulações ou componentes estruturais analisados apresentam comportamento semelhante.

Esses resultados, combinados com os dados de RMSD e RMSF previamente analisados, indicam que o modelo da DHFR-TS para a *Leishmania amazonensis* mantém uma estrutura estável ao longo da simulação, com algumas regiões específicas apresentando maior flexibilidade. Essa estabilidade estrutural é fundamental para a função da proteína e pode ser um fator importante na análise de interações com ligantes ou na investigação de possíveis modificações estruturais relevantes para sua atividade biológica.

Após explorar a estabilidade global (RMSD), a flexibilidade local (RMSF) e a compactação da proteína (Raio de Giro), a análise da área de superfície acessível ao solvente (Surf) complementa o entendimento da dinâmica estrutural da DHFR-TS. A análise da área de superfície proteica acessível ao solvente (SASA) complementa essa avaliação, permitindo estabelecer a conformidade estrutural dos modelos (Figura 12).

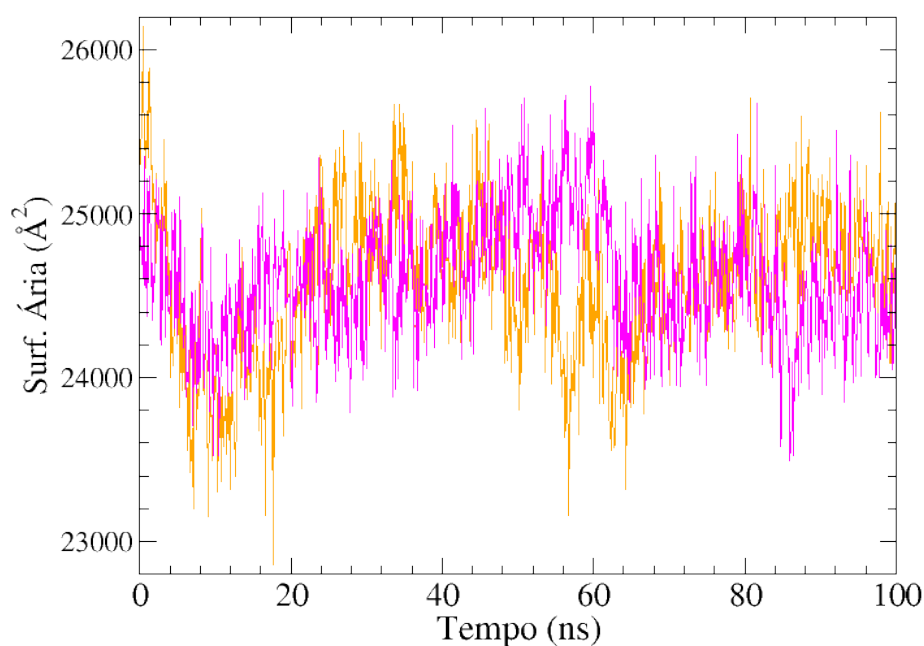


Figura 12 – Área de superfície acessível ao solvente (Surf) em angströms quadrado para as duas réplicas da DHFR-TS durante a simulação.

No gráfico da superfície da enzima, observamos flutuações entre aproximadamente 23000 Å<sup>2</sup> e 26000 Å<sup>2</sup> ao longo dos 100 ns de simulação. Essa variação está alinhada com a flexibilidade estrutural detectada no RMSF, especialmente nas regiões de laços, que tendem a contribuir para mudanças na acessibilidade ao solvente e, conseqüentemente, na área superficial da proteína. A curva magenta, que no RMSD apresentou maiores oscilações, também exibe variações mais acentuadas na superfície, reforçando a hipótese de uma maior mobilidade em uma das simulações.

A manutenção da superfície dentro de uma faixa relativamente estreita, sem grandes expansões ou colapsos abruptos, sugere que a proteína mantém uma estrutura funcional estável ao longo da simulação. Essa estabilidade é essencial para garantir que a enzima DHFR-TS conserve sua capacidade de interação com ligantes e desempenhe sua função biológica de forma eficiente. Assim, a análise conjunta desses parâmetros fortalece a conclusão de que ambas as dinâmicas moleculares produziram estruturas estáveis, com algumas variações locais na flexibilidade que podem ser relevantes para a atividade da proteína.

Com o intuito de obter um modelo representativo para as simulações de triagem virtual,

foi realizada uma análise por meio do método *K-means*<sup>1</sup>, um algoritmo de *clustering* que agrupa dados dos com base em suas semelhanças, minimizando a variação dentro de cada grupo e maximizando a variação entre os grupos, para identificar padrões nas simulações. Após determinar que dois clusters eram adequados, o *K-means* foi aplicado. Nas simulações, os dois representativos (rep) tiveram as seguintes porcentagens: Da primeira simulação por dinâmica molecular, rep.0 obteve 61,2% e rep.1 38,8%, enquanto na DM, rep.0 alcançou 90,8% e rep.1 9,2%. A ilustração dos representativos, tanto na forma de gráficos quanto na estrutura em *cartoon*, pode ser observada na figura 13.

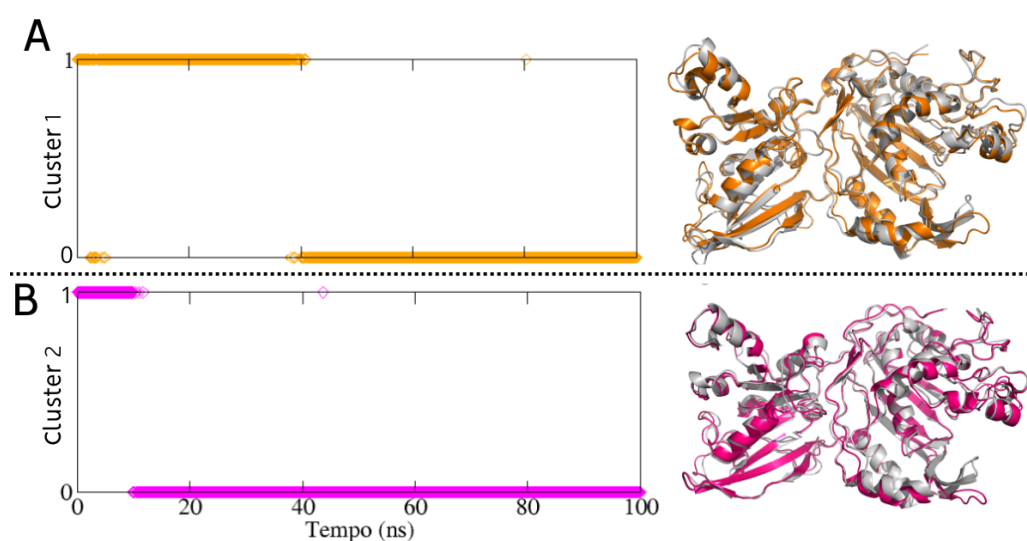


Figura 13 – Análise de agrupamento (clustering) e distribuição das populações conformacionais para duas simulações de DM.

Com os dois representantes que apresentaram as maiores porcentagens nas simulações de Dinâmica Molecular, foi realizada uma triagem virtual utilizando os compostos baixados do *DrugBank*. As estruturas tridimensionais à direita mostram os modelos de proteínas gerados pelos *clusters*. As estruturas sobrepostas em cinza representam os agrupamentos de menor porcentagem, enquanto as de cores vibrantes correspondem aos de maior porcentagem. Visualmente, há pequenas variações entre as conformações representadas pelas cores laranja (Dinâmica 1) e rosa (*hotpink*) (Dinâmica 2), sugerindo diferenças sutis entre as duas simulações.

<sup>1</sup> *k-meas* é um algoritmo de agrupamento (clustering) que divide um conjunto de dados em grupos (clusters) com base na similaridade entre eles



Figura 14 – Alinhamento estrutural dos modelos representativos com maior porcentagens do *cluster*. a ordem da DM estão respectivamente representadas nas cores laranja e rosa.

Essas variações menores nas estruturas tridimensionais indicam alterações sutis nas conformações finais entre as duas dinâmicas, possivelmente causadas por flutuações térmicas ou por trajetórias conformacionais ligeiramente distintas dentro de uma mesma faixa de energia. Além disso, foi realizado um alinhamento entre os dois representantes com maior porcentagem, resultando em um valor de RMSD de 1,694Å, considerado relativamente baixo. Isso indica que, apesar das diferenças percentuais, as estruturas secundárias permaneceram bastante semelhantes, conforme já apontado nas análises iniciais.

