UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

DIEGO CABRAL SILVA

Reposicionamento de fármacos para *Leishmania* spp: estratégias “in silico” e avaliação experimental

GOIÂNIA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [ ] Tese

2. Nome completo do autor

DIEGO CABRAL SILVA

3. Título do trabalho

REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA *Leishmania* spp: ESTRATÉGIAS "IN SILICO" E AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Carolina Horta Andrade**, **Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2021, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **DIEGO CABRAL SILVA**, **Usuário Externo**, em 23/08/2021, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2285090** e o código CRC **27CEDF3A**.

Referência: Processo nº 23070.043811/2021-18 SEI nº 2285090

DIEGO CABRAL SILVA

Reposicionamento de fármacos para *Leishmania* spp: estratégias “in silico” e avaliação experimental

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.
Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Drª Carolina Horta Andrade

GOIÂNIA
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Diego Cabral
Reposicionamento de fármacos para Leishmania spp [manuscrito] : estratégias “in silico” e avaliação experimental / Diego Cabral Silva. - 2015.
vi, 95 f.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Horta Andrade.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.
Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. leishmaniose. 2. QSAR. 3. Triagem Virtual. 4. Bioinformática. 5. Reposicionamento de fármacos. I. Andrade, Carolina Horta, orient. II. Título.

CDU 576.8

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – **e-mail : ppgmtsp.ufg@gmail.com**

UFG

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DIEGO CABRAL SILVA - Aos quatro dias do mês de agosto do ano de 2015 (04/08/2015), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. CAROLINA HORTA ANDRADE, FLORIANO PAES SILVA JÚNIOR e PEDRO VITOR LEMOS CRAVO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA Leishmania spp: ESTRATÉGIAS "IN SILICO" E AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL",** em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **PARASITOLOGIA**, de autoria de **DIEGO CABRAL SILVA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. CAROLINA HORTA ANDRADE, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de argüição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora	**Aprovado / Reprovado**
Profa. Dra. Carolina Horta Andrade	Aprovada
Prof. Dr. Floriano Paes Silva Júnior	APROVADO
Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Habilitado, (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 01 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

_____

_____

_____

	Assinatura
Profa. Dra. Carolina Horta Andrade (FF/UFG)	
Prof. Dr. Floriano Paes Silva Júnior (FIOCRUZ/RJ)	
Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo (IPTSP/UFG)	
Secretário da Pós-Graduação	

CONFERE COM O ORIGINAL
José Clementino de Oliveira Neto
Assistente em Administração do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
SECRETÁRIO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof. Dra. Carolina Horta Andrade pela orientação, disponibilidade e incentivo.
Ao Rodolpho de Campos Braga, pela sempre pronta disposição em auxiliar e orientar durante a realização deste trabalho.
A todos os demais estudantes, da graduação e pós-graduação, do LabMol.
Agradeço a minha família, pelo apoio direto ou indireto para a realização desse trabalho.
Agradeço a Prof. Dra. Marina Clare Vinaud e a Tatiane Luiza Costa, por viabilizar a parte experimental do trabalho no LAERPH/IPTSP.
A todos os demais professores e técnicos da Faculdade de Farmácia e do IPTSP, que contribuíram diretamente na minha formação que culminou não consolidação deste trabalho.
À CAPES, FAPEG e CNPq, pelo apoio financeiro.

“No real da vida, as coisas acabam com menos formato, nem acabam. Melhor assim. Pelejar por exato, dá erro contra a gente. Não se queira.”

(João Guimarães Rosa)

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS **IX**

RESUMO **XI**

ABSTRACT **XII**

1 INTRODUÇÃO **13**

1.1 A indústria farmacêutica e as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) **13**

1.2 Leishmaniose **14**

1.2.1 Agente etiológico 14

1.2.2 Ciclo biológico 16

1.2.3 Formas clínicas 17

1.2.3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana 18

1.2.3.2 Leishmaniose Visceral Americana 19

1.2.4 Epidemiologia 20

1.2.4.1 Novo Mundo 22

1.2.5 Tratamento 26

1.2.5.1 Antimoniais pentavalentes 28

1.2.5.2 Anfotericina B 29

1.2.5.3 Pentamidina 30

1.2.5.4 Paromomicina 30

1.2.5.5 Miltefosina 31

1.2.5.6 Cetoconazol 31

1.3 Estratégias para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos **32**

1.3.1 Desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador 33

1.3.2 Estratégias de busca por homologia 36

1.4 Reposicionamento de fármacos **37**

2 OBJETIVOS **41**

2.1 Objetivo geral **41**

2.2 Objetivos específicos **41**

3 MÉTODOS **42**

3.1 Bioinformática: seleção de possíveis novos alvos moleculares e fármacos aprovados para o reposicionamento **42**

3.1.1 Construção do banco de dados 42

3.1.2 Identificação de potenciais alvos 43
3.1.3 Compilação da lista de potenciais alvos e fármacos associados 43
3.1.4 Lista de fármacos não-avaliados 43

3.2 Quimioinformática: desenvolvimento de modelos de QSAR 44
3.2.1 Conjunto de dados 44
3.2.2 Cálculo de descritores 45
3.2.2.1 Fingerprints 45
3.2.2.2 SiRMS 45
3.2.2.3 Dragon 46
3.2.3 Desenvolvimento dos modelos de QSAR 46
3.2.4 Avaliação do desempenho dos modelos 47

3.3 Avaliação biológica 48
3.3.1 Manutenção dos parasitos 48
3.3.2 Triagem biológica e determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE50) dos fármacos estudados 48
3.3.3 Ensaios com promastigotas 48
3.3.4 Análises estatísticas 49

4 RESULTADOS 50
4.1.1 Construção do banco de dados 50
4.1.2 Busca por homologia 50

4.2 Quimioinformática: desenvolvimento de modelos de QSAR 56
4.2.1 Conjunto de dados 56
4.2.2 Modelos gerados 56

4.3 Avaliação biológica 57
4.3.1 Triagem biológica e determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE50) dos fármacos estudados 57

5 DISCUSSÃO 59

5.1 Bioinformática: seleção de possíveis novos alvos moleculares e fármacos aprovados para o reposicionamento 59
5.2 Quimioinformática: desenvolvimento de modelos de QSAR 70
5.3 Avaliação biológica 72

6 CONCLUSÃO 74
REFERÊNCIAS 75

APENDICE A – Artigo a ser submetido **95**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia das diversas espécies de *Leishmania* (modificado de WHO, 2010a)...15
Figura 2 - Ciclo biológico de *Leishmania* sp. As setas vermelhas indicam os estágios de vida do parasito no hospedeiro invertebrado, e as setas azuis os estágios no hospedeiro vertebrado. (1) Promastigotas metacíclicas inoculadas pelo hospedeiro invertebrado. (2) Formas promastigotas fagocitadas por macrófagos. (3) Formas promastigotas transformadas em amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. (4) Lise do macrófagos e liberação de amastigotas. (5) e (6) Vetor ingere formas amastigotas ao realizar o repasto sanquíneo. (7) Formas amastigotas convertem-se em promastigotas no tubo digestório do vetor (8) Formas promastigotas se multiplicam por divisão binária e migram para a probóscide do inseto. (Adaptado de: CDC 2014, www.cdc.gov).....17
Figura 3 - As formas clínicas da Leishmaniose no Novo Mundo. 18
Figura 4 - Distribuição de novos casos de leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral no mundo, 2012 (Adaptado de WHO, 2014). 21
Figura 5 - Número de casos confirmados de tegumentar americana e leishmaniose visceral no Brasil e por regiões, 1990-2012.....24
Figura 6 - Letalidade da leishmaniose visceral no Brasil e por regiões, 2000-2012.....25
Figura 7 - Distribuição por estados de espécies causadoras de LTA no Brasil, 2005 (Adaptado de BRASIL, 2010).....26
Figura 8 - Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses: (1) miltefosina, (2) anfotericina B, (3) antimoniato de N-metilglucamina, (4) paromomicina, e (5) pentamidina. 27
Figura 9 - Fosmidomicina.....37
Figura 10 - Comparação entre o modelo tradicional de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos *versus* o reposicionamento de fármacos. ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade; EMEA: *European Medicines Agency*; FDA: *Food and Drug Administration*; MHLW: *Ministry of Health, Labour and Welfare;* ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitá 39
Figura 11 - Estratégia para a construção do banco de dados de genes.....42
Figura 12 - Fluxo de trabalho utilizado na estratégia de bioinformática.....44
Figura 13 - Fluxo de trabalho para desenvolvimento dos modelos de QSAR. (Modificado de TROPSHA, 2010).....47
Figura 14 - Distribuição dos fármacos identificados pela estratégia de bioinformática por classe terapêutica. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, forma clínica, vetores e hospedeiros reservatórios confirmados ou preditos.....22
Tabela 2 - Resultados obtidos na busca por homologia. 51
Tabela 3 - Resultados estatísticos dos melhores modelos de QSAR gerados. 56
Tabela 4 - Resultados estatísticos dos melhores modelos consenso utilizando a combinação de quatro modelos individuais.....57
Tabela 5 – Valores expressos em µM das CE50 dos fármacos avaliados contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. 58
Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia. 63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACB	Acurácia Balanceada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATC	Antidepressivo tricíclico
CADD	*Computer-Aided/Assisted Drug Design* (Planejamento de fármacos auxiliado por computador)
CDK	*Chemistry Development Kit*
Chts	*Combination High Throughput Screening* (Triagem em larga escala combinada)
COX	Ciclo-oxigenase
DNDi	*Drugs for Neglected Diseases Initiative*
DTN	Doença tropical negligenciada
ECFP	*Extended-Connectivity Fingerprints*
EMEA	*European Medicines Agency*
Esp.	Especificidade
SVM	*Support vector machine*
RF	*Random forest*
FDA	*Food and Drug Administration*
HTS	*High Throughput Screening* (Triagem em larga escala)
LBDD	*Ligand-Based Drug Design* (Planejamento de fármacos baseado no ligante)
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral

MHLW	*Ministry of Health, Labour and Welfare*
MMV	*Medicines for Malaria Venture*
MS	Ministério da Saúde
NEQ	Nova entidade química
ODM	Objetivos do Milênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PDB	*Protein Data Bank*
PDE	*Phosphodiesterase* **(**Fosfodiesterase)
PPP	Parceria público-privada
QSAR	*Quantitative Structure-Activity Relationship* (Relação quantitativa entre a estrutura e atividade)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBDD	*Structure-Based Drug Design* (Planejamento de fármacos baseado na estrutura)
Sen.	Sensibilidade
SiRMS	*Simplex representation of molecular structure*
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TDR	*Tropical Disease Research*
TTD	*Therapeutic Target Database*
TV	Triagem virtual

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas pela picada de insetos vetores pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya*. São estimadas 30.000 mortes e 1,3 milhões de novos casos por ano. Atualmente, a farmacoterapia disponível apresenta grandes limitações no que concerne à eficácia e, principalmente, à elevada toxicidade, efeitos adversos e alto custo de algumas terapias. Por estas razões, é premente a necessidade de novas alternativas terapêuticas que sejam mais eficazes. Devido ao alto custo do processo tradicional de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, estratégias alternativas vêm sendo desenvolvidas para acelerar e economizar esse processo. Dentre elas, destaca-se o reposicionamento de fármacos, que consiste em buscar novas aplicações terapêuticas para fármacos disponíveis no mercado. O objetivo do presente trabalho foi a busca e identificação de fármacos aprovados e disponíveis no mercado com potencial atividade leishmanicida, utilizando técnicas de bio- e quimioinformática, e, posteriormente, a avaliação experimental desses fármacos em ensaios *in vitro* contra formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania.* Inicialmente, construiu-se um banco de dados de genes de *Leishmania* genes comuns a cinco espécies (*L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L.mexicana*), e específicos do gênero *Leishmania*, tentando explorar potenciais alvos moleculares efetivos contra todas as espécies e essenciais ao processo de diferenciação e desenvolvimento do parasito. Esse banco de dados foi utilizado para interrogar 2 bases de dados de fármacos aprovados (DrugBank, TTD), na tentativa de identificar alvos homólogos validados para outras doenças. Além disso, foram gerados modelos de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR) binários, a partir de dados de ensaios fenotípicos disponíveis na literatura, utilizando diferentes descritores e 2 métodos de aprendizado de máquina; posteriormente foram construídos modelos por consenso, combinando os modelos individuais. A estratégia de busca por homologia permitiu a identificação de 36 novos possíveis alvos moleculares, que precisam ser validados experimentalmente, e 122 fármacos. Desses 122 compostos, 28 tem atividade leishmanicida reportada na literatura, demonstrando a alta capacidade dessa estratégia em identificar essas moléculas. Cinco dos fármacos selecionados por essa metodologia foram avaliados *in vitro* contra formas promastigota do parasito (lansoprazol, ibuprofeno, sertaconzol, nilutamida e clomifeno) e três apresentaram atividade (mais de 50% de morte dos parasitos) na triagem biológica com 100 µM. Esses fármacos (ibuprofeno, sertaconzol, e clomifeno) foram encaminhados para determinação da concentração efetiva em 50%. Ibuprofeno apresentou CE50 de 55,08 µM, e Sertaconazol CE50 < 15 µM . A CE50 do clomifeno 5,75 µM ficou abaixo da CE50 da pentamidina (7,24), fármaco padrão, sugerindo um potencial de atividade interessante, que precisa ser confirmada contra amastigotas.Além disso, os modelos de QSAR gerados apresentaram parâmetros estatísticos adequados, especialmente os modelos por consenso. Esses modelos podem ser utilizados como filtros em processo de triagem virtual, ajudando na seleção de mais compostos potencialmente ativos. O presente trabalho foi efetivo na identificação de novos compostos com potencial para serem reposicionados.

Palavras-chave: leishmaniose, reposicionamento de fármacos, bioinformática, QSAR, triagem virtual, ensaios *in vitro*.

ABSTRACT

Leishmaniases are diseases caused by more than 20 protozoa parasites belonging to the genus *Leishmania*, and transmitted through the bite of infected female phlebotomine sandflies. An estimated 20,000 to 30,000 deaths and 1.3 million new cases occur annually. Currently available drugs have serious limitations regarding their efficacy and especially their toxicity, side effects and costs. Thus, there is a pressing need for new therapies that are safer and more effective. Due to the high costs of traditional process of drug discovery and development, alternative strategies have been developed to speed up this process, and reducing its costs. Among them, there is the drug repositioning, which is the discovery of new therapeutic applications for drugs already on the market. The aim of this work was the search and identification of drugs approved and clinically available with potential antileishmanial activity, using bio- and cheminformatics approaches, and experimental validation of these drugs using *in vitro* assays. Initially, we generated a database of *Leishmania* genes that are common to five species (*L. amazonensis, L. major, L. braziliensis, L. infantum* e *L.mexicana*), specific to the genus *Leishmania*, trying to explore potential molecular targets that could be effective against all species and essential to the process of development and differentiation of the parasite. This database was used to interrogate three database of approved drugs (DrugBank, STITCH, and TTD) aiming to identify homologues of validated targets for other diseases. Furthermore, binary QSAR models were generated from phenotypic assay data, using different descriptors, and two machine learning methods, and then consensus models were built. Homology serach allowed the identification of 36 new potential molecular targets that need to be validated experimentally, and 122 drugs. Of these 122 compounds, 28 were previously reported on the literature as actives. Five drugs not yet tested were selected for biological screening *in vitro* against promastigotes (lansoprazole, ibuprofen, sertaconzole, nilutamide and clomifen). Three of them showed activity at 100 µM: ibuprofen (IC50 55,08 µM), sertaconazole (IC50 < 15 µM) and clomifen (IC505,75 µM), more potent than the standard (pentamidine IC50 7,24), suggesting a potential activity, which must be confirmed against amastigotes. Besides that, the QSAR models generated had adequate statistical parameters, especially for consensus models. The best models can be used as filters in a virtual screening process. *In vitro* assays in the promastigote form of *L. amazonensis* were standardized, and used to successfully identify new potential candidates for drug repositioning.

Keywords: leishmaniasis, drug repositioning, bioinformatics,QSAR, virtual screenig, *in vitro* assays.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A indústria farmacêutica e as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN)

No contexto da pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos, os investimentos são majoritariamente feitos pelas indústrias farmacêuticas. Esse panorama justifica-se pelo imenso retorno financeiro gerado nesse mercado: em 2011, movimentou cerca de U$880 bilhões (ADEUSI, 2011). Contudo, mesmo com essa perspectiva de um alto retorno financeiro, a introdução de um novo fármaco no mercado é um processo complexo, competitivo, longo, oneroso e com uma probabilidade muito pequena de sucesso. Estima-se que desde a concepção do projeto até a introdução de um único fármaco no mercado, se gasta de 12 a 15 anos e cerca de US$800 milhões, podendo em alguns casos chegar a US$ 1,8 bilhão (PAUL et al., 2010; MESTRE-FERRANDIZ; SUSSEX; TOWSE, 2012).

As indústrias farmacêuticas investem cerca de US$50 bilhões anualmente em P&D (PHRMA, 2013). Todo esse investimento, entretanto, ocorre de uma maneira muito desequilibrada, sendo que a grande maioria dos recursos é empregada no desenvolvimento de fármacos destinados ao tratamento de patologias que assolam países desenvolvidos, como doenças cardiovasculares e câncer, por exemplo (MORAN et al., 2009).

O investimento em descoberta e desenvolvimento de fármacos na área de doenças tropicais negligenciadas (DTN) está muito aquém do necessário, deixando mais de um bilhão de pessoas desamparadas (MORAN et al., 2009; WHO, 2012a), considerando que estratégia global para o controle dessas doenças, sugerida nos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), é a quimioterapia preventiva (MAY, 2007). Essas enfermidades são consequências do subdesenvolvimento que atinge várias regiões do planeta, especialmente África, Ásia e as Américas, (BEYRER et al., 2007) e causaram quatro milhões de mortes em 2010 (LOZANO et al., 2012).

Apenas 0,6% do investimento mundial em P&D de novos fármacos são direcionados para DTNs (MORAN et al., 2009; LIESE; SCHUBERT, 2009). Nesse contexto estão doenças causadas por protozoários (doença de Chagas, leishmaniose, doença do sono), helmintos (filariose, ascaridíase, oncocercose, esquistossomose), bactérias (hanseníase, tracoma, úlcera de Buruli) e vírus (dengue, febre amarela, raiva) (WHO, 2010a).

Os últimos 15 anos foram marcados por aumentos no financiamento e pesquisa de novos fármacos contra doenças negligenciadas: entre 1975-1999, apenas 1% dos produtos aprovados tinham como foco DTNs (TROUILLER et al., 2002). Entre 2000-2012 esse valor

subiu para 4% (37 de 850) (PEDRIQUE et al., 2013). Contudo, esse aumento ainda é insuficiente, considerando que essas doenças representam 11% da carga global de doenças, e que apenas 1% dos estudos clínicos registrados em 2011 são direcionados para as DTNs (MURRAY et al., 2012; UTZINGER; KEISER, 2013).

Muito ainda precisa ser realizado para que essa ampliação de recursos seja convertida em fármacos disponíveis para o tratamento dessas enfermidades. Nos próximos anos, a tendência é que a descoberta e o desenvolvimento de fármacos para as DTNs beneficiem-se de abordagens colaborativas, concebidas para maximizar os recursos e conhecimentos disponíveis. A maior parte dos esforços atualmente está baseada em modelos de parcerias público-privadas (PPPs) como a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) (CHATELAIN; IOSET, 2011; GUPTA et al., 2014) e a *Medicines for Malaria Venture* (MMV) (JAKOBSEN; WANG; NWAKA, 2011; POLLASTRI, 2014). Vale ressaltar ainda que poucos estudos clínicos vigentes estão focados na avaliação de novas entidades químicas (NEQ) (6%), a maioria nos esforços estão concentrados em vacinas (32%) e no reposicionamento de fármacos (15%) (PEDRIQUE et al., 2013; UTZINGER; KEISER, 2013).

1.2 Leishmaniose

1.2.1 Agente etiológico

A família *Trypanosomatidae* é composta por protozoários que podem causar doenças graves em seres humanos como a doença do sono (*Trypanosoma brucei*), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e as leishmanioses (*Leishmania* spp.). A taxonomia está apresentada na Figura 1. Parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares, digenéticos, encontrados nas formas promastigota, nos hospedeiros invertebrados, e amastigota intracelular, sem flagelo livre, nos hospedeiros vertebrados. A reprodução ocorre por divisão binária (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são divididos em dois subgrupos, com base no seu desenvolvimento nos vetores. Espécies do subgênero *Leishmania* ficam restritas as partes anterioes e média do trato digestivo dos inseto (desenvolvimento suprapilórico), e são encontrados no Novo e Velho Mundo; espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se no intestino médio e posterior (desenvolvimento peripilórico), e apresentam as forma promastigotas (formas livres), e paramastigotas, aderidas à parede do intestino (íleo e/ou

piloro). O subgênero *Vianna* é encontrado nas Américas tropical e subtropical (MICHALICK, 2005).

A espécie de *Leishmania* determina fortemente como a doença vai evoluir. É essencial saber a identidade do parasito em cada foco, pois esse conhecimento tem implicações para a compreensão epidemiológica, do controle e do tratamento. A identificação de rotina pode ser necessária em algumas circunstâncias, como por exemplo na LTA, em que focos da doença podem conter múltiplas espécies circulantes (WHO, 2010b).

Amostras desconhecidas (isolados não identificados) devem ser comparados com cepas de referência internacionais, que podem ser fornecidas por laboratórios de referência nacionais ou internacionais. Atualmente, a identificação isoenzimaticamente, que continua a ser a técnica de referência padrão do ponto de vista taxonômico, requer a cultura dos parasitos. Várias técnicas moleculares também estão disponíveis, e esses métodos apresentam a vantagem de poderem ser empregados diretamente com as amostras isoladas dos pacientes, hospedeiros ou flebotomíneos. Entretanto, essas técnicas ainda não são totalmente padronizadas (WHO, 2010b).

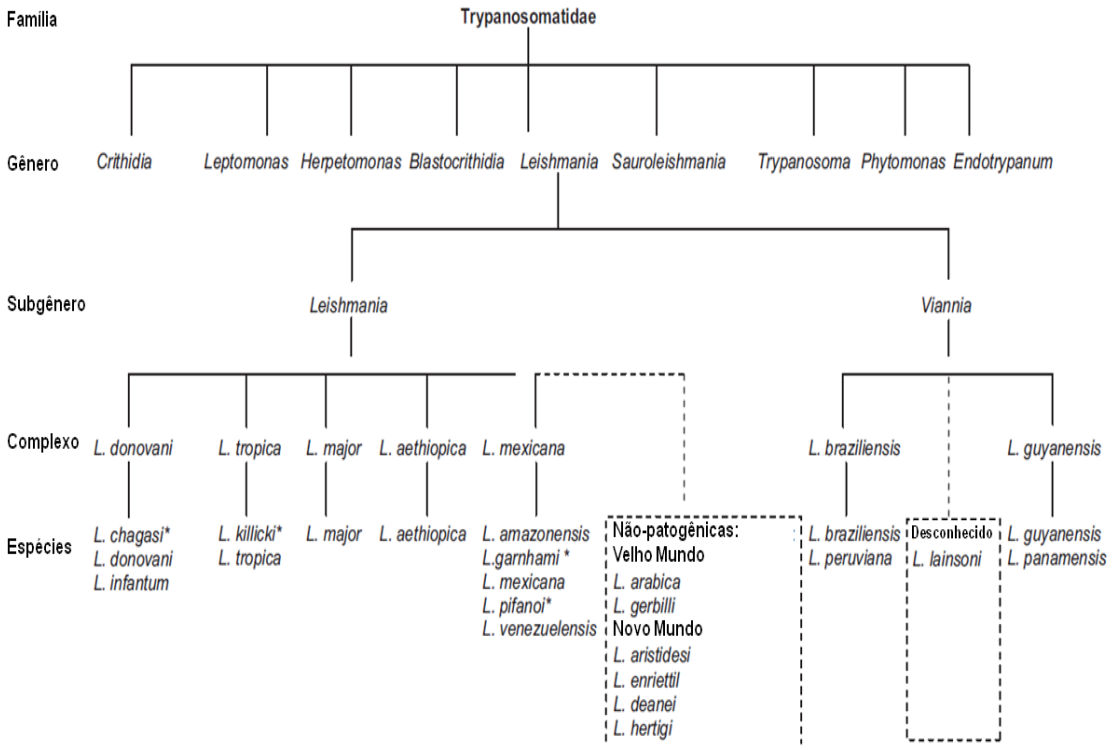


Figura 1 - Taxonomia das diversas espécies de *Leishmania* (modificado de WHO, 2010a).

1.2.2 Ciclo biológico

Existem duas formas morfológicas e bioquimicamente distintas: amastigota e promastigota. A forma no inseto vetor, promastigota, é móvel e dispõe de um flagelo fixado na organela similar a uma mitocôndria chamada cinetoplasto. Estas formas vivem na glândula salivar do inseto vetor, são alongadas, flageladas e móveis, enquanto as formas amastigotas são arredondadas sem flagelo aparente e que infectam células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado (MURRAY et al., 2005).

No hospedeiro invertebrado o ciclo (Figura 2) se inicia com a picada em um hospedeiro infectado, ao ingerir macrófagos infectados ou amastigotas livres no sangue. No intestino do inseto vetor as formas promastigotas passam por um processo denominado de metaciclogênese, processo pelo qual deixam de se reproduzir e tornam-se formas infectantes, sendo denominadas promastigotas metacíclicas. As formas reprodutivas, não infectantes, prendem-se a parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebotomínio. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo. A diferenciação de promastigotas procíclicas em promastigotas metacíclicas (metaciclogênese) é crucial para a infectividade (MICHALICK, 2005; MOJTAHEDI; CLOS; KAMALI-SARVESTANI, 2008).

No hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas se multiplicam em macrófagos localizados na pele ou em mucosas por divisão binária, destruindo a célula hospedeira. Essa proliferação ocorre na derme em intensidade que depende da espécie do parasito e do estado imunológico do hospedeiro, sendo maior em indivíduos imunocomprometidos (MICHALICK, 2005).

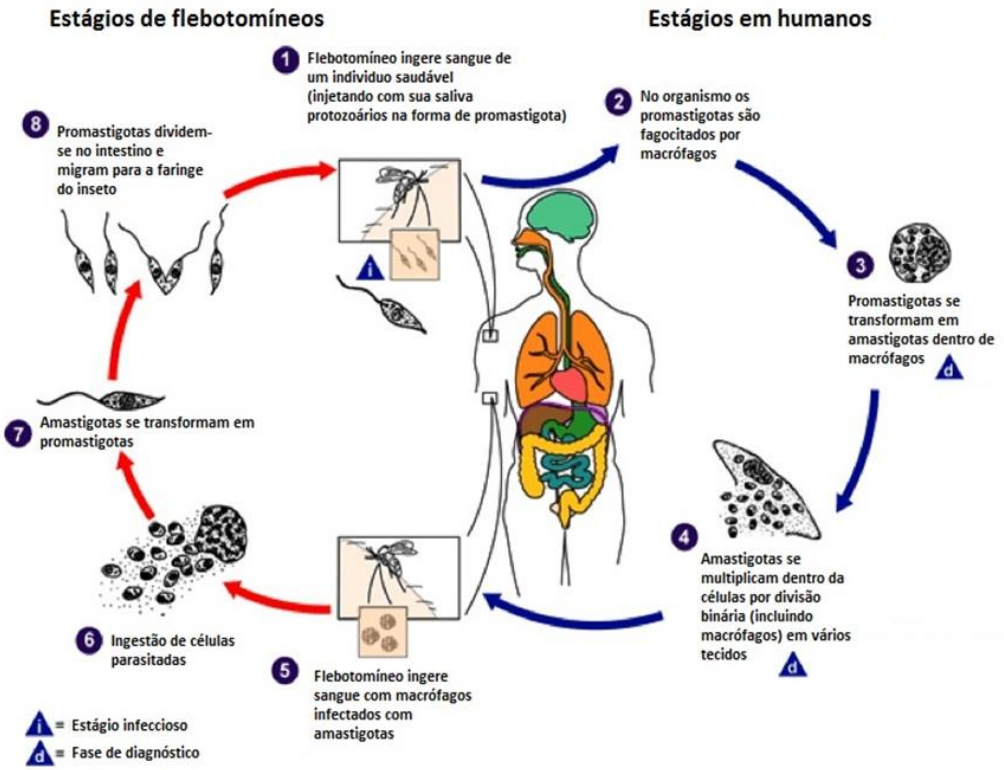


Figura 2 - Ciclo biológico de *Leishmania* sp. As setas vermelhas indicam os estágios de vida do parasito no hospedeiro invertebrado, e as setas azuis os estágios no hospedeiro vertebrado. (1) Promastigotas metacíclicas inoculadas pelo hospedeiro invertebrado. (2) Formas promastigotas fagocitadas por macrófagos. (3) Formas promastigotas transformadas em amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. (4) Lise do macrófagos e liberação de amastigotas. (5) e (6) Vetor ingere formas amastigotas ao realizar o repasto sanquíneo. (7) Formas amastigotas convertem-se em promastigotas no tubo digestório do vetor (8) Formas promastigotas se multiplicam por divisão binária e migram para a probóscide do inseto. (Adaptado de: CDC 2014, www.cdc.gov).