## 4.2 VIRTUAL SCREENING

A identificação de compostos com potencial atividade inibitória contra a enzima em estudo foi realizada através de uma abordagem computacional que combinou Triagem Virtual (*Virtual Screening*, VS) e *Docking Molecular*. Esta estratégia permitiu avaliar sistematicamente um grande número de moléculas, identificando aquelas com maior probabilidade de interação estável com o sítio ativo da enzima alvo. Os modelos estruturais utilizados no VS correspondem às conformações mais populosas da enzima DHFR-TS, determinadas a partir de análises de dinâmica molecular (DM). A seleção desses modelos garante que as simulações de docking sejam realizadas em estruturas proteicas representativas, considerando a flexibilidade conformacional da enzima.

Os compostos candidatos foram obtidos da biblioteca *DrugBank*, um banco de dados amplamente reconhecido que contém fármacos aprovados e moléculas bioativas em investigação. Esta seleção inicial foi submetida a um processo de filtragem em duas etapas consecutivas,

visando identificar os ligantes mais promissores.

1. Seleção por afinidade:

- Os compostos foram classificados com base em suas energias de interação com a enzima alvo;
- Foram selecionadas as 50 moléculas com as menores energias de ligação, indicando maior estabilidade termodinâmica no complexo proteína-ligante.

2. Taxa de sucesso ( $\xi$ ) - Reprodutibilidade do Docking:

- Cada composto foi submetido a 100 simulações independentes de *docking*, avaliando sua capacidade de atingir consistentemente uma conformação de baixa energia;
- A taxa de sucesso ( $\xi$ ) foi definida como a porcentagem de simulações em que o composto alcançou uma energia próxima à mínima encontrada;
- Apenas moléculas com ( $\xi$ ) > 80% foram consideradas, garantindo que os resultados fossem robustos e reprodutíveis.

Com base nesses critérios, foram selecionados os 10 melhores compostos para cada modelo representativo da DHFR-TS. Estas moléculas foram caracterizadas de acordo com:

- Código de identificação (*DrugBank* ID): Permite a recuperação de informações farmacológicas e estruturais no banco de dados;
- Número de átomos pesados: Relaciona-se com o tamanho molecular e possíveis interações com a proteína;
- Número de torções rotacionais: Indica a flexibilidade conformacional do ligante, influenciando sua adaptação ao sítio ativo;
- Energia de ligação: Medida da afinidade termodinâmica entre o ligante e a enzima;
- Taxa de sucesso ( $\xi$ ): Confiabilidade do resultado de docking.

Os resultados detalhados encontram-se apresentados na Tabela 1, fornecendo uma visão comparativa das propriedades moleculares e desempenho no docking.

Tabela 1 – Moléculas selecionadas pela triagem virtual. São apresentados os dez primeiros compostos em interação com os modelos da enzima DHFR-TS *Leishmania amazonensis*. Compostos comuns às duas triagens estão destacados por cores.

	Classificação	Compostos	Torções	Átomos	Energia (kcal/mol)	ξ (%)
Modelo 1	1	DB12622	2	31	-10.5	100
	2	DB11913	2	38	-10.3	85
	3	DB12513	2	40	-10.2	92
	4	DB11829	2	35	-9.9	100
	5	DB06888	0	30	-9.8	100
	6	DB12480	4	33	-9.8	99
	7	DB07181	6	26	-9.6	97
	8	DB07220	4	32	-9.6	83
	9	DB14555	2	25	-9.5	100
	10	DB03383	6	31	-8.1	92
Modelo 2	1	DB12622	2	31	-10.4	100
	2	DB04016	9	49	-10.4	98
	3	DB11925	2	34	-9.6	97
	4	DB12513	3	40	-9.5	98
	5	DB11913	2	38	-9.5	98
	6	DB11799	4	32	-9.4	95
	7	DB06888	0	30	-8.7	100
	8	DB15588	3	33	-8.6	90
	9	DB11829	2	35	-8.5	100
	10	DB08982	5	19	-8.1	100

Os resultados do *virtual screening* apresentados na tabela 1 mostram o desempenho de diferentes compostos para os dois modelos representativos, destacando moléculas que aparecem nas duas análises. Algumas características desses compostos fornecem as propriedades necessárias para se ligarem a uma região específica da proteína, garantindo a estabilidade tanto da conformação obtida quanto do sítio ativo, favorecendo a inibição da DHFR-TS.

As energias dos compostos selecionados com base no critério de afinidade apresentam valores de -10,5 à -8,1 kcal/mol, para o primeiro modelo, e de -10,4 à -8,1 kcal/mol para o segundo. Em ambos os casos, a taxa de sucesso selecionada foi superior a 80%. As moléculas apresentam poucos átomos pesados, entre 19-49, e o número de ligações passíveis de torção varia de 0 à 9 ângulos diferentes, o que pode aumentar ou diminuir as possibilidades conformacionais dessas moléculas.

Entre os compostos listados na tabela 1, cinco se destacam por aparecerem em ambos modelos, sendo eles: DB12622, DB11913, DB11829, DB06888 e DB12513. Todos esses compostos

obedecem à Regra de Lipinski, um conjunto de diretrizes amplamente utilizado na química medicinal para prever a probabilidade de um composto ser farmacologicamente ativo com base em suas propriedades físico-químicas. A Regra de Lipinski estabelece que, para um composto ter boa absorção e permeabilidade oral, ele deve atender a quatro critérios principais: (1) não mais do que 5 grupos doadores de ligações de hidrogênio (NH ou OH), (2) não mais do que 10 grupos aceptores de ligações de hidrogênio (N ou O), (3) um peso molecular inferior a 500 g/mol, e (4) um coeficiente de partição octanol-água (LogP) menor que 5 (Lipinski; Lombardo; Dominy; Feeney, 2001). A conformidade desses cinco compostos com a Regra de Lipinski sugere que eles possuem propriedades favoráveis para a biodisponibilidade oral e o potencial de se tornarem candidatos promissores para o desenvolvimento de fármacos. As interações foram avaliadas por meio do *software discovery studio*.

O composto com o melhor desempenho com os dois modelos foi o Lupeol que tem como código de identificação DB12622 no *Drugbank* e tem sido investigado para o tratamento da acne. Este composto pertence à classe dos triterpenoides, que são moléculas derivadas de terpenos, contendo seis unidades de isopreno (Wishart *et al.*, 2008). Em interação com a DHFR-TS os valores de energia foram de -10,5 kcal/mol para o primeiro modelo de -10,4 kcal/mol com o segundo modelo, a taxa de sucesso foi de 100% para os dois modelos. Além disso o lupeol apresentou várias interações moleculares favoráveis com a enzima, entre elas, destacam-se as interações  $\pi$ -Alquil com os resíduos PHE A-285, PHE A-428, PHE A-432, LEU A-428 e TRP A-314, e uma interação  $\pi$ -Sigma com o resíduo ILE A-313. Já as interações do tipo *van der Waals* foram observadas com os resíduos GLU A-292, ASN A-317, GLY A-429, ASN A-433, LEU A-397, CYS A-400, TYR A-340 e HIS A-401 com o primeiro. E para o segundo modelo, as interações *van der Waals*, ocorreram com os resíduos SER-429, PHE-425, ASN-426, GLU-285, ILE-306 e LEU-286. Interações  $\pi$ -Alquil foram observadas com TRP-307, TYR-430, PHE-289, LEU-390, TRP-337, ALA-379, TYR-333 e CYS-393. Também foram observadas interações com resíduos aromáticos como TRP-307 e PHE-289. Essas interações estão ilustradas na figura 15.