1.2.3 Formas clínicas

As leishmanioses formam um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, um parasito heteroxeno que requer dois hospedeiros diferentes para completar o seu ciclo biológico: um inseto vetor, fêmeas da ordem Díptera, família Psychodidade, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomya* ou *Phlebotomus* e como hospedeiro definitivo, o homem, cachorros ou qualquer mamífero. O desenvolvimento da leishmaniose é diretamente relacionado à espécie infectante do parasito, do meio, e da resposta imune do hospedeiro. A maioria dos humanos infectados é assintomática, mas alguns indivíduos desenvolvem alguma das diversas formas clínicas da doença (Figura 3) (MURRAY et al., 2005; NEVES, 2005; WHO, 2010b).

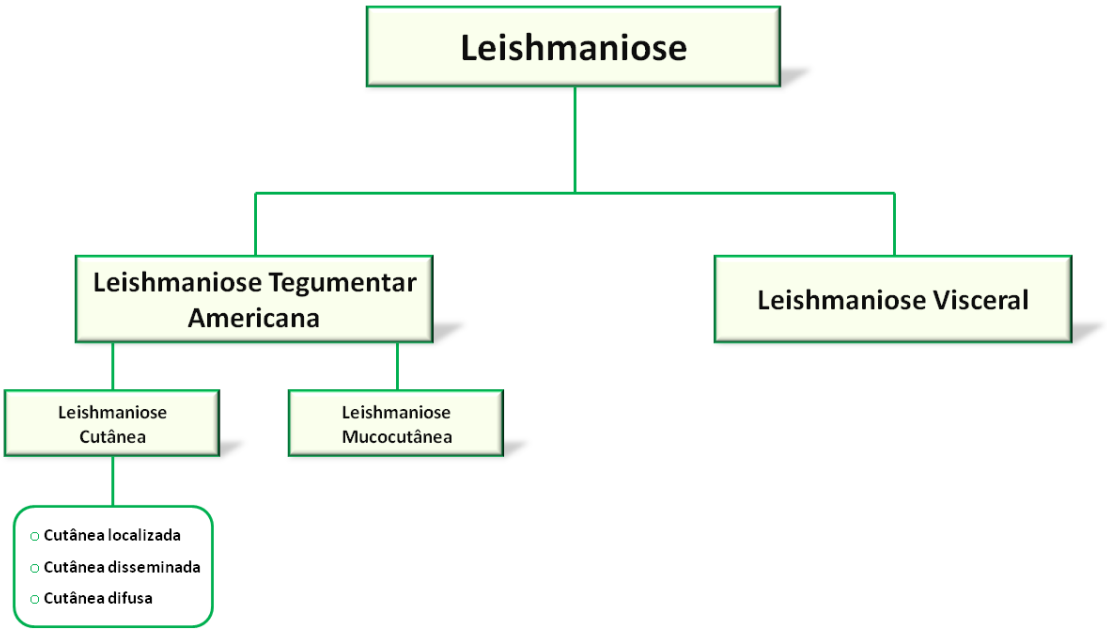


Figura 3 - As formas clínicas da Leishmaniose no Novo Mundo.

1.2.3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

Nas Américas, uma grande variedade de manifestações clínicas são causadas por espécies distintas. Embora algumas dessas manifestações sejam mais freqüentemente associada a uma determinada espécie ou subgênero, nenhuma é exclusiva de uma espécie. As formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) incluem: cutânea localizada, cutânea disseminada, cutânea difusa e a leishmaniose mucocutânea (GENARO; REIS, 2005; BRASIL, 2010).

A leishmaniose cutânea localizada é causada por várias espécies, dos dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas geralmente originam-se no local da inoculação, como uma mácula, seguido por uma pápula que se ulcera e expande para a típica lesão oval em forma de bordas elevadas, ou evolui como uma lesão nodular. As lesões podem se desenvolver semanas, meses ou mesmo anos após a infecção. As lesões primárias podem ser únicas ou múltiplas. Quando causadas por *L. mexicana*, as lesões podem ter resolução espontânea dentro de 3-4 meses, enquanto lesões causadas por espécies do subgêneros Viannia, como *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* podem levar até 6 meses (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; WHO, 2010b).

A leishmaniose cutânea difusa no Novo Mundo geralmente não causa lesões nas mucosas, e não há cura espontânea. A doença inicialmente responde ao tratamento, mas

comumente recidiva e deixa de responder. Essa forma tem sido associado apenas à *L. mexicana* e *L. amazonensis* (BRASIL, 2010).

A leishmaniose cutânea disseminada caracteriza-se pela presença de lesões nodulares extensas e numerosas ou lesões ulceradas, e tem sido descrita em associação com infecções por *L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Mais de 20 até centenas de lesões cutâneas podem ocorrer, com ou sem envolvimento das mucosas. Essa forma responde parcialmente ao tratamento com antimoniais e miltefosina (BRASIL, 2010; WHO, 2010b).

O termo "leishmaniose mucocutânea" (LMC) descreve uma forma da doença que ocorre apenas no Novo Mundo, causada principalmente pela *L. braziliensis* e *L. panamensis*, (ambas as espécies do subgênero *Viannia*). A maioria dos casos são relatados na Bolívia, Brasil e Peru. A característica marcante é a metástase para os tecidos das mucosas, principalmente da boca e do trato respiratório superior, por disseminação linfática ou hematogênica. Casos semelhantes causadas por outras espécies já foram relatados em pacientes imunossuprimidos (WHO, 2010b; GUERRA et al., 2011).

Estudos realizados no Brasil têm mostrado que a LMC pode surgir de vários meses a 20 ou mais anos após a lesão cutânea. Lesões nasais estão sempre presentes, com nódulos e infiltração da cartilagem do septo, que leva à obstrução da narina e, depois à perfuração do septo. Em um terço dos pacientes, outros locais estão envolvidos, em ordem de freqüência: faringe, palato, laringe, traquéia e lábio superior. LMC quase nunca cicatriza espontaneamente. Infecções bacterianas secundárias são freqüentes, e podem levar a complicações (MURRAY et al., 2005; WHO, 2010b; TIUMAN et al., 2011).

1.2.3.2 Leishmaniose Visceral Americana

O agente etiológico é a *L. infantum* (= *L. chagasi*), e também é conhecida como calazar. A maioria dos casos ocorre em crianças menores de 10 anos de idade, mas os adultos também são freqüentemente afetados em focos de introdução recente. Acomete os órgãos Internos e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia. Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é extremamente rara. No Brasil, infecções assintomáticas e formas leves da doença são mais freqüentes de que a doença plenamente estabelecida. Estudos de acompanhamento longitudinal tem mostrado que alguns indivíduos podem permanecer assintomáticos ou recuperar-se

espontaneamente da doença leve, enquanto outros desenvolvem a doença clínica (MICHALICK; GENARO, 2005; BRASIL, 2006; WHO, 2010b).

1.2.4 Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, com mais de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. A incidência estimada é de 2 milhões de novos casos por ano, sendo que 75% desses casos são de LT. LV causa mais de 50.000 mortes anualmente, sendo a segunda doença parasitária mais letal, atrás apenas da malária (WHO, 2010b). A co-infecção com o HIV intensifica esse quadro, gerando formas mais graves da doença, de difícil manejo (SINGH, 2014).

A leishmaniose está dispersa de um maneira abrangente ao redor do mundo, com casos de transmissão a humanos relatados nos cinco continentes, porém, a maior quantidade está concentrado em algumas regiões específicas, como pode ser observado na Figura 4. Índia, Nepal e Bangldesh concentram mais de 65% dos casos de LV no mundo, causada por *L. donovani*. O leste africano constitui-se no segundo foco de LV, com as maiores incidências no Sudão e na Etiópia, onde a infecção também é causada por *L. donovani* e tem caráter antroponótico (WHO, 2012b; READY, 2014).

As outras regiões de maior importância, causados por *L. infantum* são o Oriente Médio, a Bacia do Mediterrâneo, oeste asiático e o Novo Mundo, especialmente o Brasil. Nestas regiões a infecção e zoonótica e causada por *L. infantum.* Estima-se que 90% dos casos estejam concentrados na Índia, Brasil, Etiópia, Sudão, Nepal e Bangladesh (WHO, 2010b).

Os casos de LT estão mais dispersos quando comparados aos de LV. Infecção antroponótica por *L. tropica* ocorre desde a Índia até o norte da África, passando pelo oeste e centro da Ásia. A transmissão zoonótica por *L. major* ocorre na Ásia central e norte africano, e por *L. aethiopica* no leste africano. Nas Américas a transmissão também é zoonótica, causada por várias espécies, e ocorre desde a Argentina até o sul do EUA. Mais de 90% dos casos de LT ocorrem no Afeganistão, Argélia, Irã, Arábia Saudita, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (DESJEUX, 2004; WHO, 2010b).

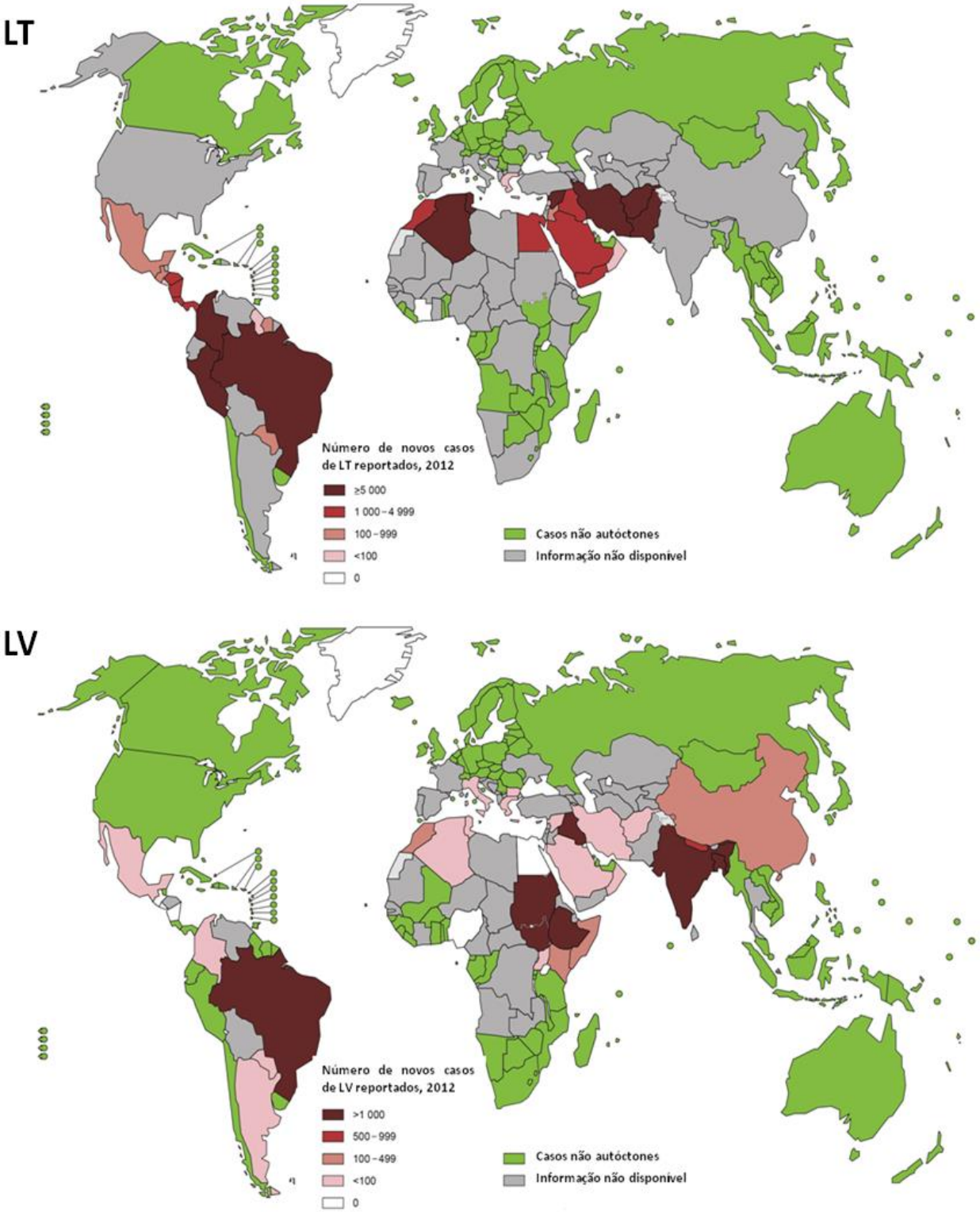


Figura 4 - Distribuição de novos casos de leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral no mundo, 2012 (Adaptado de WHO, 2014).

As condições que predispõe a infecção em humanos variam consideravelmente de acordo com o clima e o lugar. A leishmaniose pode ser uma zoonose, onde a introdução de seres humanos em ciclos silvestres resulta em maior risco de infecção e propagação da doença. Em outras regiões a transmissão é antroponótica. Mudanças no ambiente exercem

forte influência sobre a epidemiologia da leishmaniose, possibilitando alterções tanto no ciclo de vida dos vetores, quanto dos próprios parasitos (WHO, 2010b).

1.2.4.1 Novo Mundo

As leishmanioses nas Américas são um importante problema de saúde pública, afetando, especialmente, populações com dificuldade de acesso aos serviços de saúde. A epidemiologia da LT nas Américas é complexa, com variação intra e inter-específica nos ciclos de transmissão, hospedeiros, vetores, manifestações clínicas e resposta à terapia. Diversas espécies do parasito circulam em uma mesma área geográfica Tabela **1**. Todos os ciclos biológicos são zoonóticos, mas os hospedeiros reservatórios mudam de acordo com as espécies e localização geográfica, e em muitos casos não são totalmente conhecidos (PAHO, 2013).