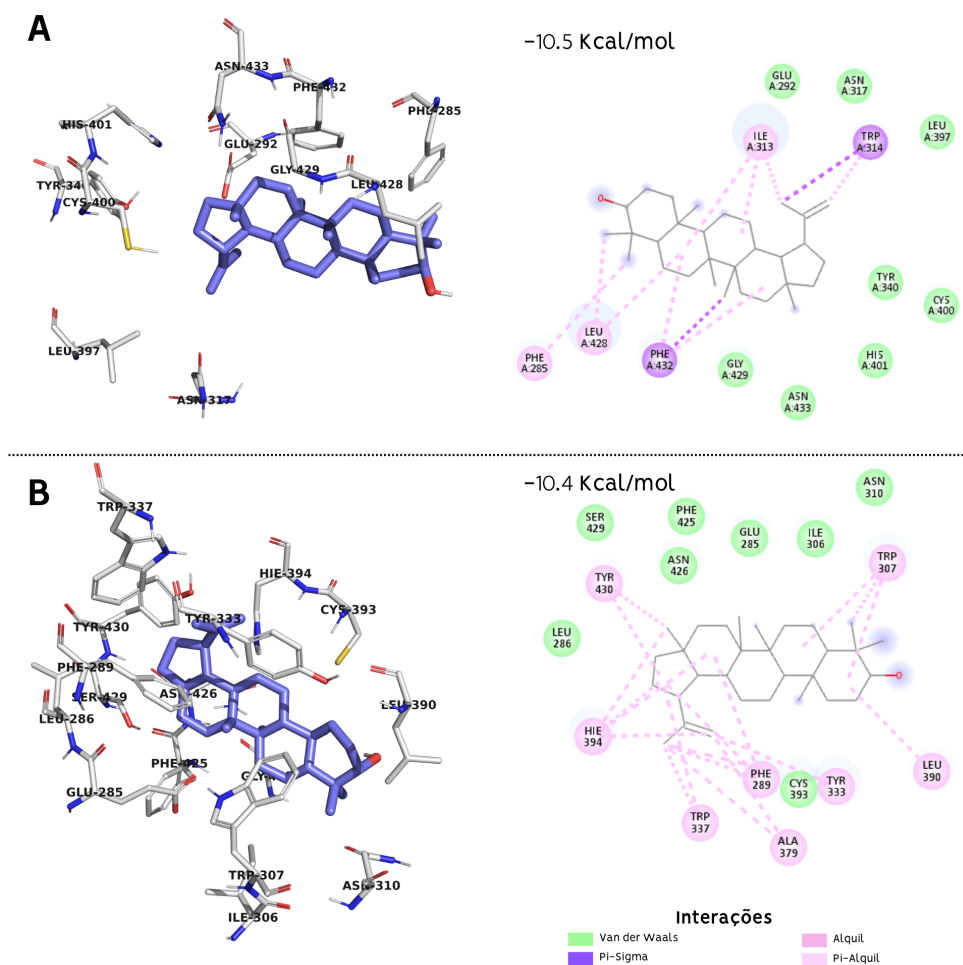


Figura 15 – Representação em 3D e 2D do composto DB12622 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2.

Os triterpenoides formam uma classe de compostos orgânicos originados de triterpenos, hidrocarbonetos naturais compostos por seis unidades de isopreno, resultando em uma estrutura molecular com 30 átomos de carbono. São amplamente encontrados em plantas, fungos e alguns organismos marinhos, e desempenham papéis importantes, como defesa química, estruturação das membranas celulares e em processos metabólicos. Sua estrutura é altamente variável, podendo incluir cadeias lineares ou anéis cíclicos, com grupos funcionais como hidroxilas, carboxilas ou carbonilas, o que aumenta a diversidade química e funcional desses compostos (Liu *et al.*, 2021).

Os triterpenoides podem ser classificados em várias subclasses, com base na organização dos seus esqueletos carbônicos, como lupanos, oleananos, ursanos e damaranos. Essa diversidade estrutural está diretamente associada às diferentes propriedades biológicas dos compostos. Muitos triterpenoides apresentam atividades farmacológicas notáveis, como propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas, hepatoprotetoras e imunomoduladoras, o que os torna um composto importante para desenvolvimento de agentes terapêuticos

(Saleem, 2009; Hill; Connolly, 2018).

Entre os triterpenoides mais conhecidos, destacam-se o ácido betulínico, com ação anticancerígena, e os ácidos oleanólicos e ursólico, que possuem propriedades anti-inflamatórias e hepatoprotetoras (Shanmugam *et al.*, 2013). Esses compostos são encontrados em diversas plantas, frutos, cascas de árvores e folhas, e têm sido usados em remédios tradicionais ao redor do mundo. Além disso, alguns triterpenoides desempenham funções estruturais nas plantas, ajudando a reduzir a perda de água e protegendo contra patógenos (Thimmappa *et al.*, 2014).

A biossíntese dos triterpenoides ocorre a partir do esqualeno, um intermediário fundamental no metabolismo de esteroides e outros lipídios. Por meio de reações enzimáticas, como ciclizações e modificações oxidativas, o esqualeno se transforma em uma variedade de estruturas triterpenoides. Os avanços biotecnológicos têm permitido a manipulação dessas vias biossintéticas para criar novas moléculas de interesse farmacológico e industrial (Augustin; Kuzina; Andersen; Bak, 2011; Moses; Pollier; Thevelein; Goossens, 2013).

Além do potencial terapêutico humano, os triterpenoides são estudados para uso em cosméticos, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-envelhecimento, além de suas aplicações na agricultura, como agentes naturais contra pragas e doenças (Bakrim *et al.*, 2022). Dada sua abundância na natureza e a ampla gama de funções que desempenham, os triterpenoides continuam a ser um foco importante de pesquisa em química orgânica, farmacologia e biotecnologia (Saleem, 2009; Hill; Connolly, 2018).

O segundo composto com melhor desempenho foi o composto DB11913, também conhecido pelo nome genérico Ly2090314, que apresenta uma ampla gama de interações moleculares. Na análise de interação com o primeiro modelo o valor da energia foi de -10,3 kcal/mol e com o segundo foi de -9,5 kcal/mol. Teve sua taxa de sucesso de 85% no primeiro caso e 98% no segundo, apesar de apresentar uma pequena diferença nos valores energéticos as interações em ambos os casos foram favoráveis a forte ligação com a enzima.

No primeiro modelo as interações prevalentes foram as de *van der Waals* identificadas com os resíduos HIS-463, SER-423, GLY-429, LEU-397, ASN-317, PHE-432, PHE-285, GLU-292 e CYS-400. Ligações de hidrogênio convencionais ocorreram com ASN-433, GLN-421 e CYS-400. Observe-se ainda a presença de ligações desfavoráveis do tipo doador-doador envolvendo GLN-421, ASN-433, ASN-317 e TYR-340, além de uma ligação desfavorável do tipo aceitador-aceitador com TYR-340. Outras interações incluem  $\Pi$ -Sulfur com CYS-400,  $\Pi - \Pi$  em forma de T com PHE-432 e  $\Pi$ -Alquil com ILE-313.

Já com o segundo, as interações *van der Waals* envolveram LEU-286, ILE-306, PHE-425, TRP-307 e GLU-285. Ligações de hidrogênio convencionais foram observadas com ASN-426, ASP-418 e GLN-414, enquanto interações  $\Pi$ -Alquil ocorreram com TYR-430, TRP-307 e PHE-425. Destaca-se que interações comuns em ambas as análises incluem interações *van der Waals* com PHE-425 e interações  $\Pi$ -Alquil com TRP-307.

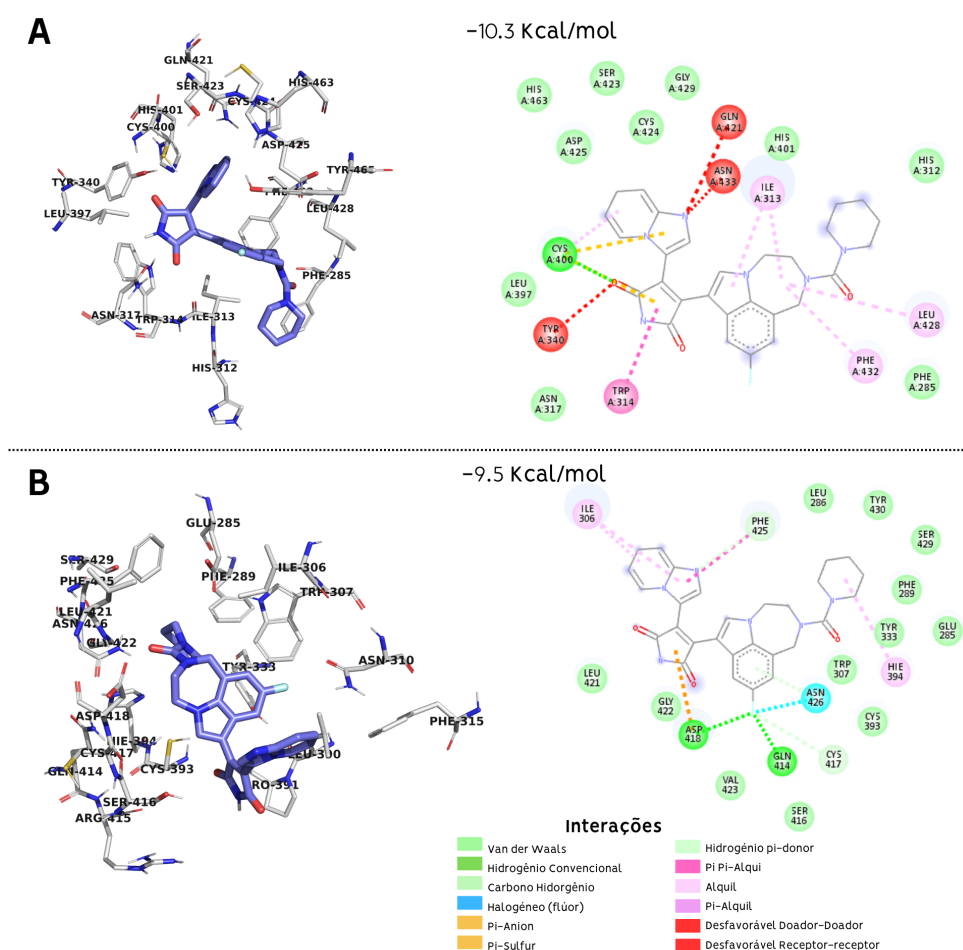


Figura 16 – Representação em 3D e 2D do composto DB11913 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2.

O DB11913 foi investigado em estudos secundários ao tratamento de leucemia, câncer avançado e câncer de pâncreas. Ele pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como 1,4-benzodiazepinas, caracterizados por um anel benzênico fundido a um anel diazepínico contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4.

As 1,4-benzodiazepinas são exclusivamente reconhecidas por suas propriedades farmacológicas, atuando como sedativos, ansiolíticos, anticonvulsivantes e relaxantes musculares. Sua estrutura básica pode ser modificada pela adição de diferentes grupos funcionais, gerando uma ampla diversidade de resultados com atividades biológicas específicas (Atkinson *et al.*, 2015).

Medicamentos como diazepam, lorazepam, clonazepam e alprazolam pertencem a essa classe, diferenciando-se em potência, duração de ação e periodicidade terapêutica. Por exemplo, o diazepam é indicado para ansiedade, espasmos musculares e convulsões, enquanto o clonazepam é usado principalmente em transtornos convulsivos e ansiedade.

Embora tenham efeitos terapêuticos relevantes, as 1,4-benzodiazepinas apresentam limitações, como o potencial de desenvolvimento de tolerância, dependência e efeitos colaterais, incluindo sobrecarga excessiva, prejuízo cognitivo e alterações motoras. Por isso, seu uso é geralmente restrito a períodos curtos e supervisionado por profissionais de saúde (Zhou *et al.*, 2024).

Além de sua relevância clínica, as 1,4-benzodiazepinas continuam sendo objeto de pesquisas químicas e farmacológicas, devido à sua especificidade estrutural. Estudos buscam resultados mais seletivos e eficazes, com menor risco de dependência, destacando o interesse contínuo nessa classe na química medicinal e na neurociência.

Diferentemente dos dois compostos anteriores que estão em fase de investigação, o DB12513 é um medicamento utilizado no tratamento de uma doença hereditária que afeta o sistema nervoso e causa problemas de movimento e também está em investigação para outras aplicações. Seu nome genérico é Omaveloxolona (RTA-408), um triterpenoide oleanano semisintético com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Jiang *et al.*, 2022; Probst *et al.*, 2015). Omaveloxolona atua como um ativador do fator nuclear (eritroide-derivado 2)-like 2 (Nrf2), um fator de transcrição que ajuda a reduzir o estresse oxidativo (Zhou *et al.*, 2024). Em pacientes com ataxia de Friedreich, uma condição genética que envolve disfunção mitocondrial, a via Nrf2 é prejudicada, resultando em uma atividade Nrf2 reduzida. O uso de ativadores Nrf2, como a omaveloxolona, é, portanto, uma abordagem terapêutica vantajosa para esses pacientes.

Em fevereiro de 2023, a FDA (Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos) aprovou a omaveloxolona para o tratamento da ataxia de Friedreich em adultos e adolescentes com 16 anos ou mais. No ano seguinte, em fevereiro de 2024, a EMA também aprovou o medicamento para o tratamento da mesma condição (Zesiewicz *et al.*, 2020). A omaveloxolona também foi avaliada para o tratamento de outras condições relacionadas à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. O DB12513 apresenta valores energéticos foram respectivamente de -10,2 e -9,5 kcal/mol com uma taxa de sucesso de 98% e 92% e uma série de interações moleculares interessantes com os dois modelos. Entretanto com o modelo um além de interações favoráveis tiveram algumas interações desfavoráveis como é possível verificar

na figura 17, identificada pela análise do *discovey studio* e destacada em vermelho, mas nada que desclasifique o omaveloxolona como um possível candidato a droga de tratamento da leishmaniose causada pela La.

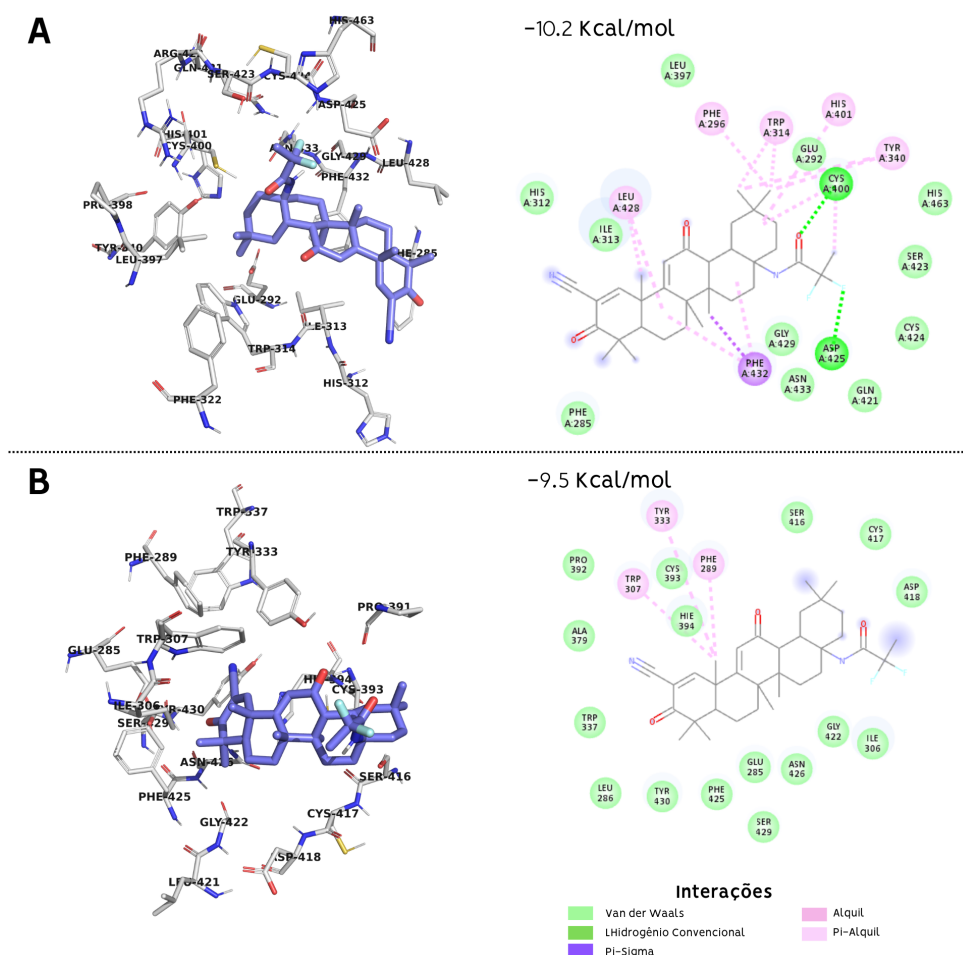


Figura 17 – Representação em 3D e 2D do composto DB12513 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2.

Com o primeiro modelo, foram observadas interações do tipo *van der Waals* com os resíduos PRO-392, ALA-379, TRP-337, LEU-286, TYR-430, PHE-425, SER-429, SER-416, CYS-417, ASP-418, GLY-422 e ILE-306. Além disso, interações  $\Pi$ -Alquil ocorreram com TYR-333, TRP-307, CYS-393, HIE-394 e PHE-289.

E no segundo modelo as interações do tipo *van der Waals* foram identificadas com os resíduos HIS A:312, LEU A:428, ILE A:313, PHE A:285, LEU A:397, HIS A:463, SER A:423, CYS A:424 e GLN A:421. Ligação de hidrogênio convencional foi observada com CYS A:400, enquanto interações do tipo Alquil ocorreram com PHE A:296, TRP A:314 e PHE A:432. Interações  $\Pi$ -Alquil foram identificadas com HIS A:401, TYR A:340, PHE A:285 e PHE A:432. Entre as interações comuns nas duas análises, destacam-se as interações  $\Pi$ -Alquil com

PHE A:285 e PHE-425. O composto DB11829, também conhecido como Ruboxistaurina, teve valores de energia de -9,9 e -8,5 kcal/mol e sua taxa de repetição foi de 100% nos dois casos como é possível notar na figura 18. A parte A mostra interações com o modelo 1 do tipo *van der Waals* com os resíduos TYR-465, HIS-463, LEU-428, PHE-432, GLY-429, GLU-292, TYR-340, CYS-424, ASN-433 e HIS-401. Além disso, foram detectadas ligações de hidrogênio convencionais com os resíduos ASN-433, GLN-421, CYS-400 e ASP-425. Interações adicionais incluem uma interação Pi-Anion com ASP-425, uma interação Pi-Sulfur com CYS-400 e uma interação Pi-Alquil com ILE-313.