Tabela 1 – Espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, forma clínica, vetores e hospedeiros reservatórios confirmados ou preditos

Espécie	Forma clínica	Vetor	Reservatório
L. guyanensis	LTA	*Lu. umbratilis*, *Lu.anduzei*, *Lu.whitmani*	*Choloepus* spp., *Tamandua* spp., *Didelphis* spp., *Proechimys* spp.
L. amazonensis	LTA LMC	*Lu. flaviscutellata*, *Lu. longipalpis*	*Proechimys* spp., *Oryzomys* spp., *Wiedomys* spp.
L. braziliensis	LTA	*Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu.wellcomei*, *Lu.complexa*, *Lu. neivai*, *Lu. edwardsi*, *Lu.migonei*	*Cão*, *Rattus rattus*, *Akodon arviculoides*, *Bolomys spp.*, *Nectomis spp.*, *Thrichomys spp.*
L. infantum	LV	*Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi*, *Lu. almerio*, *Lu.salesi*	Cão, Gato, *Lycalopex vetulus*, *Cedocyon thous*, *Didelphis albiventris*
L. lainsoni	LTA	*Lu. Ubiquitalis*	*Agouti paca*

Tabela 1 – Espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, forma clínica, vetores e hospedeiros reservatórios confirmados ou preditos

Espécie	Forma clínica	Vetor	Reservatório
L. shawi	LTA	*Lu. whitmani*	*Cebus apella, Chiropotes satanus, Nasua nasua, Bradypus tridactylus, Choloepus Didactylus*
L. naiffi	LTA	*Lu. squamiventris, Lu. paraensis, Lu.amazonensis, Lu.ayrozai*	*Dasypus ovemcinctus*
L. lindenbergi	LTA	Desconhecido	Desconhecido

Fonte: WHO, 2010.

A localização geográfica e os fatores de risco expadiram-se nas últimas década, devido aos desmatamento causado pelo homem e intensos processos migratórios, possibilitando o aparecimento de casos peridomésticos, domésticos e urbanos, em oposição ao que ocorria anteriormente, onde a doença era, essecialmente, ocupacional - relacionada a construção de estradas, seringueiros e extrativistas, por exemplo (WHO, 2010b).

Fatores de risco para a doença são: más condições de habitação, saneamento básico precário, morar em área endêmica, ter contato com vetor, morar próximo a bosques/florestas. A manutenção de cães e outros animais domésticos dentro de casa também é pensada como promotora da infecção humana, pois esses animais são reservatórios de *L.infantum* e podem atrair insetos vetores, especialmente *Lu. longipalpis*. Outro importante fator de risco é a presença de galinheiros perto de casa, uma vez que podem constitiur uma fonte de alimentação e descanso para *Lu. Longipalpis*. Além disso, as aves podem atrair outros animais carnívoros selvagens, considerados os reservatórios silvestres para a LV (BRASIL, 2006).

Três padrões epidemiológicos de distribuição são encontrados: o rural e periurbano, relacionado aos processos de migração e ocupação de áreas de encosta e de matas secundárias ou residuais; o silvestre, que é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, podendo acometer o homem quando há contato com o ambiente silvestre; e a ocupacional e lazer, relacionada ao desmatamento e exploração de regiões de floresta para a construção de

estradas, usinas hidrelétricas, extração de madeira, agropecuária, treinamentos militares e ecoturismo (BRASIL, 2006).

No Brasil, as leishmanioses também se expandiram para áreas urbanas. Entre 1980 e 2001 houve um aumento de dez vezes na incidência de casos de LT, e casos da doença foram registrados em todas as regiões do Brasil. A evolução do número de casos de LTA e LV pode ser acompanhada na Figura 5.

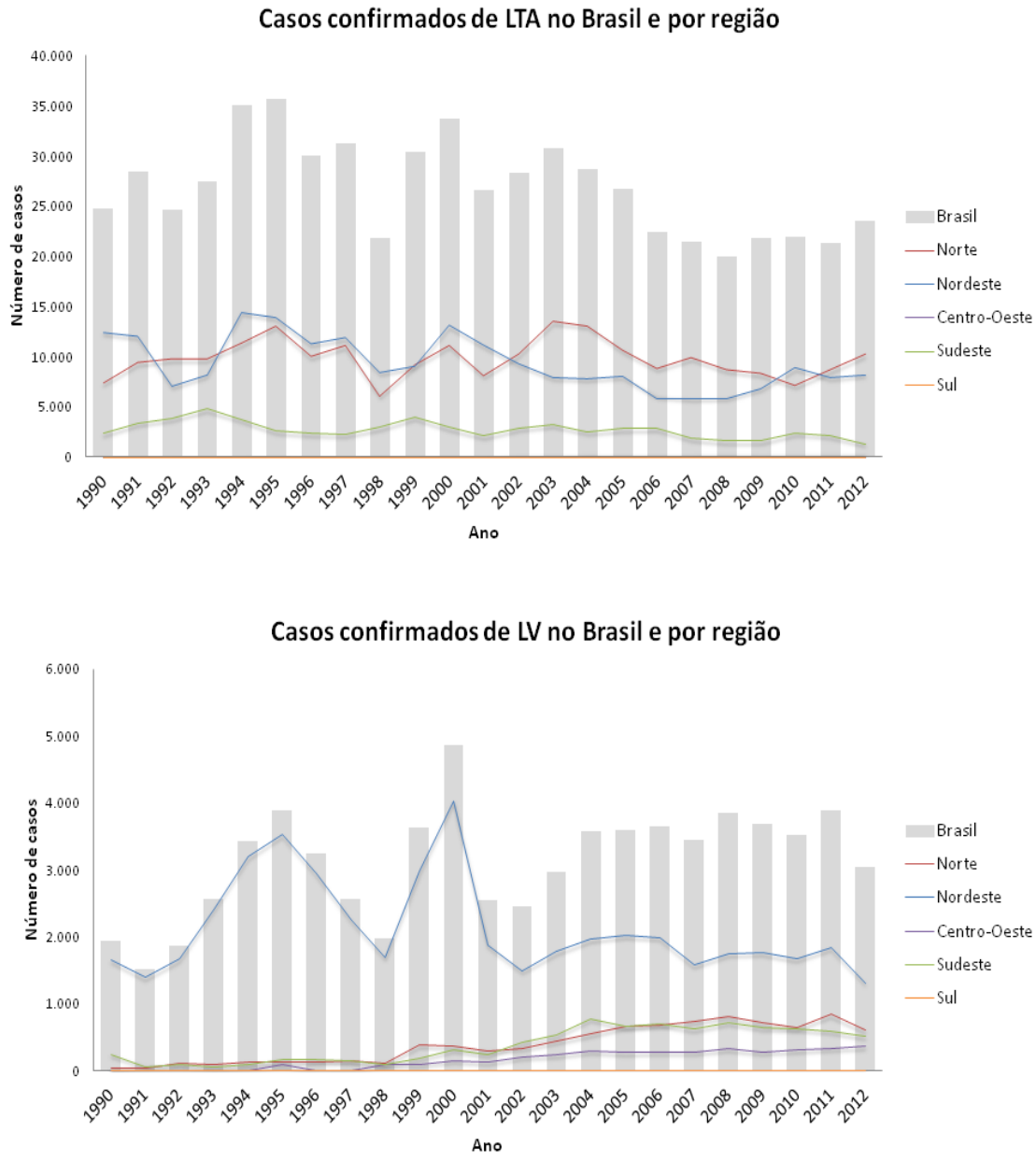


Figura 5 - Número de casos confirmados de tegumentar americana e leishmaniose visceral no Brasil e por regiões, 1990-2012.
Fonte: SVS/MS

A LTA ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, a maioria dos casos se concentram entre os maiores de 10 anos (90%), e o sexo masculino (74%). A LV é mais frequente em menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos e o sexo masculino também é o mais afetado (60%) (BRASIL, 2010, 2011). A evolução da mortalidade da LV no país pode ser observada no gráfico apresentado Figura 6.

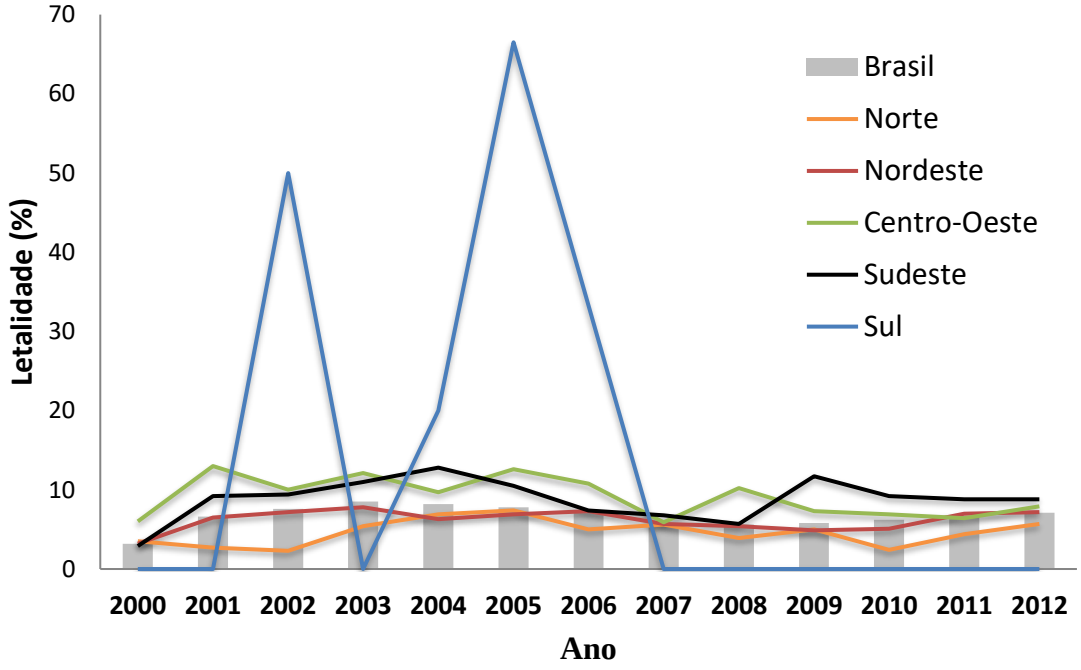


Figura 6 - Letalidade da leishmaniose visceral no Brasil e por regiões, 2000-2012.
Fonte: SVS/MS

Já foram identificadas no Brasil sete espécies diferentes de *Leishmania* causadoras da LTA, sendo seis do subgenero *Viannia* e uma do subgenero *Leishmania*. As três espécies de maior importância são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis.* Mais recentemente, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas no Norte e Nordeste. Como pode ser obervado na Figura 7, *L. (V.) braziliensis* já foi identificada em todos os estados brasileiros. Com relação a LV, a *Leishmania (L.***)** *infantum* é a espécie comumente isolada (BRASIL, 2010, 2011).

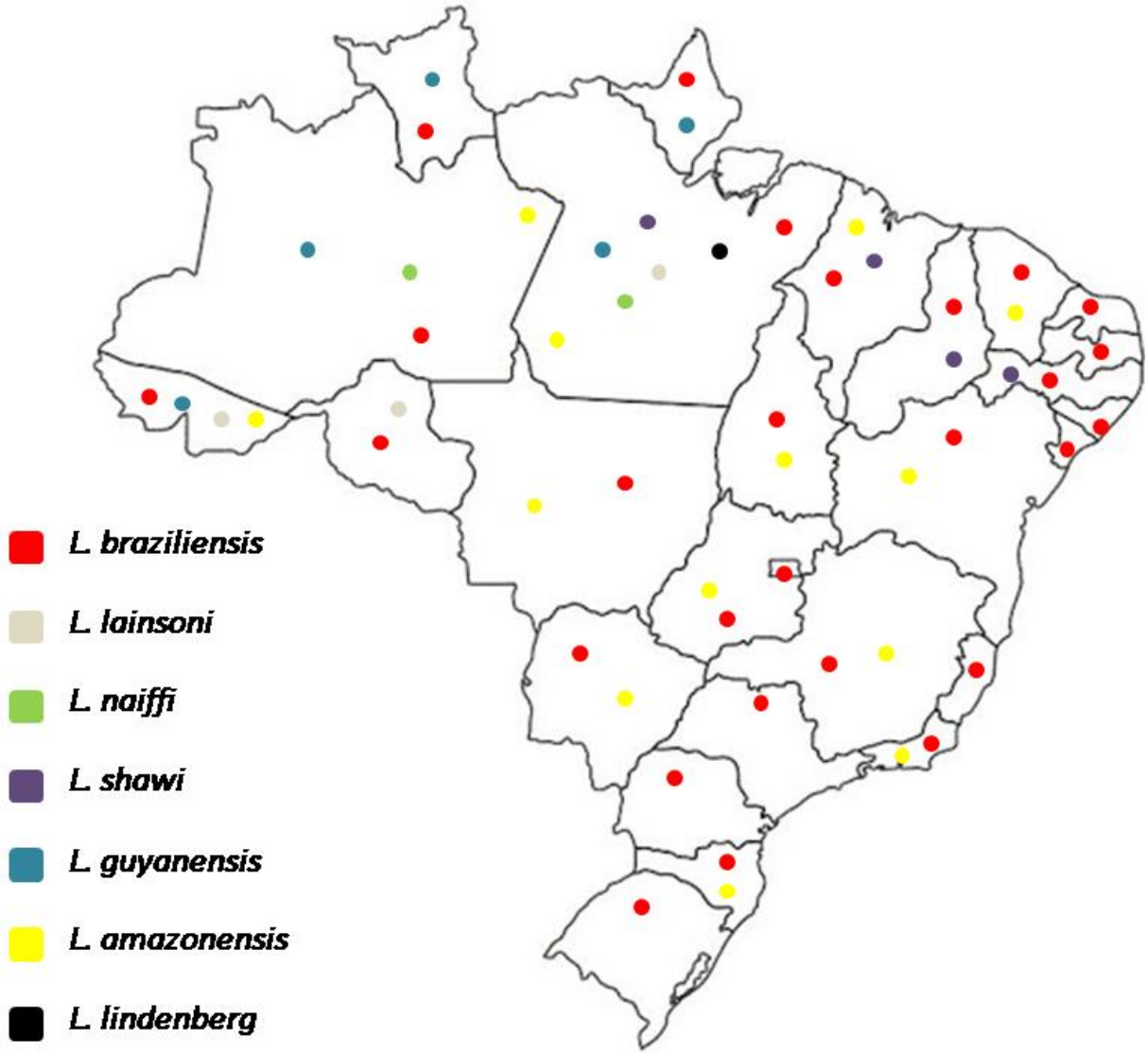


Figura 7 - Distribuição por estados de espécies causadoras de LTA no Brasil, 2005 (Adaptado de BRASIL, 2010).