No modelo 2 as interações foram mais variadas. CYS-393 apresentou uma interação Pi-Sulfur, enquanto ASN-310 e ASN-426 formaram ligações de hidrogênio eletrostáticas. Observou-se também interações Pi-Alquil com TYR-333 e LEU-390. Outros resíduos, como GLY-309, ILE-306, TRP-307, GLY-422, PHE-425, PRO-392 e HIE-394, formaram interações *van der Waals* com o ligante, evidenciando a complexidade das interações que contribuem para a estabilização do complexo.

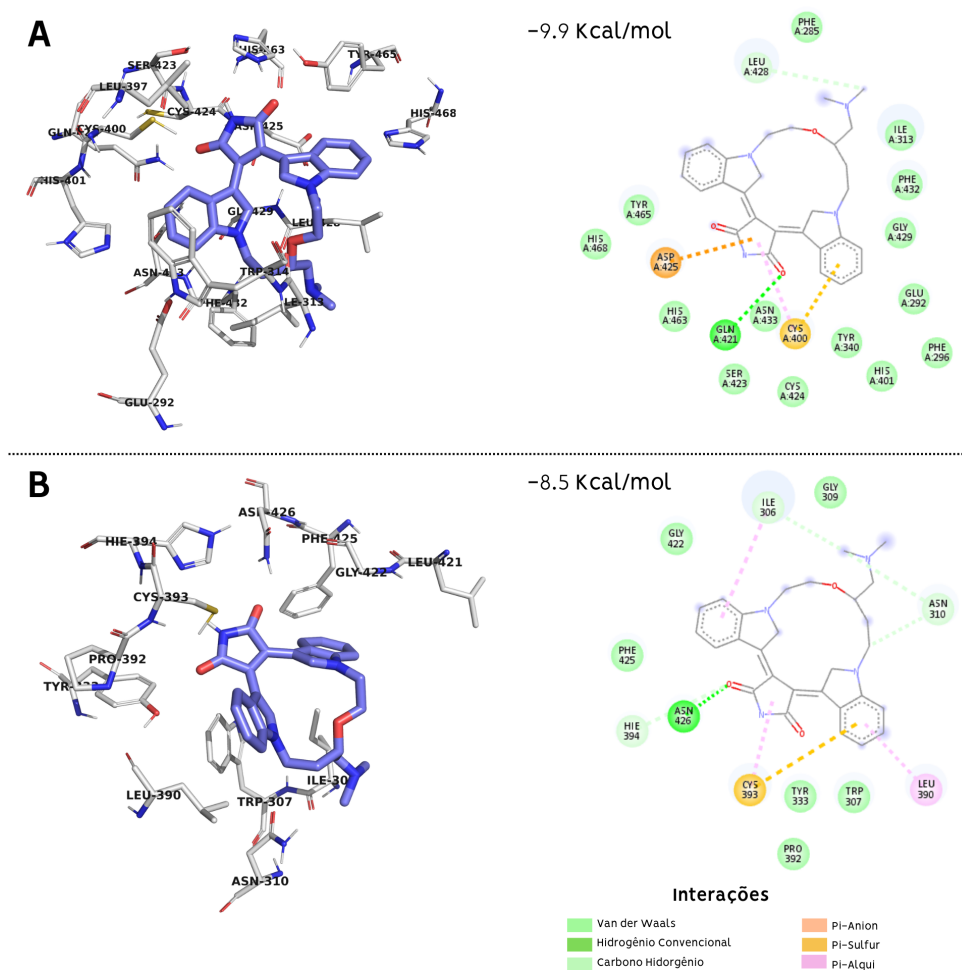


Figura 18 – Representação em 3D e 2D do composto DB11829 em interação com os receptores. A) Modelo 1 e B) Modelo 2.

Ruboxistaurina tem sido alvo de investigação na pesquisa sobre diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. Este composto pertence à classe das macrolactamas, um grupo de compostos orgânicos caracterizados pela presença de um anel lactâmico macrocíclico. A estrutura dessas moléculas é formada pela união de um grupo carboxila com um grupo amina, resultando em uma amida cíclica. Normalmente, esses compostos apresentam anéis com 12 ou mais átomos, e sua diversidade estrutural é ampliada devido a diferenças no tamanho do anel e na presença de grupos funcionais ou cadeias laterais (Zhou *et al.*, 2024).

Esses compostos apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, como ações antimicrobianas contra bactérias resistentes, atividades antitumorais, imunossupressoras, antiparasitárias e antivirais. Modificações estruturais ou o desenvolvimento de análogos de macrolactamas têm sido estratégias eficazes para melhorar sua atividade terapêutica e reduzir efeitos colaterais (Ladage *et al.*, 2011).

E como o último dos cinco componetes que tiveram interação com os dois modelos, temos o DB06888, pertencente à classe das quinoxalinas, um químico orgânico caracterizado por um sistema bicíclico que combina um anel benzênico fundido a um anel pirazínico. A fórmula molecular básica da quinoxalina é  $C_6H_4N_2$ . Sua estrutura é composta por dois anéis de seis membros fundidos, o que confere estabilidade aromática e permite modificações funcionais em diversas posições, possibilitando a obtenção de derivados com propriedades específicas. A síntese de quinoxalinas é frequentemente realizada pela reação de uma 1,2-diamina aromática com um composto dicarbonílico, como benzil ou glicol aldeído, em condições ácidas ou neutras. Este método é amplamente utilizado devido à sua simplicidade e eficiência (Berman *et al.*, 2000). Os valores energeticos alcançados pelo DB06888 foram de -9,8 kcal/mol com o modelo 1 e de -8,7 kcal/mol com o segundo. Além disso suas taxa de sucesso foram 100% nos dois casos. O que indica que mesmo com o valores de energias maiores que os outros ele ainda pode ser cogitado como possível alvo de estudo no combate a *Leishmania amazonensis*.

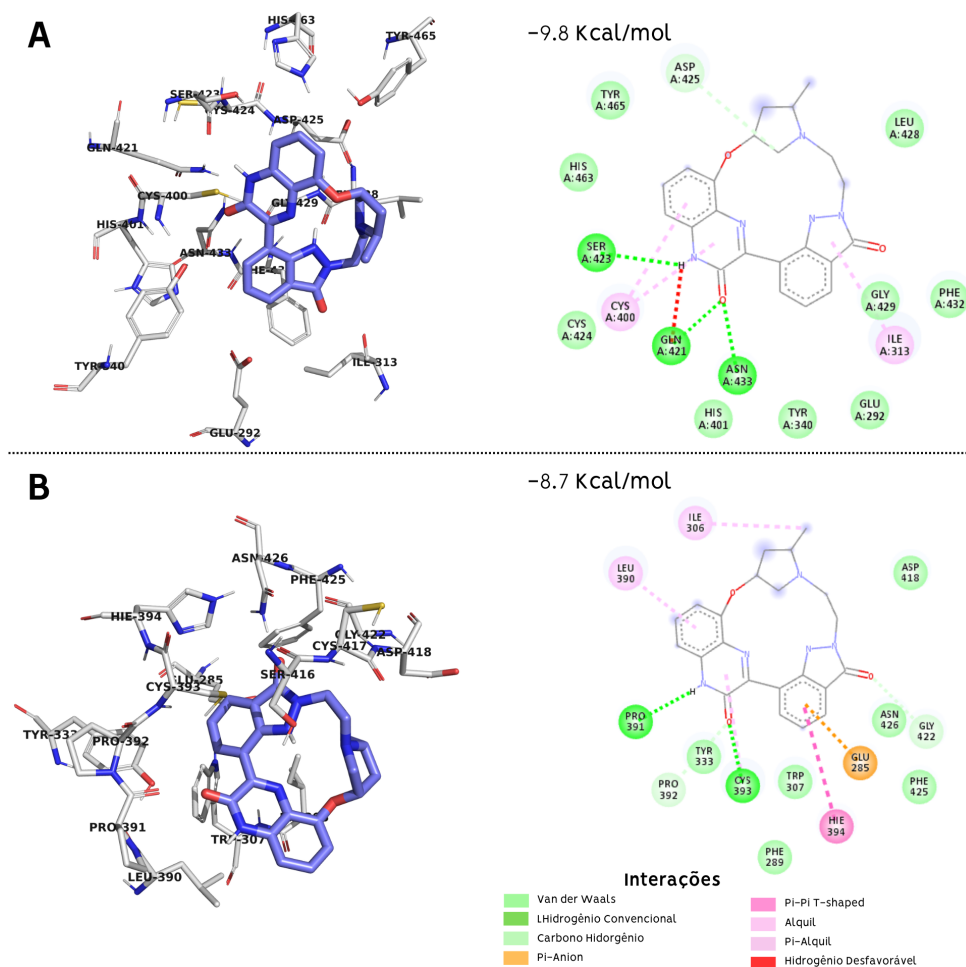


Figura 19 – Representação em 3D e 2D do composto DB06888 em interação com os modelos obtidos da: A) Modelo 1 e B) modelo 2.