As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata, Lu. whitmani, Lu. umbratilis, Lu. intermedia, Lu. wellcome* e, *L. migonei*. Duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*, sendo a primeira espécie considerada a principal espécie transmissora (PAHO, 2013).

1.2.5 Tratamento

O tratamento escolhido deve seguir diretrizes nacionais ou regionais, sempre que possível, e deve ser iniciado apenas após a confirmação da doença. A presença de infecções concomitantes deve ser apurada, visto que essas podem influenciar no tratamento. Em alguns

casos, tratamentos de suporte, como a reidratação ou suplementação nutricional, podem ser requeridos antes do início da quimioterapia (BRASIL, 2010; WHO, 2010b).

A OMS define que as políticas nacionais e regionais para o tratamento devem estar baseadas em quatro fatores: a disponibilidade dos medicamentos, a estrutura dos serviços de saúde, considerações relacionadas à saúde pública (como a emergência de resistência), e a relação risco/benefício de cada fármaco. Estratégias de terapia combinada devem ser priorizadas, desde que haja evidências experimentais (WHO, 2010b).

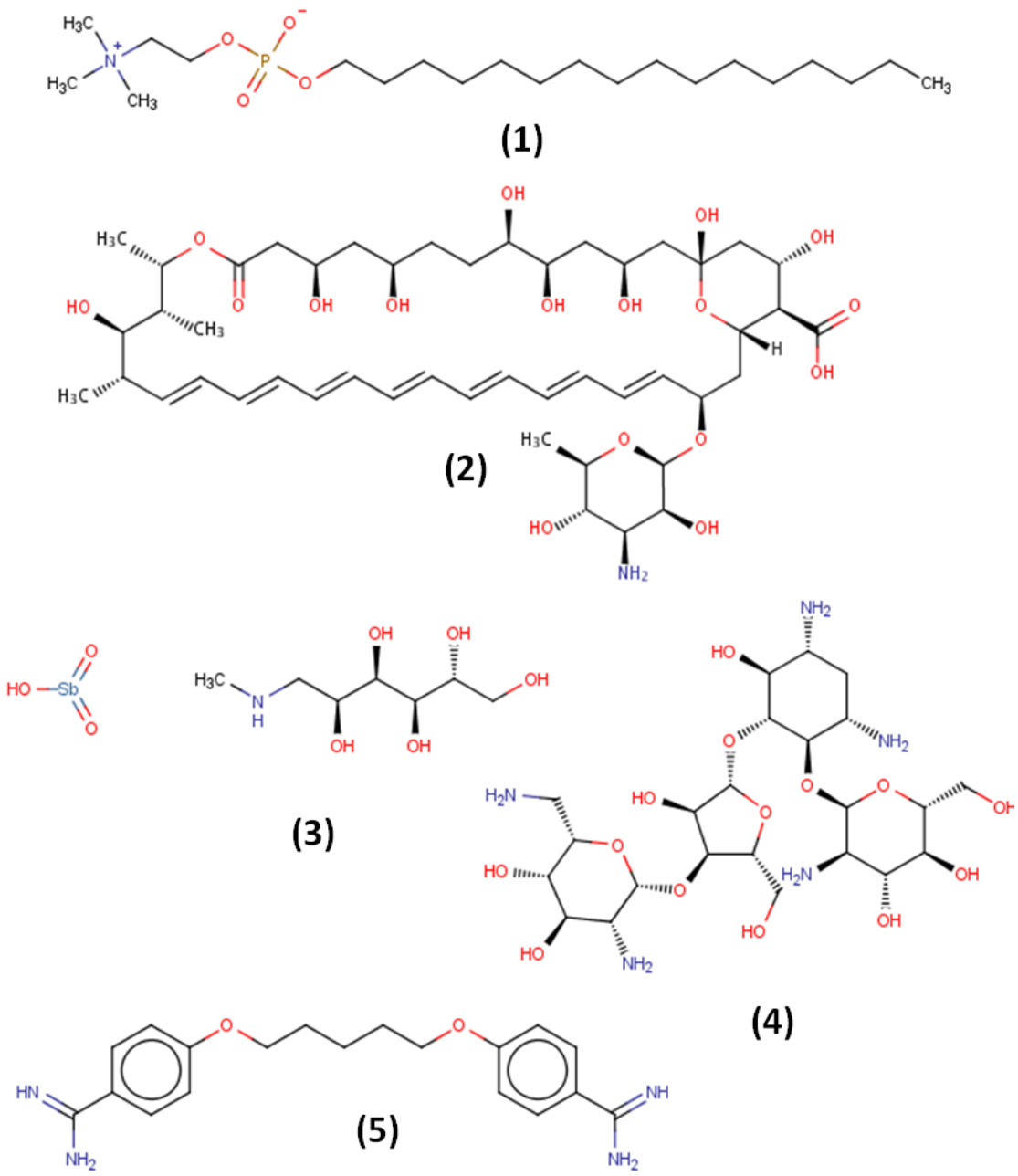


Figura 8 - Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses: (1) miltefosina, (2) anfotericina B, (3) antimoniato de N-metilglucamina, (4) paromomicina, e (5) pentamidina.

No Brasil, os fármacos aprovados e recomendados pelo Ministério da Saúde estão divididos entre os de primeira escolha, caso dos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), e os de segunda escolha, empregados quando a resposta aos antimoniais não é considerada satisfatória. Os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina (BRASIL, 2010). Outros fármacos, como a paromomicina, e a miltefosina tiveram sua eficácia comprovada em outras regiões do mundo (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; NAGLE et al., 2014).

1.2.5.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são os fármacos de primeira escolha para o tratamento (BRASIL, 2010). Os antimoniais são empregados na terapêutica desde o início do século passado, quando, em 1912, o pesquisador brasileiro Gaspar Vianna sugeriu o emprego do tártaro emético para o tratamento da LT (VIANNA, 1912). Em 1915, houve o primeiro relato do emprego bem sucedido desses compostos para o tratamento da LV (NAGLE et al., 2014).

No tártaro emético o antimônio apresenta-se na forma trivalente (Sb^{+3}), e essa forma apresenta uma toxicidade bastante elevada. O primeiro composto leishmanicida contendo o antimônio na forma Sb^{+5} foi sintetizado em 1925, representando um grande avanço no tratamento, devido a menor toxicidade quando comparado a Sb^{+3}. Outros compostos contendo Sb^{+5} foram obtidos em 1937 e 1945 (KIKUTH, W.; SCHMIDT, 1937; GOODWIN, 1995; NAGLE et al., 2014). Dois tipos de antimoniais pentavalentes estão disponíveis atualmente, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio. Apenas o primeiro é distribuído no Brasil (BRASIL, 2010).

Mesmo estando disponíveis há tantos anos, o mecanismo de ação desses compostos ainda não é completamente elucidado. São fármacos considerados leishmanicidas, e acredita-se que a forma pentavalente seja convertida para a forma trivalente (Sb^{+3}), e que essa seja a principal responsável pela atividade, podendo interagir com proteínas como a tripanotiona redutase e proteínas contendo dedos de zinco. Outras hipóteses sugerem que a forma Sb^{+5} possui atividade intrínseca, interferindo no metabolismo energético do parasito, tanto na glicólise, quanto na oxidação dos ácidos graxos (RATH et al., 2003; HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Os principais efeitos adversos do Sb^{+5} advêm da influência desses compostos no sistema cardiovascular, podendo causar arritmias em efeitos dose-dependente. A utilização desses medicamentos requer acompanhamento médico, a fim de avaliar esses efeitos. Caso alterações sejam observadas, o paciente deve ser avaliado, se necessário, deve-se reiniciar o tratamento com uma droga de segunda escolha. Outros efeitos adversos, como: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, insônia, edema, e insuficiência renal aguda (IRA) podem ser observados (BRASIL, 2010).

1.2.5.2 Anfotericina B

A anfotericina B e um antibiótico poliênico isolado de *Streptomyces nodosus* em 1955 (DONOVICK et al., 1956). Primariamente, o interesse pelo composto baseava-se em sua atividade antifúngica. No início da década de 1960 a atividade leishmanicida desse composto foi identificada e o primeiro caso de tratamento bem sucedido foi reportado, no Brasil (FURTADO; CISALPINO; SANTOS, 1960; PRATA, 1963). É considerada como primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha em outros casos. A atividade do composto é resultado do aumento de permeabilidade da membrana do parasito, decorrente da associação do fármaco ao ergosterol, principal esterol de membrana de *Leishmania* (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

O composto apresenta-se em duas formas: em complexo com o deoxicolato, ou envolt por lipídeos. A formulação com deoxicolato apresenta vários efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, miocardite e hipocalemia (NAGLE et al., 2014). Formulações lipídicas, em que a anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas, foram desenvolvidas e reduziram sua toxicidade, entretanto seu emprego ainda é limitado devido o alto custo dessa formulação (MESSORI et al., 2013).

A administração é contraindicada em pacientes com comprometimento cardíaco, hepático e, especialmente, renal. Sua utilização demanda monitoramento semanal das funções hepáticas (transaminases e fosfatase alcalina) e renal (ureia e creatina), além da avaliação dos níveis de potássio sérico. Por esse motivo o tratamento deve, preferencialmente, ser administrado em ambiente hospitalar (WHO, 2010b).

1.2.5.3 Pentamidina

A pentamidina é uma diamidina aromática utilizada como segunda escolha no tratamento da leishmaniose em áreas endêmicas da Ásia, África e América. Apresenta-se sob a forma de dois sais (isotionato e mesilato de pentamidina). No Brasil, apenas o isotionato de pentamidina é comercializado (BRASIL, 2010). O fármaco é utilizado desde a década de 1940 para o tratamento da doença do sono, e os primeiros relatos do seu uso no tratamento da leishmaniose ocorreram em 1949 e 1950. O mecanismo molecular da ação leishmanicida é desconhecido (SANDS; KRON; BROWN, 1985; NAGLE et al., 2014).

O fármaco interfere no metabolismo da glicose, podendo desencadear hipoglicemia seguida de hiperglicemia, embora o mecanismo dessa resposta ainda não esteja esclarecido. A pentamidina pode induzir a lise de células beta do pâncreas, podendo provocar diabetes insulino-dependente, o que limita o emprego desse fármaco (BRASIL, 2010; WHO, 2010b).

Outras reações adversas frequentes consistem em: dor, náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaléia, hipotensão, lipotimias. O diabetes mellitus pode se manifestar a partir da administração da dose total de 1g, sendo cumulativo e dose-dependente. Seu emprego é contraindicado em gestantes, pacientes diabéticos, com insuficiência renal e hepática, com alterações cardíacas e em crianças com peso inferior a 8kg (SANDS; KRON; BROWN, 1985).

1.2.5.4 Paromomicina

Paromomicina é um antibiótico aminoglicósido de amplo espectro. Foi isolado em 1950 de *Streptomyces krestomuceticus.* Inibe a síntese de proteínas ao se ligar ao rRNA (VICENS; WESTHOF, 2001). Sua eficácia no tratamento de leishmaniose foi primeiro reportada em 1966, para a LT, e 1990, para a LV, no Quênia (CHUNGE et al., 1990).

Normalmente administrado por via intramuscular, pode causar dor moderada no local da injecção, sendo o efeito adverso mais comum (55%) . Ototoxicidade reversível ocorre em 2% dos pacientes. Toxicidade renal é rara. Alguns pacientes podem desenvolver hepatotoxicidade, indicado por concentrações das enzimas hepáticas elevadas (SUNDAR et al., 2007). A formulação tópica está disponível para leishmaniose cutânea (WHO, 2010b).

1.2.5.5 Miltefosina

O composto foi originalmente desenvolvido como um fármaco antineoplásico. Na década de 1990, vários laboratórios descobriram que a molécula possuia atividade leishmanicida; em 2002, foi aprovado na Índia como o primeiro tratamento oral de LV (CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996; SUNDAR et al., 2012). A miltefosina é também considerada o primeiro regime de tratamento oral eficaz para LT, com toxicidade mais baixa se comparada aos antimoniais (MACHADO et al., 2010).

A miltefosina comumente induz efeitos adverso gastrointestinais, como anorexia, náuseas, vómitos e diarréia. A maioria dos episódios são breves e reduzem ao decorrer do tratamento. Ocasionalmente, esses efeitos podem se agravar e exigir a interrupção do tratamento. Outros efeitos como: alergia na pele, alterações hepáticas e renais podem ser observados. O fármaco também apresenta potencial teratogênico, e mulheres em idade reprodutiva devem ingerir anticoncepcionais até três meses após o tratamento, devido à elevada meia-vida do fármaco (WHO, 2010b).

1.2.5.6 Cetoconazol

O cetoconazol é um antifúngico da classe dos azóis, fármacos orais que inibem a biossíntese fúngica do ergosterol na etapa da enzima lanosterol-desmetilase resultando na acumulação de esteróis 14 α-metil esteróis. Parasitos do gênero *Leishmania* compartilham os fungos essa via biossintética de esteróis, e por esse motivo, essem compostos têm sido explorados por seu potencial terapêutico contra infecções por *Leishmania*. Para LT, a eficácia dos compostos varia de acordo com a espécie (SAENZ; PAZ; BERMAN, 1990; RANGEL et al., 1996). Cetoconazol foi avaliado durante um mês, tanto em adultos e crianças, em LT causada por *L. braziliensis* e resultou numa cura de 76% com poucos efeitos adversos (SAENZ; PAZ; BERMAN, 1990). Testes semelhantes foram realizados em LT causada por *L. mexicana*, resultando em 89% de cura (NAVIN et al., 1992). Entre os vários azóis já testados (fluconazol, itraconazol e cetoconazol), o cetoconazol foi o único consistentemente eficaz e é agora utilizada para tratamento de LT causadas *L. mexicana* (NAGLE et al., 2014).

1.3 Estratégias para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e complexo que compreende várias etapas e custos elevados. Esse processo envolve a integração de várias áreas estratégicas relacionadas à inovação, conhecimento, tecnologia, gerenciamento e altos investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D). Os custos envolvidos em todas as etapas de desenvolvimento de novos fármacos, na última década, variaram de US$ 200 milhões a US$ 880 milhões, em alguns casos ultrapassando US$ 1 bilhão. Esse processo requer um tempo médio de 13,5 anos de investimento em P&D (BLEICHER et al., 2003; LOMBARDINO; LOWE, 2004; SCHENONE et al., 2013).