Para os dois modelos da enzima DHFR-TS utilizados na triagem virtual, os resíduos de aminoácidos que tiveram interação foram diferentes, porém em sua maioria os tipos de interações foram favoráveis à fixação do composto na região de sítio ativo da enzima. Com o primeiro representativo, interações apresentadas foram do tipo *van der Waals* com os resíduos HIS-463, LEU-428, TYR-465, PHE-432, GLY-429, GLU-292, TYR-340, CYS-424, ASP-425, CYS-400, ASN-433 e HIS-401. Além disso, foram observadas ligações de hidrogênio convencionais com ASN-433, GLN-421, SER-423, enquanto uma ligação de hidrogênio desfavorável foi observada com GLN-421. Foi identificada também uma interação  $\Pi$ -Alquil com os resíduos ILE-313 e CYS-400.

Já com o segundo representativo, as interações do tipo *van der Waals* envolveram os resíduos PRO-391, PHE-289, CYS-393 e LEU-390. Ligações de hidrogênio convencionais ocorreram com GLU-285 e ASN-426, enquanto interações  $\Pi$ -Alquil foram observadas com TRP-307, HIE-394, ILE-306 e LEU-390. A ligação de hidrogênio com GLU-285 foi particularmente

importante para a estabilização do complexo.

As quinoxalinas possuem um vasto espectro de aplicações, especialmente devido às suas atividades biológicas. No campo medicinal, muitos compostos dessa classe exibem propriedades antimicrobianas (bactericidas e fungicidas) e estão sendo investigados como agentes anticancerígenos, antivirais, antiparasitários, anti-inflamatórios e antioxidantes. No setor de materiais avançados, as quinoxalinas são utilizadas em dispositivos luminescentes e materiais semicondutores devido às suas propriedades ópticas. Além disso, algumas quinoxalinas são empregadas como pesticidas e herbicidas no setor agrícola (Fernandes, 2020).

Adicionalmente, as quinoxalinas são frequentemente utilizadas como intermediários na síntese de outros compostos, devido às suas propriedades estruturais. A introdução de grupos funcionais em posições específicas do anel pode alterar significativamente as propriedades químicas e biológicas desses compostos, tornando-os valiosos para o desenvolvimento de novos materiais e medicamentos (Fernandes, 2020).

A análise das interações entre diferentes compostos e os resíduos de aminoácidos da proteína alvo revelou informações importantes sobre a estabilidade e afinidade dos ligantes no sítio de ligação. Os cinco compostos avaliados, DB12622, DB11913, DB12513, DB11829 e DB06888, apresentaram diferentes energias de interação e padrões de ligação, fornecendo informações sobre sua viabilidade como potenciais inibidores.

Dentre os compostos analisados, DB12622 destacou-se por apresentar a menor energia de interação, com valores de -10,5 kcal/mol na primeira réplica e -10,4 kcal/mol na segunda réplica. Esse resultado sugere uma interação mais estável entre esse ligante e a proteína, o que pode indicar uma afinidade superior. Em contrapartida, DB11829 apresentou a maior energia de interação, com valores de -9,9 kcal/mol e -8,5 kcal/mol, o que pode sugerir uma ligação menos favorável em comparação com os demais compostos. A eficiência de acoplamento ( $\xi$  %) variou entre 85% e 100%, indicando que a maioria dos compostos manteve interações significativas com a proteína ao longo da simulação.

As interações observadas abrangem diferentes tipos de forças intermoleculares, sendo predominantes as interações de *Van der Waals* e os contatos carbono-hidrogênio, que desempenham um papel crucial na estabilização do complexo proteína-ligante. Além disso, foram identificadas interações  $\pi$ -Sigma e  $\pi$ -Alquil, principalmente envolvendo resíduos aromáticos como PHE 432 e TRP 314, o que sugere um papel fundamental das interações  $\pi$ -eletrônicas na estabilização do complexo. Também foram observadas interações  $\pi$ -Ânion e  $\pi$ -Sulfur, particular-



atuando como pontos de ancoragem por meio de diferentes tipos de interações não covalentes. Por exemplo, resíduos como ASP 425 e HIS 401, que possuem grupos funcionais carregados ou polarizáveis, podem participar de ligações de hidrogênio ou interações iônicas, enquanto resíduos aromáticos como PHE 432 e TYR 340 podem contribuir com interações do tipo *stacking* ou efeitos hidrofóbicos.

Além disso, a localização desses resíduos em regiões flexíveis da proteína, próximas ao sítio ativo, reforça sua relevância na modulação da atividade enzimática. A flexibilidade conformacional dessas regiões pode permitir ajustes estruturais que facilitam a ligação de diferentes classes de inibidores, tornando-os alvos estratégicos para o desenvolvimento de fármacos.

No contexto geral, os resultados indicam que os compostos analisados apresentam padrões de interação promissores, com destaque para o ligante DB12622, que demonstrou maior afinidade pelo alvo biológico. Essa maior afinidade pode ser atribuída à predominância de interações estáveis, como forças de *Van der Waals* e ligações de hidrogênio, que são essenciais para a formação de complexos proteína-ligante robustos.

No entanto, a presença de interações desfavoráveis, como as repulsões doador-doador mencionadas anteriormente, sugere que ajustes estruturais podem ser necessários para otimizar a afinidade dos ligantes e minimizar efeitos indesejados. Por exemplo, a introdução de grupos substituintes que reduzam a densidade eletrônica em regiões críticas ou a modificação da geometria molecular para evitar sobreposições desfavoráveis pode melhorar significativamente o perfil de ligação.

Essas informações são fundamentais para o refinamento racional dos ligantes e para orientar futuras investigações no desenvolvimento de inibidores mais eficazes. A compreensão detalhada dos mecanismos de interação, tanto favoráveis quanto desfavoráveis, permite a elaboração de estratégias mais precisas no design de fármacos, aumentando as chances de sucesso em estágios posteriores de validação experimental. Estudos adicionais, como simulações de dinâmica molecular e ensaios de afinidade, podem ser realizados para validar essas hipóteses e aprimorar ainda mais a eficácia dos candidatos terapêuticos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Leishmaniose, classificada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), continua representando um grave desafio à saúde pública global, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Causada por parasitas do gênero *Leishmania*, a doença manifesta-se em formas cutânea, mucocutânea e visceral, afetando milhões de pessoas e impondo elevado custo social, econômico e sanitário. Embora os tratamentos atualmente disponíveis ofereçam algum grau de eficácia clínica, eles apresentam sérias limitações, como alta toxicidade, custo elevado, regimes terapêuticos prolongados e, cada vez mais, a emergência de cepas resistentes. Tal cenário reforça a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas mais eficazes, seguras e acessíveis.

Nesse contexto, a enzima diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) destaca-se como um alvo molecular altamente promissor para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos inovadores. Sua importância decorre da função essencial que desempenha na biossíntese de folatos, fundamentais para a síntese de nucleotídeos e, conseqüentemente, para a replicação do DNA do parasita. A peculiaridade estrutural da DHFR-TS em *Leishmania amazonensis* — uma enzima bifuncional única, em contraste com as enzimas separadas em humanos — confere a esse alvo terapêutico uma elevada especificidade, favorecendo o desenvolvimento de inibidores seletivos com menor risco de toxicidade para o hospedeiro.

Este estudo foi conduzido em três etapas metodológicas interdependentes. A primeira consistiu na modelagem por homologia da estrutura tridimensional da DHFR-TS de *L. amazonensis*, seguida por simulações de dinâmica molecular (DM) de 100 ns, com o objetivo de refinar e estabilizar a conformação da proteína. Na segunda etapa, realizou-se uma triagem virtual utilizando a técnica de ancoragem molecular (*docking*) com um conjunto de 9.213 compostos do banco de dados DrugBank, composto por fármacos aprovados ou em desenvolvimento. Essa análise possibilitou a identificação de 10 candidatos com alto potencial de interação com o sítio ativo da enzima. Entre esses, cinco compostos (DB12622, DB11913, DB11829, DB06888 e DB12513) se destacaram por sua recorrência em diferentes conformações da enzima, sugerindo maior robustez nos resultados e uma provável eficácia inibitória.

A terceira etapa consistiu na análise qualitativa e quantitativa das interações proteína-ligante, com destaque para os resíduos de aminoácidos mais relevantes nas ligações e os tipos de interações químicas envolvidas (pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações

hidrofóbicas, entre outras). Esses dados fornecem subsídios importantes para o desenho racional de inibidores mais potentes, seletivos e com melhor perfil farmacológico.

Os resultados obtidos demonstram que a integração de ferramentas computacionais avançadas, como modelagem molecular, simulações de dinâmica e triagem virtual, é uma abordagem viável e eficaz para a identificação de potenciais candidatos terapêuticos contra a Leishmaniose. Essa estratégia não apenas reduz os custos e o tempo envolvidos nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos, mas também maximiza a assertividade na escolha de moléculas promissoras, que podem ser posteriormente validadas em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Este trabalho, portanto, contribui de forma relevante para o campo da descoberta racional de fármacos contra doenças negligenciadas. Ao propor uma metodologia reprodutível e eficiente, voltada à identificação de inibidores da DHFR-TS de *L. amazonensis*, o estudo amplia as perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a Leishmaniose Tegumentar. Espera-se que os compostos identificados possam ser objeto de futuras validações experimentais, abrindo caminho para soluções terapêuticas mais acessíveis e sustentáveis.

Por fim, ressalta-se que os avanços aqui apresentados não apenas fortalecem o conhecimento científico sobre os mecanismos moleculares da Leishmaniose, mas também apontam caminhos para a inovação tecnológica no enfrentamento de doenças que historicamente têm sido negligenciadas pelos sistemas tradicionais de pesquisa e desenvolvimento farmacêutico. Assim, este trabalho reforça o papel da ciência como instrumento de transformação social, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida de populações vulneráveis e para a construção de políticas públicas mais eficazes no combate às DTNs.

## REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. den; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://europepmc.org/articles/PMC3365071>>. Acesso em: 10 de Out. de 2024.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in latin america: Systematic review. **American journal of tropical medicine and hygiene**, 2007.
- ANDRADE, C.; NEVES, B.; MELO-FILHO, C.; RODRIGUES, J.; SILVA, D.; BRAGA, R.; CRAVO, P. In silico chemogenomics drug repositioning strategies for neglected tropical diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4355–4379, 2019.
- ATKINSON, J. M.; RANK, K. B.; ZENG, Y.; CAPEN, A.; YADAV, V.; MANRO, J. R.; ENGLER, T. A.; CHEDID, M. Activating the Wnt/-Catenin pathway for the treatment of melanoma—application of LY2090314, a novel selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125028, apr 2015.
- AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435–457, apr 2011. Epub 2011 Feb 16.
- BAKRIM, S.; BENKHAIRA, N.; BOURAIS, I.; BENALI, T.; LEE, L.-H.; OMARI, N. E.; SHEIKH, R. A.; GOH, K. W.; MING, L. C.; BOUYAHYA, A. Health benefits and pharmacological properties of stigmaterol. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, 2022. ISSN 2076-3921. Disponível em : <<https://www.mdpi.com/2076-3921/11/10/1912>>. Acesso em: 20 de Set. de 2024.
- BAREIRO, S. B. **Avaliação de Desempenho de Análises de Ancoragem Molecular em Nuvens de Computadores por meio de Workflow Científicos**. VIII, 58 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Escola Politécnica, Rio de Janeiro, 2013. Orientadores: Marta Lima de Queirós Mattoso e Kary Ann del Carmen Soriano Ocaña. Projeto de Graduação – UFRJ/ Escola Politécnica/ Curso de Engenharia de Computação e Informação, 2014.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; JÚNIOR, G. G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. Ribeiro de; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, may 1991.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER., L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, jan 2000.

BLAKLEY, R. L. Eukaryotic dihydrofolate reductase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 70, p. 23–102, 1995.

BRASIL, M. d. S. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Ministério da Saúde, Brasília, p. 189, 2017. Edição eletrônica. Ilustrado. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, sep 2018. Acesso em: 10 de Nov. de 2024.

CARRERAS, C. W.; SANTI, D. V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 721–762, 1995. Comprehensive review with 217 references.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65–72, jan 2005. Includes 4 illustrative figures and 89 references.

COSCONATI, S.; FORLI, S.; PERRYMAN, A. L.; HARRIS, R.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Virtual screening with AutoDock: Theory and practice. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 597–607, jun 2010. Includes practical protocols for virtual screening workflows.

COSTA, F. G. **Prospecção de inibidores para a enzima malato sintase do Paracoccidioides brasiliensis: uma avaliação por triagem virtual e dinâmica molecular**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Jataí, 2015. Dissertação (Mestrado).

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, nov 2003. Comprehensive review with 86 references.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, nov 2009. Includes 6 clinical figures and 2 treatment tables.

DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter on Protein Crystallography**, v. 40, n. 1, p. 82–92, 2002.

DISCOVERY. **Software Discovery Studio Visualizer 2021**. 2021. <<https://www.3ds.com/products-services/biovia/>>. Acesso em: 08 de Nov. de 2024.

DOMINGUES, B. F. 3d-pharma: uma ferramenta para triagem virtual baseada em fingerprints de farmacóforos. In: . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:204183398>>. Acesso em: 10 de Out. de 2024.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, 2012. Open-access article with 7 figures and 1 table.

ELMAHALLAWY, E. K.; MARTINEZ, A. S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J. M. N.; FERNANDEZ, J. G. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, aug 2014.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179–200, 2010. Includes epidemiological data for 13 NTDs and control strategies.

FERNANDES, V. H. C. **Funcionalização direcionada de quinoxalinas substituídas visando obtenção de substâncias bioativas**. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020. Dissertação (Mestrado).

FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em pamp;d de fármacos. **Química Nova**, Sociedade Brasileira de Química, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000010>>. Acesso em: 20 de Out. de 2024.

FIELD, M. S.; STOVER, P. J. Safety of folic acid. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1414, n. 1, p. 59–71, feb 2018. Part of the special issue: 'Folate status and health: challenges and opportunities'.

FISCHER, E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894. Seminal paper introducing the 'lock-and-key' hypothesis of enzyme action.

GILBERT, I. H. Inhibitors of dihydrofolate reductase in *Leishmania* and trypanosomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2-3, p. 249–257, jul 2002. Reviews 120+ DHFR inhibitors and their antiparasitic potential.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71–80, 01 2003.

GORDON, J. C.; MYERS, J. B.; FOLTA, T.; SHOJA, V.; HEATH, L. S.; ONUFRIEV, A. H<sup>++</sup>: a server for estimating pK<sub>a</sub>s and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W368–W371, jul 2005. First description of the widely-used H<sup>++</sup> web server for molecular simulations.

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, apr 2010. Includes 5 diagnostic algorithms and treatment flowcharts.

GRIMALDI, G. J.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, jul 1993. Comprehensive review with 325 references and 7 tables.

GUIMARÃES, V.; COSTA, P.; SILVA, F.; SILVA, K.; SILVA, K.; ARAÚJO, A.; RODRIGUES, E.; FILHO, S. B. Phlebotomine sandflies (diptera: Psychodidae) in sao vicente ferrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of pernambuco, brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 66–70, 02 2012.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 12, p. 1294–1329, dec 2018. Critical review covering 2013-2018 with 1,136 references.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, sep 2007. Landmark paper introducing the concept of "rapid-impact package" for NTD control.

INFOESCOLA. Os 20 aminoácidos essenciais ao organismo. 2020. <<https://www.infoescola.com/bioquimica/os-20-aminoacidos-essenciais-ao-organismo/>>. Acesso em: 10 out. 2024.

ISLAN, G. A.; DURÁN, M.; CACICEDO, M. L.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; MARTINEZ, D. S. T.; CASTRO, G. R.; DURÁN, N. Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible? **Acta Tropica**, v. 170, p. 16–42, jun 2017. Comprehensive review with 7 tables and 4 figures.

IVANETICH, K. M.; SANTI, D. V. Thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 3, p. 367–371, apr 1990. Early characterization of the TS-DHFR bifunctional enzyme in protozoa.

JIANG, Z.; QI, G.; LU, W.; WANG, H.; LI, D.; CHEN, W.; DING, L.; YANG, X.; YUAN, H.; ZENG, Q. Omaveloxolone inhibits IL-1-induced chondrocyte apoptosis through the Nrf2/ARE and NF- $\kappa$ B signalling pathways *in vitro* and attenuates osteoarthritis *in vivo*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 952950, sep 2022. Includes 8 figures and 1 table of experimental results.

KNIGHTON, D. R.; KAN, C. C.; HOWLAND, E.; JANSON, C. A.; HOSTOMSKA, Z.; WELSH, K. M.; MATTHEWS, D. A. Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. **Nature Structural Biology**, v. 1, n. 3, p. 186–194, mar 1994. First crystal structure of the bifunctional DHFR-TS enzyme at 2.9Å resolution.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 5, Part 1, p. 693–708, nov 1994. ISSN 0190-9622. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962294702292>>. Acesso em: 15 de Out. de 2024.