A etapa de descoberta se inicia com a identificação de um potencial alvo (por exemplo, uma enzima, receptor ou transportador) relacionado a determinado quadro clínico ou doença e sua validação. A validação de um alvo pode ser conduzida, por exemplo, por meio de técnicas que bloqueiam a expressão de genes que o codificam (*knock out*), observando a influência da não expressão desses genes. Em doenças infecciosas e parasitárias a validação do alvo consiste em se avaliar o impacto da não expressão de determinado gene na sobrevivência do agente etiológico (GASHAW et al., 2011a; ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012).

Uma vez definido o alvo, estudos são realizados para se buscar novos compostos ligantes (*hits*) que sejam capazes de modular *in vitro* a atividade do alvo selecionado. Os *hits*, que podem ser de origem natural ou sintética, podem ser identificados a partir de triagens experimentais (biológicas, bioquímicas), virtuais (computacionais) ou por meio de planejamento racional. Um exemplo de triagem experimental é a triagem biológica automatizada em alta escala (HTS, do inglês *High Throughput Screening*). Nos estudos computacionais destacam-se as estratégias de organização de bases de dados, aplicação de filtros para seleção dos compostos mais promissores e triagem virtual (VS, do inglês *Virtual Screening*). Os *hits* devem ser otimizados em relação às propriedades farmacodinâmicas (potência, afinidade, seletividade) e farmacocinéticas (absorção, metabolismo, biodisponibilidade). Os compostos otimizados são então selecionados como compostos líderes (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008; DUFFY et al., 2012a).

Durante a otimização de compostos líderes, estudos da relação entre a estrutura e atividade (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationships*) e da relação quantitativa entre a estrutura e atividade (QSAR, do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationships*) são realizados com o intuito de se obter informações que possam guiar o desenvolvimento de

análogos com propriedades otimizadas. Além disso, a potência e as propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) são aprimoradas através da modulação de certas propriedades físico-químicas importantes (lipofilicidade, solubilidade, permeabilidade). Finalmente são obtidas novas entidades químicas (NQE), ou seja, novos candidatos a fármacos que serão submetidos a estudos pré-clinicos e clínicos (NWAKA; HUDSON, 2006; CRAMER, 2012; ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012).

A etapa de desenvolvimento compreende os estudos pré-clínicos e clínicos. Nos estudos pré-clínicos, são realizados estudos *in vivo* em animais com objetivo de se avaliar a segurança dos novos candidatos a fármacos. Além disso, estudos de formulação são conduzidos. A fase clínica é classicamente dividida em quatro fases (I-IV). Na fase I são realizados estudos de toxicidade em um grupo pequeno (20 a 100) de voluntários saudáveis. Na fase II os estudos são realizados em pacientes com a doença ou desordem (100 a 300 indivíduos) para se avaliar a dosagem, eficácia e segurança da composição. Durante a fase III são realizadas avaliações farmacocinéticas em um grupo maior de indivíduos (300- 3.000 ou mais). Nesta fase o candidato a fármaco é comparado com o tratamento preconizado e determina-se sua efetividade Os candidatos a fármacos aprovados ao final da fase III são submetidos à análise junto aos órgãos reguladores visando a autorização para comercialização. Uma vez aprovado e inserido no mercado, têm-se início a fase IV, na qual o medicamento é comercializado e monitorado quanto a eventuais efeitos indesejados (WILLMANN et al., 2008).

1.3.1 Desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador

Dentre as diversas estratégias da Química Medicinal que podem ser utilizadas nesse processo, destaca-se o planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *Computer-Aided/Assisted Drug Design*). O uso de métodos computacionais, atualmente, permeia todos os aspectos da descoberta de fármacos e apresenta a vantagem de auxiliar na identificação de candidatos a fármacos de forma mais rápida e com custos reduzidos. Tal expansão se deve aos grandes avanços obtidos, nas últimas décadas, nas áreas de *software* e *hardware* (COHEN, 1996; OOMS, 2000; MANLY; LOUISE-MAY; HAMMER, 2001; JORGENSEN, 2004; BAJORATH, 2012).

Outros campos que alcançaram notáveis avanços nas últimas décadas foram os da genômica e proteômica, fundamentado na evolução das técnicas de cristalografia de raios-X e

ressonância magnética nuclear (RMN), podem ser percebidos ao se avaliar o banco de dados de proteínas PDB (do inglês, *Protein Data Bank*): mais de 100 mil estruturas tridimensionais (3D) (*i.e.* enzima, receptor, DNA) estão disponíveis atualmente, fornecendo importante substrato para o desenvolvimento racional de fármacos (WEIGELT et al., 2008; TALELE; KHEDKAR; RIGBY, 2010; DUFFY et al., 2012b).

Essa quantidade de estruturas disponível, todavia, ainda está muito aquém da revolução sinalizada e esperada a partir da elucidação dos genomas (ZHANG; KAST, 2010; DREWES, 2012; MIAO; ZHANG; KAST, 2012). Apenas o genoma de *Leishmania major*, inteiramente descrito e disponibilizado em 2005 (IVENS et al., 2005) indica a existência de 8272 genes codificadores de proteína, em comparação com as 138 estruturas disponibilizadas no PDB, sendo que muitas dessas estruturas são diferentes entradas da mesma proteína. Estratégias de bioinformática tentam explorar esse espaço, ao utilizar as sequências dos genes, prevendo suas funções com base em proteínas homólogas (CROWTHER et al., 2010; BISPO et al., 2013). Dessa maneira, torna-se possível a análise dos possíveis papéis biológicos de novas vias metabólicas do parasito, que tem potencial de se tornar novos alvo terapêuticos (BREDEL; JACOBY, 2004; KUBINYI, 2006; CAFFREY et al., 2009).

Diversas outras abordagens podem ser utilizadas para o planejamento racional de novos candidatos a fármacos, dependendo do nível de conhecimento que se tem do alvo molecular terapêutico escolhido, caso existente. Quando a estrutura do alvo macromolecular ou do complexo ligante-receptor está disponível, pode ser usada a estratégia de planejamento de fármacos baseada na estrutura (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*). Entretanto, quando a estrutura do alvo não é conhecida, métodos de planejamento baseados no ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*) são utilizados. Em muitos casos, o uso combinado das duas estratégias SBDD e LBDD, pode ser útil, gerando informações adicionais fruto do sinergismo entre as duas abordagens (KUBINYI, 1993; COHEN, 1996; OOMS, 2000; TALELE; KHEDKAR; RIGBY, 2010).

Uma das estratégias LBDD mais utilizadas é o QSAR (do ingles, *Quantitative Structure-Activity Relashionship*). Desde que foi introduzido na década de 1960 (HANSCH; FUJITA, 1964), estudos de QSAR têm sido aplicados com sucesso para estimar uma variedade de proriedades diferentes. Nos estudos de QSAR, os modelos são construídos a partir do "treinamento" de um conjunto de moléculas para o qual os dados experimentais sobre a propriedade em estudo são conhecidos, em busca de correlações entre a estrutura química dessas moléculas e a atividade biológica. Ao encontrar essas associações, é possível

fazer previsões para novas moléculas (KUBINYI, 1993; BUCHWALD; BODOR, 2002; AGUIAR-PULIDO et al., 2013).

A principal limitação para a geração de modelos com boa qualidade preditiva utilizando QSAR é a qualidade dos dados utilizados. Independentemente dos algoritmos e descritores utilizados, se houver ruído (erro) nos dados experimentais, a construção de um modelo confiável será particularmente desafiadora (TROPSHA, 2010). Outro ponto em relação a preditividade concerne a aplicabilidade do modelo: se o objetivo do estudo é o de gerar modelos capazes de fazer previsões mais gerais, a base de dados deve ser suficientemente grande, contendo um grande número de estruturas químicas distintas. Se as estruturas nucleares disponíveis no banco de dados são semelhantes, o modelo será adequado para prever apenas moléculas semelhantes às utilizadas para treinar o modelo (GRAMATICA; PILUTTI; PAPA, 2004; DUDEK; ARODZ; GÁLVEZ, 2006; DE BENEDETTI; FANELLI, 2010).

Diversos tipos de abordagens de QSAR têm sido desenvolvidas ao longo dos anos, utilizando uma ampla variedade de métodos de regressão e classificação para a geração de modelos, e diferentes tipos de descritores, tais como: propriedades físico-químicas (1D), topológicos (2D) e a estrutura 3D (3D) (TODESCHINI; CONSONNI, 2000; AGUIAR-PULIDO et al., 2013). Levando em conta algumas das limitações impostas por métodos clássicos, métodos modernos - como o 4D, 5D e 6D, foram desenvolvidos, tentando contornar essas restrições. Com estes métodos, é possível incluir a flexibilidade dos ligantes, modelos de encaixe-induzido e solvatação (HOPFINGER et al., 1997; VEDANI et al., 2000; VEDANI; DOBLER, 2002; VEDANI; DOBLER; LILL, 2005).

Uma vez que a qualidade dos dados é garantida, e o domínio de aplicabilidade (DA) é calculado, será necessário fazer a seleção dos descritores moleculares, algoritmos e programas adequados. Como não há regra universal para executar esta tarefa, múltiplas abordagens devem ser investigados (MANLY; LOUISE-MAY; HAMMER, 2001). Usando os parâmetros apropriados, abordagens QSAR são seguramente aplicáveis na identificação de novos compostos biologicamente ativos (VERT; JACOB, 2008; TROPSHA, 2010). Há uma extensa lista de algoritmos disponíveis atualmente, incluindo métodos de aprendizado de máquina, tais como Redes Neurais (NN, *neural networks*), mapas auto-organizáveis (SOM, *self-organizing map*) e máquinas de vetor de suporte (SVM, *suppot vector machine* (BUCHWALD; BODOR, 2002; VERT; JACOB, 2008; MELVILLE; BURKE; HIRST, 2009).

A triagem *in silico* ou virtual (VS, *Virtual Screening*) consiste, basicamente, na aplicação de filtros moleculares, de forma a reduzir o tamanho das bibliotecas de compostos a serem realmente sintetizadas e avaliadas biologicamente (OPREA; MATTER, 2004). A utilização de métodos baseados na estrutura SBDD e LBDD tem mudado o paradigma das bibliotecas muito grandes e randômicas para bibliotecas combinatórias menores, porém planejadas com foco no alvo molecular. O planejamento de bibliotecas virtuais e a triagem *in silico* podem, portanto, diminuir significativamente os custos, o tempo e trabalho demandados para gerar novos protótipos candidatos a fármacos (KLEBE, 2006; VERT; JACOB, 2008; FRECER; MEGNASSAN; MIERTUS, 2009; RUNGROTMONGKOL et al., 2010)

1.3.2 Estratégias de busca por homologia

Uma das abordagens que tem contribuído para o reposicionamento de fármacos é a exploração de alvos conhecidos (sejam eles de origem humana ou de algum agente infeccioso) para o desenvolvimento de fármacos para outros parasitos com alvos homólogos. A disponibilidade de informações com relação a química medicinal, biologia estrutural e bioquímica desses alvos podem agilizar processo de descoberta, ao fornecer informações sobre o potencial de interação com moléculas pequenas dessas proteínas, além de novos esqueletos moleculares, que podem servir como ponto de partida para a descoberta de compostos mais potentes e seletivos (POLLASTRI; CAMPBELL, 2011; GASHAW et al., 2011b; NJOGU; CHIBALE, 2013). Essas metodologias têm maior valor quando utilizadas de maneira complementar com métodos experimentais, guiando a escolha de moléculas com maior probabilidade de sucesso para a triagem biológica (AUBÉ, 2012; LIU et al., 2013).

Métodos computacionais podem exercer um papel fundamental nessa priorização. As abordagens *in silico* mais utilizadas nos programas de P&D requerem e existência de muitas informações, como por exemplo, a existência de estruturas 3D de proteínas, para aplicação de métodos como o ancoramento (ou *docking*) molecular. Esse pré-requisito é um fator limitante, especialmente com relação às DTNs, pois poucas informações nesse nível de conhecimento estão disponíveis quando se refere a essas enfermidades. (BURROWS et al., 2014; PONDER et al., 2014; JIN; WONG, 2014).

Uma alternativa para contornar essa limitação é a exploração das informações sobre o genoma desses organismos. Os projetos de genômica estão em um estágio muito mais avançado, se comparado à proteômica e biologia estrutural, e muito mais informação está disponível nesse nível, mesmo para as DTNs (DUJARDIN, 2009; BAHIA et al., 2009;

DUNCAN et al., 2011). Essas estratégias baseiam-se, como descrito acima, na homologia de proteínas, entre um potencial alvo de um parasito, e alvos validados para outras doenças e já forneceram exemplos de aplicação bem sucedida, como, por exemplo, a descoberta da atividade antimalárica do composto fosmidomicina (Figura 9) (NJOROGE et al., 2014).

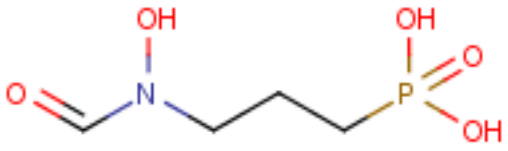


Figura 9 - Fosmidomicina.

O efeito antibacteriano da fosmidomicina e de seu análogo FR-900089 é proveniente da inibição da DOXP redu-toisomerase, enzima chave em uma das vias de bissíntese de isoprenóides em bactérias. Com o sequenciamento do genoma, observou-se que a via do DOXP é conservada em bactérias e em parasitos do gênero *Plasmodium*. Fosmidomicina e FR-900089 apresentaram atividade *in vitro* em concentrações submicromolares em três cepas de *Plasmodium*. A partir daí, o composto foi avaliado em ensaios clínicos, onde se comprovou cura clínica e parasitológica em alguns pacientes (JOMAA et al., 1999; LELL et al., 2003; WIESNER; BORRMANN; JOMAA, 2003; WIESNER; JOMAA, 2007; BROOKER et al., 2007).

Neste contexto, os bancos de dados disponíveis publicamente, como o *DrugBank*, a *Therapeutic Target Database* (TTD) e a STITCH, que integram informações sobre a interação entre gene/proteína, fármaco e doença, são recursos podem ser úteis na identificação de fármacos e alvos de fármacos que possam ser usados para o reposicionamento de fármacos (CAFFREY et al., 2009; CLARK et al., 2012; BISPO et al., 2013).