KOSHLAND, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 44, n. 2, p. 98–104, feb 1958. Landmark paper introducing the 'induced fit' theory of enzyme action.

LADAGE, D.; TILEMANN, L.; ISHIKAWA, K.; CORRELL, R. N.; KAWASE, Y.; HOUSER, S. R.; MOLKENTIN, J. D.; HAJJAR, R. J. Inhibition of PKC $\alpha/\beta$  with ruboxistaurin antagonizes heart failure in pigs after myocardial infarction injury. **Circulation Research**, v. 109, n. 12, p. 1396–1400, dec 2011. Rapid communication reporting cardioprotective effects in a porcine MI model.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. B. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, sep 2009. ISSN 0036-4665. Comprehensive review of NTD epidemiology in Brazil.

LINDOSO, J. A. L.; MOREIRA, C. H. V.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)**, v. 10, p. 193–201, oct 2018. Open-access review with 3 tables and 1 figure.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3–26, mar 2001. Landmark paper introducing the 'Rule of Five' for drug design.

LIU, K.; ZHANG, X.; XIE, L.; DENG, M.; CHEN, H.; SONG, J.; LONG, J.; LI, X.; LUO, J. Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. **Pharmacological Research**, v. 164, p. 105373, feb 2021. Systematic review with 7 figures and 3 tables summarizing 200+ studies.

MARQUES, M. R. F. **Bioquímica**. 1ª edição revisada. ed. Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2014. 182 p. Material didático para educação a distância. Inclui: estrutura de biomoléculas, propriedades da água e vias metabólicas. ISBN 978-85-61485-07-8.

MARTINS-MELO, F. R.; CARNEIRO, M.; RAMOS, A. N. J.; HEUKELBACH, J.; RIBEIRO, A. L. P.; WERNECK, G. L. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006559, jun 2018. First subnational GBD analysis for NTDs in Brazil with 27-year trends.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dec 2009. Description of the widely-used AutoDock4 software with enhanced flexibility modeling.

MOSES, T.; POLLIER, J.; THEVELEIN, J. M.; GOOSSENS, A. Bioengineering of plant (tri)terpenoids: From metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*. **New Phytologist**, v. 200, n. 1, p. 27–43, oct 2013. Comprehensive review with 3 figures and 2 tables.

NARE, B.; LUBA, J.; HARDY, L. W.; BEVERLEY, S. New approaches to Leishmania chemotherapy: Pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitology**, v. 114, n. Suppl, p. S101–S110, 1997. Seminal paper establishing PTR1's role in antifolate resistance.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; KRISTEK, S. J. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: From sequence alignments to structural models. **Protein Science**, v. 15, n. 4, p. 808–824, apr 2006. Comprehensive benchmark of 11 modeling programs with test cases.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, mar 2016. Seminal review analyzing treatment costs as percentage of household income in endemic regions.

ONG, Y. C.; ROY, S.; ANDREWS, P. C.; GASSER, G. Metal Compounds against Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 2, p. 730–796, jan 2019. Comprehensive review covering 400+ metal compounds with 15 tables and 20 figures.

ORGANIZATION, W. H. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases**. [S.l.]: World Health Organization, 2010. Disponível em: <<https://iris.who.int/handle/10665/44440>> Acesso em: 03 de Out. de 2024.

\_\_\_\_\_. **Leishmaniasis**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 de Out. de 2024.

\_\_\_\_\_. **Neglected tropical diseases**. [S.l.]: World Health Organization, 2023. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1)>. Acesso em: 02 de Dez. de 2024.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076–1083, oct 2001. First documented case of transfusion-transmitted leishmaniasis in dogs.

PEARLMAN, D. A.; CASE, D. A.; CALDWELL, J. W.; ROSS, W. S.; CHEATHAM, T. E.; DEBOLT, S.; FERGUSON, D.; SEIBEL, G.; KOLLMAN, P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1, p. 1–41, 1995. ISSN 0010-4655. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001046559500041D>>. Acesso em: 10 de Nov. de 2024.

PROBST, B. L.; TREVINO, I.; MCCAULEY, L.; BUMEISTER, R.; DULUBOVA, I.; WIGLEY, W. C.; FERGUSON, D. A. RTA 408, A Novel Synthetic Triterpenoid with Broad Anticancer and Anti-Inflammatory Activity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122942, apr 2015.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; MCNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, jan 2019.

RAKESH, R.; JOSEPH, A. P.; BHASKARA, R. M.; SRINIVASAN, N. Structural and mechanistic insights into human splicing factor SF3b complex derived using an integrated approach guided by the cryo-EM density maps. **RNA Biology**, v. 13, n. 10, p. 1025–1040, oct 2016.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, sep 2007.

ROCHA, K. B. **Virtual screening e dinâmica molecular para identificação de inibidores da enzima corismato sintase de *Mycobacterium tuberculosis***. 123 p. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10923/XXXXXX>>. Acesso em: 14 de Out. de 2024.

SALAM, N.; AL-SHAQHA, W. M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the Middle East: incidence and epidemiology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3208, oct 2014.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109–115, aug 2009. ISSN 0304-3835.

SANTOS, S. O. dos; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. de P.; FREITAS, R. A. de; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315–317, jul 1998.

SCHWEITZER, B. I.; DICKER, A. P.; BERTINO, J. R. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 8, p. 2441–2452, may 1990.

SHAMSHAD, H.; BAKRI, R.; MIRZA, A. Q. Dihydrofolate reductase, thymidylate synthase, and serine hydroxymethyltransferase: successful targets against some infectious diseases. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 7, p. 6659–6691, jul 2022.

SHANMUGAM, M. K.; DAI, X.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1579–1587, jun 2013.

SILVA, A. C. Costa-da; NASCIMENTO, D. O.; FERREIRA, J. R. M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; LIMA, L. Freire-de; MORROT, A.; DECOTE-RICARDO, D.; FILARDY, A. A.; LIMA, C. G. Freire-de. Immune responses in leishmaniasis: An overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, mar 2022.

SILVA, H. d. A. **Ferramentas virtuais contra doenças tropicais: dengue e doença de Chagas como alvos**. 176 p. Tese (Doutorado) — Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/12048>>. Acesso em: 06 de Set. de 2024.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, may 2004. ISSN 0074-0276. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762004000300001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762004000300001)>. Acesso em: 19 de Nov. de 2024.

SINGH, O. P.; SACKS, D.; SUNDAR, S. Asymptomatic Leishmania infection: a new challenge for Leishmania control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424–1429, may 2014. ISSN 1537-6591.

SOUZA, S. D. de. **Estudo de inibidores de colinesterases aplicando técnicas de QSAR-2D (HQ SAR) e docking molecular**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/59/teses/793349.pdf>>. Acesso em: 10 de Out. de 2024.

STRANDMARK, J.; STEINFELDER, S.; BEREK, C.; KÜHL, A. A.; RAUSCH, S.; HARTMANN, S. Eosinophils are required to suppress Th2 responses in Peyer's patches during intestinal infection by nematodes. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 3, p. 661–672, may 2017.

STROUD, R. M.; FINER-MOORE, J. S. Conformational dynamics along an enzymatic reaction pathway: Thymidylate synthase, “the movie”. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 239–247, jan 2003.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53–63, jan 2013.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P.; OSBOURN, A. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 225–257, 2014.

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. 455–461, jan 2010.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. 1ª edição. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2014. 282 p. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/166105>>. Acesso em: 25 de Set. de 2024. ISBN 978-85-69288-00-8.

VICKERS, T. J.; BEVERLEY, S. M. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 63–80, 2011.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; BEER, T. A. P. de; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, jul 2018.

WENG, H.-B.; CHEN, H.-X.; WANG, M.-W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 67, jun 2018.

WINKLER, D. A. Use of Artificial Intelligence and Machine Learning for discovery of drugs for neglected tropical diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 614073, mar 2021.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; CHENG, D.; SHRIVASTAVA, S.; TZUR, D.; GAUTAM, B.; HASSANALI, M. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D901–D906, jan 2008.

YAMEY, G.; TORREELE, E. The world's most neglected diseases. **BMJ**, v. 325, n. 7357, p. 176–177, jul 2002.

ZESIEWICZ, T. A.; HANCOCK, J.; GHANEKAR, S. D.; KUO, S.-H.; DOHSE, C. A.; VEGA, J. Emerging therapies in Friedreich's Ataxia. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 20, n. 12, p. 1215–1228, dec 2020.

ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, D.; YU, X.; SHEN, X.; ZHOU, Y.; WANG, S.; QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHU, F. TTD: Therapeutic Target Database describing target druggability information. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. D1, p. D1465–D1477, jan 2024.