1.4 Reposicionamento de fármacos

A busca por novos usos terapêuticos para fármacos já existentes é uma estratégia conhecida como reposicionamento de fármacos (do inglês, *drug repositioning* ou *drug repurposing*), e pode acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos. Isto porque são compostos cujas características farmacocinéticas (absorção, metabolização, distribuição e excreção) e toxicológicas já estão bem estabelecidas, e sabe-se que esses dois fatores são os principais responsáveis por 50% das falhas nos estágios pré-clínicos e clínicos do processo de desenvolvimento de fármacos (OPREA et al., 2011). Uma estratégia interessante e ainda

pouco explorada para a abordagem racional dessa ideia é o emprego de métodos *in silico* ou computacionais, como, por exemplo, a triagem virtual (EKINS et al., 2011; LIU et al., 2013).

Para as indústrias farmacêuticas, o reposicionamento de fármacos possui um significante valor comercial já que pode ampliar o mercado de um fármaco e encontrar novos usos para compostos que estão "na prateleira" com um risco financeiro baixo em um tempo mais curto (KEISER et al., 2009). Os benefícios desta estratégia incluem: trabalhar com alvos com potencial terapêutico estabelecido, a disponibilidade de materiais e dados, como estudos toxicológicos, que podem ser usados e apresentados às autoridades regulatórias, e, como resultado, um potencial para o desenvolvimento de fármacos mais eficaz em termos de custo e tempo gastos quando comparado às estratégias tradicionais utilizadas para colocar uma nova molécula no mercado (JIN; WONG, 2014). (Figura 10).

Exemplos conhecidos de fármacos que foram reposicionados incluem a talidomida, sildenafila, bupropriona e fluoxetina, em que novos usos foram encontrados além daquele inicialmente aprovado. O exemplo da talidomida é notável, visto que ela foi retirada do mercado pelo FDA devido a sua teratogenicidade se administrada no primeiro trimestre de gravidez. Todavia, este efeito adverso não é uma grande preocupação no novo uso da talidomida em tratar mieloma múltiplo, doença rara em mulheres em idade fértil (ASHBURN; THOR, 2004).

Idéias para o reposicionamento podem surgir a partir de observações casuais (por exemplo, sildenafila); de novas observações/idéias (por exemplo, a duloxetina) (THOR; KATOFIASC, 1995), ou de novas plataformas tecnológicas desenvolvidas para identificar oportunidades de reposicionamento (por exemplo, cHTS na descoberta do CombinatoRx). Entretanto, a descoberta e validação da ideia e a identificação de um composto candidato ao reposicionamento é apenas o início do processo. Análises de mercado e patentes, e a formulação de novos planos de desenvolvimento fazem parte desse processo, assim como do processo tradicional de descoberta e desenvolvimento (OPREA; MESTRES, 2012).

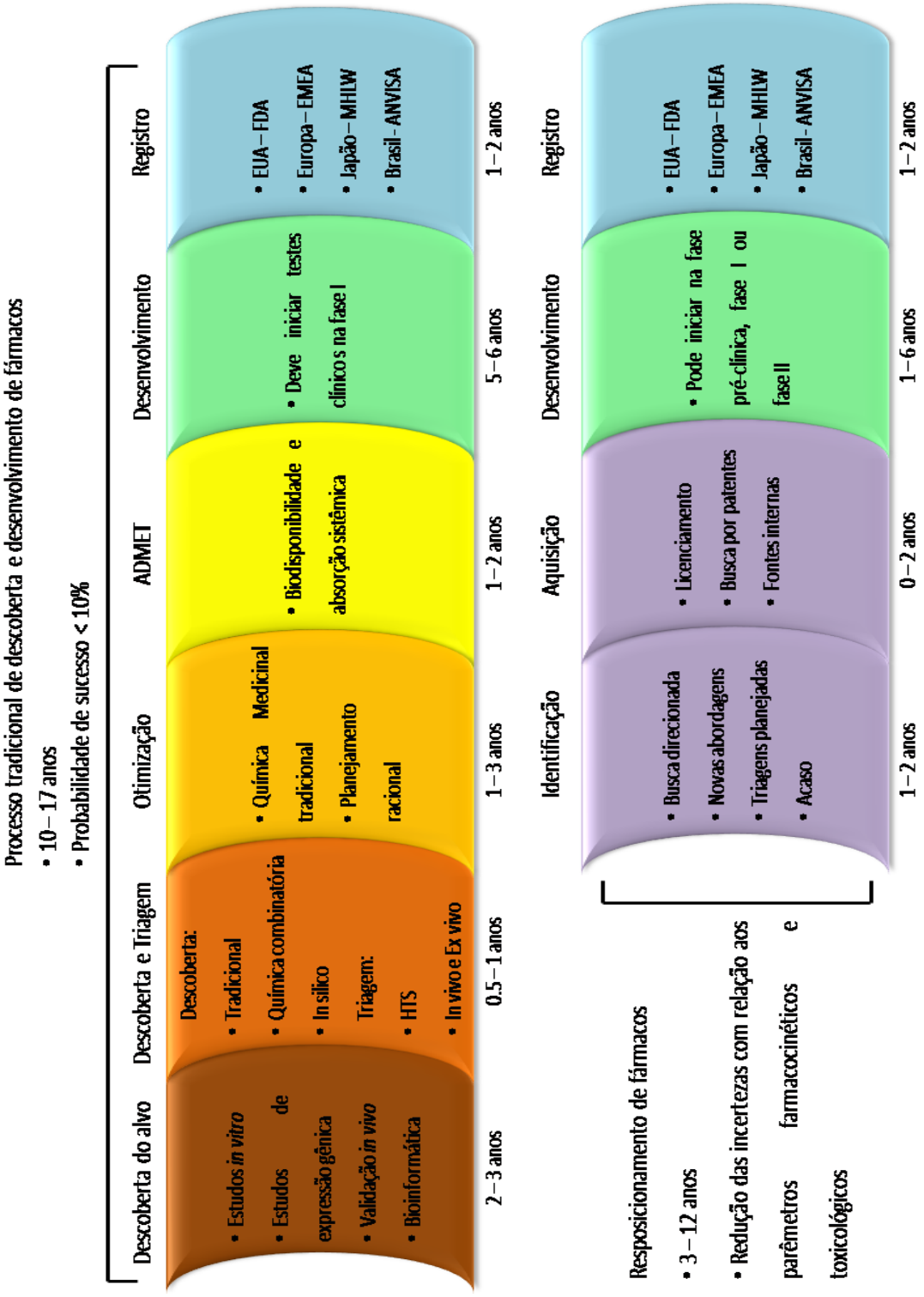


Figura 10 - Comparação entre o modelo tradicional de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos *versus* o reposicionamento de fármacos. ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade; EMEA: *European Medicines Agency*; FDA: *Food and Drug Administration*; MHLW: *Ministry of Health, Labour and Welfare;* ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitá

JUSTIFICATIVA

Considerando a escassez de alternativas terapêuticas para as doenças tropicais negligenciadas, em especial as leishmanioses, a necessidade de novos agentes antiparasitários é premente. A busca de novos fármacos mais eficazes, mais seguros e que apresentem menos efeitos colaterais é de grande relevância para a saúde pública.

As grandes evoluções em diversas áreas como a bioquímica e biologia estrutural, a bioinformática, e os avanços de *hardware* e *software* proporcionaram um suporte para o planejamento racional de fármacos utilizando estratégias computacionais.

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia com diversos casos de sucesso no mercado. É utilizada para acelerar o processo de descoberta de novos fármacos, inclusive por grandes indústrias farmacêuticas. Consiste na busca por um novo uso de fármacos já aprovados e disponíveis no mercado, sendo esta, uma estratégia altamente favorável no cenário atual de doenças negligenciadas como a leishmaniose. A descoberta de fármacos em uso clínico para outras patologias com atividade leishmanicida poderia possibilitar o surgimento de novas alternativas para o tratamento da doença de maneira mais rápida, ao reduzir custos e tempo da pesquisa em novos fármacos para doenças negligenciadas.

Nesse contexto, a OMS lançou, em 2012 (WHO, 2012c), um relatório técnico estabelecendo prioridades para a pesquisa na área de doença de Chagas, tripanossomíase africana e leishmaniose. Esse relatório indica os rumos para as pesquisas de novos métodos de diagnóstico, vacinas e fármacos, além de controle dos vetores.

No que concerne o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, foco deste trabalho, o relatório da OMS ressalta quatro pontos, sendo eles: a necessidade de desenvolver protocolos de avaliação da atividade de novos compostos, a descoberta de fármacos que possam ser inseridos em terapias combinadas, e, especialmente, a busca por novas entidades químicas que atuem em novos alvos, e a triagem de fármacos já existentes ou já aprovados para a comercialização, que nunca foram testados contra essas doenças.

Diante desse panorama de falta de opções eficazes para o tratamento das leishmanioses, o presente trabalho justifica-se por buscar novas alternativas ao investigar novos alvos moleculares e a atividade leishmanicida de fármacos já aprovados para outras finalidades, contempla as diretrizes da OMS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar possíveis alvos terapêuticos de *Leishmania* spp. e realizar uma triagem de fármacos já aprovados e disponíveis no mercado visando a identificação de fármacos com potencial atividade leishmanicida.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e selecionar possíveis novos alvos terapêuticos de *Leishmania* spp.;
- Realizar busca por homologia em bases de dados de alvos de fármacos aprovados, utilizando a sequência primária dos possíveis alvos de *Leishmania*;
- Identificar e selecionar fármacos com base na busca por homologia;
- Geração e validação de modelos de QSAR;
- Realização de triagem virtual de bases de dados de fármacos aprovados, utilizando como filtro os modelos gerados e validados de QSAR;
- Padronizar ensaios *in vitro* para avaliação do potencial leishmanicida dos compostos selecionados;
- Realizar ensaios de atividade leishmanicida *in vitro*.

3 MÉTODOS

3.1 Bioinformática: seleção de possíveis novos alvos moleculares e fármacos aprovados para o reposicionamento

3.1.1 Construção do banco de dados

O primeiro passo do trabalho foi a criação de um banco de dados que abarcasse genes que codificassem alvos potencialmente atrativos para a ação de fármacos. Para esse fim, buscou-se na base de dados TDR Targets (http://tdrtargets.org/), genes que codificassem apenas enzimas ou receptores, e que estivessem presentes concomitantemente nas quatro espécies de *Leishmania* disponíveis (*L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*) e ausentes no genoma de outros tripanosomatídeos (*T. cruzi* e *T. brucei*) (Figura 11). Como sugerido por PEACOCK et al (2007), genes comuns a todas as espécies tem potencial de serem alvos moleculares efetivos contra todas as espécies, e existe uma maior probabilidade de dentre os genes específicos ao gênero *Leishmania* estejam alvos proteínas essenciais ao desenvolvimento do parasito. A restrição por genes que codificam enzimas e receptores foi realizada com o objetivo de dar um maior foco ao banco de dados, visto que esses são os principais alvos de fármacos conhecidos atualmente (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006). Após a aplicação desses filtros, a lista de genes foi exportada da TDR Targets para uma planilha no Excel, contendo o nome do gene, o nome da proteína codificada por esse gene, sua função molecular, processo biológico, e componente celular. A sequência primária predita de aminoácidos no formato FASTA foi obtida após busca no banco de dados GeneDB (http://www.genedb.org/Homepage).

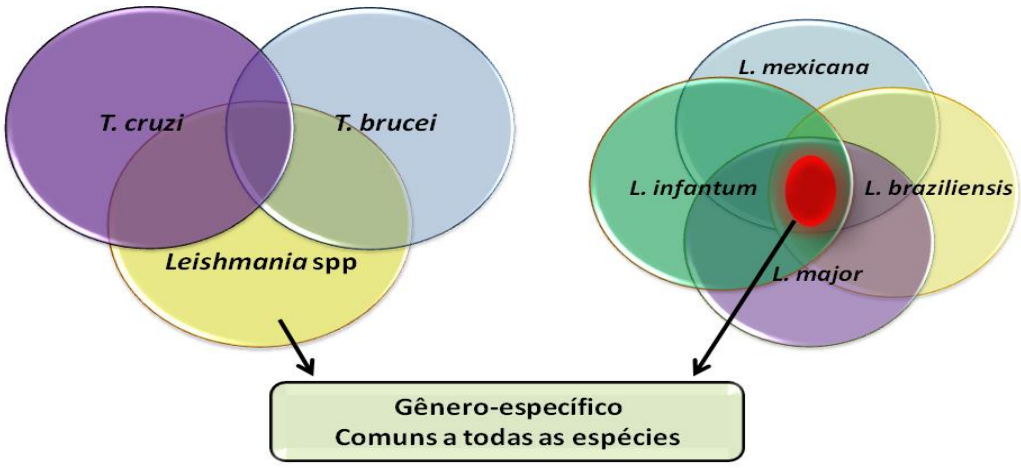


Figura 11 - Estratégia para a construção do banco de dados de genes

3.1.2 Identificação de potenciais alvos

Cada gene foi considerado como um possível alvo molecular, e a sequência primária de aminoácidos predita para cada um deles foi utilizada para busca por proteínas homólogas que são alvos de fármacos, baseando-se no princípio de alvos semelhantes podem ter ligantes semelhantes. Para esse fim, as sequências, no formato FASTA, foram empregadas para interrogar três bases de dados de fármacos e alvos moleculares: o *DrugBank* (www.drugbank.ca), a *TTD* (*Therapeutic Targets Database* (www.xin.cz3.nus.edu.sg/group/ttd/) e a *STITCH 3.1* (www.stitch.embl.de). Foram mantidos e considerados como alvos em potencial casos onde foi identificada um homologia que apresentasse um *e-value* inferior a 1^{-9}, para o *DrugBank* e a *TTD*, ou *score* superior a 0.7, para a *STITCH*. Após essa etapa, realizou-se uma busca final na TriTrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/), com o intuito de avaliar se esses potenciais alvos estão também presentes em *L. amazonensis*, espécie utilizada na avaliação *in vitro*.

As proteínas homólogas alvos de compostos classificados como nutracêuticos, hormônios, anestésicos inalantes, imunossupressores e biotecnológicos foram desconsiderados. Essa etapa final de filtragem foi realizada porque o foco primário do estudo consistia na identificação que fármacos que pudessem apresentar uma potencial atividade leishmanicida, e que, confirmada essa atividade, fosse viável sugerir que esses compostos pudessem ser reposicionados para o tratamento das leishmanioses.

3.1.3 Compilação da lista de potenciais alvos e fármacos associados

Com os resultados da etapa prévia, criou-se uma segunda planilha no Excel, onde foram anotados os possíveis alvos, as proteínas homólogas (alvos de fármacos), o *e-value* e *score*, e os fármacos associados a cada uma das proteínas homólogas. Foi considerado que cada um desses fármacos pudesse também ter atividade nos alvos homólogos de *Leishmania*. Esses fármacos foram avaliados individualmente com relação ao seu potencial tóxico.

3.1.4 Lista de fármacos não-avaliados

Com o objetivo de investigar se já existiam evidências experimentais para os fármacos identificados, foi realizada uma busca bibliográfica na base de dados PUBMED (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) por ensaios realizados *in vivo* e/ou *in vitro* em qualquer espécie de *Leishmania* para cada um dos fármacos selecionados na etapa anterior.

Os termos utilizados na busca foram ("leishmania"[MeSH Terms] OR "leishmania"[All Fields]) AND ("nome do fármaco"[MeSH Terms] OR "nome do fármaco"[All Fields]). Os compostos cuja pesquisa não retornou resultados, ou onde os resultados encontrados foram inconclusivos ou insuficientes, permaneceram na lista e foram sugeridos como prioritários para a avaliação biológica.

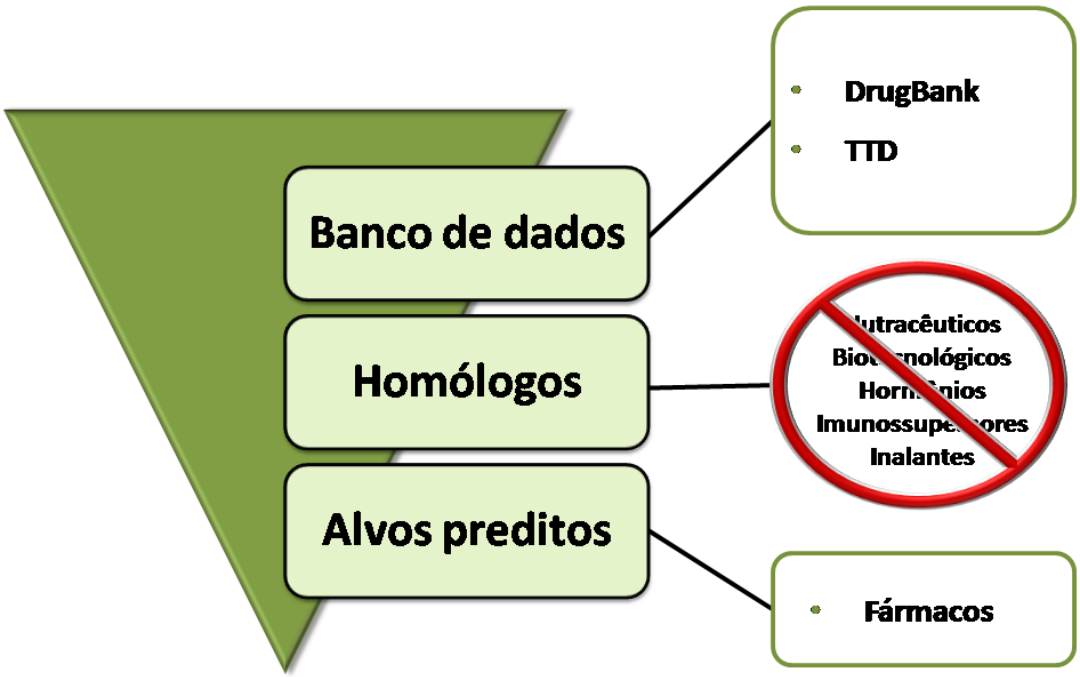


Figura 12 - Fluxo de trabalho utilizado na estratégia de bioinformática.

3.2 Quimioinformática: desenvolvimento de modelos de QSAR

3.2.1 Conjunto de dados

O conjunto de dados (AID660871), contendo 400 moléculas avaliadas experimentalmente *in vitro* em formas amastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/BE/67), foi retirado da base de dados PubChem BioAssay (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay). A faixa de atividade (CE50) varia de < 0,125 μM para a mais potente, até > 32 μM, para as menos potentes/inativas. Contraíons foram retirados e quimiotipos específicos, como grupos aromáticos e nitro, foram padronizados usando o *software* Standardizer (ChemAxon, Budapest, Hungary, *http://www.chemaxon.com*). A presença de duplicatas - compostos

idênticos reportados mais de uma vez no mesmo conjunto de dados – foi avaliada, e nenhuma duplicata foi encontrada. O limiar de atividade para a construção dos modelos de QSAR foi definido em 10 μM; dessa maneira, compostos com CE50 abaixo de 10 μM foram considerados ativos, e acima desse valor foram considerados inativos.

A partir dessa divisão obteve-se um conjunto desbalanceado (número diferente entre moléculas ativas e inativas). Para obter-se uma proporção de 1:1 entre ativos e inativos, o conjunto foi balanceado, reduzindo o número de inativos até igualar o número de ativos. Metade dos compostos inativos foi selecionada aleatoriamente, e a outra metade foi composta pelos compostos inativos mais similares aos ativos.

3.2.2 Cálculo de descritores

3.2.2.1 Fingerprints

Descritores do tipo *fingerprint* são capazes de capturar características das moléculas que são relevantes para a atividade biológica, formando uma lista de valores binários (0 ou 1), indicando a presença ou ausência de subestruturas particulares a partir de informações topológicas. Essas subestruturas podem ser pré-definidas ou não, onde cada conjunto de moléculas gera um conjunto de subestruturas próprio posterior ao cálculo (ROGERS; HAHN, 2010). Nesse estudo foram utilizados os *fingerprints* MACCS, AtomPair e FeatMorgan.

3.2.2.2 SiRMS

Descritores SiRMS (do inglês, *Simplex Representation of Molecular Structure*) contam fragmentos de quatro átomos com composição e estrutura topológica fixa. Em nível bidimensional, a conectividade dos átomos, tipo de átomo e de ligação (simples, dupla, tripla ou aromática) foram consideradas. Esses descritores consideram: tipo de átomo, carga parcial, lipofilicidade, refratividade molar, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio. Características atômicas com valores contínuos (carga, lipofilicidade e refração) possuem as seguintes divisões: *(i)* carga parcial $I \leq -0{,}05 < II \leq 0 < III \leq 0{,}05 < IV$, *(ii)* lipofilicidade $I \leq -0{,}5 < II \leq 0 < III \leq 0{,}5 < IV$; *(iii)* refratividade molar $I \leq 1{,}5 < II \leq 3 < III \leq 8 < IV$. Para ligação de hidrogênio, os átomos são divididos em três categorias: aceptor de ligação de hidrogênio, doador de ligação de hidrogênio e átomo indiferente (KUZ'MIN; ARTEMENKO; MURATOV, 2008; MURATOV et al., 2010).

3.2.2.3 Dragon

Os descritores 2D foram gerados usando o programa DRAGON (v.5.5, Talete SRL, Milan, Italy): constitucionais (contagem de átomos e grupos químicos), grupos funcionais, fragmentos centrados nos átomos, topológicos, índices de conectividade, índices de informação, índices de carga topológica, e propriedades moleculares (TODESCHINI; CONSONNI, 2000).

3.2.3 Desenvolvimento dos modelos de QSAR

O fluxo de trabalho para geração dos modelos de QSAR incluiu três passos (TROPSHA, 2010): *(i)* preparo/análise do conjunto de dados (seleção de descritores e compostos), *(ii)* construção dos modelos e *(iii)* validação/seleção dos modelos. Nesse trabalho foi empregado o método de validação cruzada externa do tipo 5-*fold* (Figura 13): o conjunto de dados total com atividade experimental definida é aleatoriamente dividido em cinco subgrupos de tamanhos iguais; então um desses subgrupos (20% de todos os compostos) é definido como conjunto de validação externa e os quatro conjuntos restantes formam o conjunto de modelagem (80% de todo o conjunto de dados). Esse procedimento é repetido cinco vezes, de modo que cada um dos cinco subconjuntos seja utilizado como conjunto de validação externa.

O domínio de aplicabilidade (AD) para cada tipo de descritor foi estimado com base nas distâncias euclidianas entre os conjuntos de treinamento de cada modelo gerado no processo de validação cruzada. A distância entre um composto do conjunto teste e o seu vizinho mais próximo no conjunto de treinamento é comparado com o nível de limiar predefinido do DA. Se a distância é maior do que este limiar, a previsão não é considerada confiável. No presente estudo, dois métodos de aprendizado de máquina foram utilizados para fazer a classificação dos compostos, o *Random Forest* (RF), e o *Support Vector Machine* (SVM). Esses dois métodos de classificação foram combinados com os cinco tipos de descritores diferentes, gerando um total de oito modelos diferentes. Os modelos foram construídos utilizando o pacote de qsaR e o fluxo de trabalho foi integrado no KNIME.

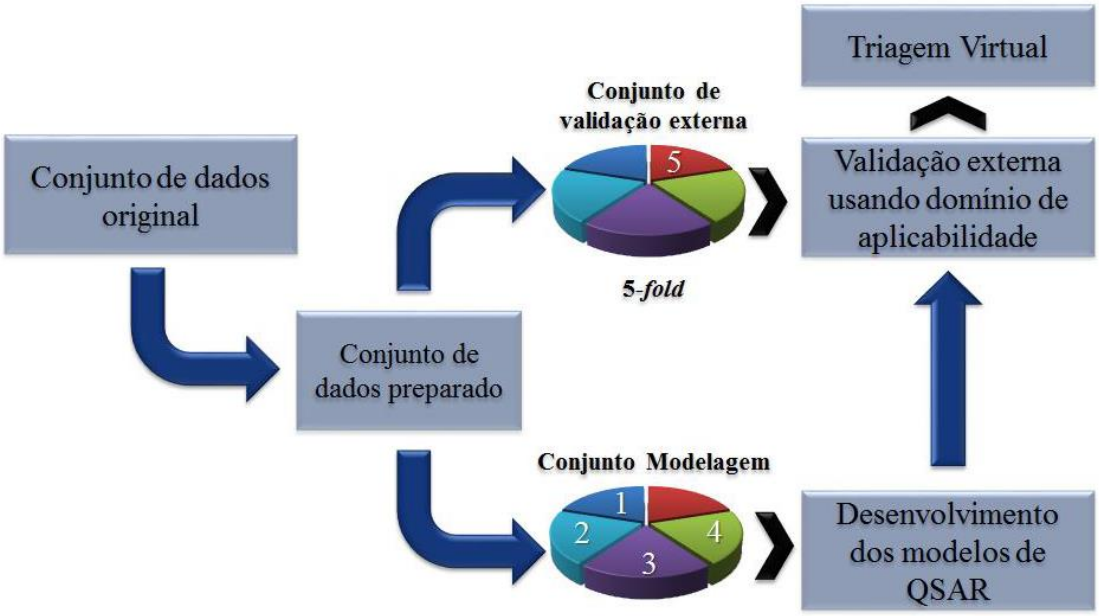


Figura 13 - Fluxo de trabalho para desenvolvimento dos modelos de QSAR. (Modificado de TROPSHA, 2010)

3.2.4 Avaliação do desempenho dos modelos

Os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliar diferentes aspectos da preditividade dos modelos:

Acurácia balanceada (ACB):

$$\text{ACB} = \frac{(\text{Sensibilidade} + \text{Especificidade})}{2}$$

Coeficiente kappa de Cohen (kappa):

$$\text{kappa} = \frac{\Pr(a) - \Pr(e)}{1 - \Pr(e)}$$

Sensibilidade:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{VP}}{\text{P}}$$

Especificidade:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{VN}}{\text{N}}$$

Precisão:

$$\text{Precisão} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

Onde VP é o número de compostos verdadeiros positivos (classificados corretamente), P é o número de compostos positivos (verdadeiros positivos + falsos negativos), VN é o número de compostos verdadeiros negativos, N é o número de compostos negativos, Pr (*a*) é porcentagem de concordância observada, e Pr (*e*) é a probabilidade hipotética de concordância aleatória.

3.3 Avaliação biológica

3.3.1 Manutenção dos parasitos

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), cedidas pelo banco de leishmânias (Leishbank) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), foram cultivadas em meio Grace (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Ciprion) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 200 Ui/mL de penicilina (Sigma) e 200 μg/mL de estreptomicina (Sigma), a 26° C em estufa BOD. A cultura foi mantida em placa de 24 poços, e repiques foram realizados a cada dois dias, iniciando com 10^6 parasitos/mL.

3.3.2 Triagem biológica e determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE50) dos fármacos estudados

Os fármacos avaliados foram dissolvidos em DMSO. O isotianato de pentamidina foi utilizado como padrão para os estudos. Para a triagem biológica *in vitro*, os fármacos foram inicialmente avaliados na concentração de 100 μM, e os fármacos que apresentaram atividade (mais de 50% de parasitos mortos) nessa concentração foram encaminhados para a determinação do CE50. Para se definir o CE50, os fármacos foram diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações, obtidas por diluição seriada 1:2. A concentração do solvente, quando utilizado, foi inferior a 0,5% do volume final do poço, para não causar danos aos parasitos. O CE50 dos fármacos foi determinado utilizando apenas as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois ensaios independentes.

3.3.3 Ensaios com promastigotas

A viabilidade das promastigotas, obtidas em fase logarítmica, foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetilazol-2i)-2,5-difenil brometo de tetrazólio). O ensaio

baseia-se na redução do sal de tetrazólio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide] pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, gerando cristais violeta de formazam. Esta redução ocorre apenas em células viáveis; dessa forma, a quantidade de formazan é diretamente proporcional à quantidade de células vivas (DUTTA et al., 2005). A quantidade de células utilizada foi $1x10^6$ células por poço, em placas de 96 poços (Costar), contendo os compostos a serem testados em diferentes concentrações, diluídos no meio de cultura. Após um período de 48 horas de incubação em estufa BOD a 26 ºC adicionou-se 20 µL de MTT (5 mg/mL). Em seguida, a placa foi incubada por mais 4 horas sob as mesmas condições, seguido da adição de 80 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 40% por 24 horas para solubilizar os cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada a 550 nm, em leitor de microplacas (MULTISKAN). Como controle negativo (100% de células mortas), utilizou-se células tratadas em banho-maria a 60ºC por duas horas. Como controle positivo (100% de células vivas), utilizaram-se células não tratadas.

3.3.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA) para a determinação da CE50, por meio de curvas sigmoidais do tipo dose-resposta , e intervalos de confiança 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Bioinformática: seleção de possíveis novos alvos moleculares e fármacos aprovados para o reposicionamento

4.1.1 Construção do banco de dados

Do processo inicial de filtragem para a obtenção do banco de dados obteve-se: 7885 genes comuns as quatro espécies de *Leishmania* com genoma elucidado e disponível na TDR (*L. mexicana, L. major, L. infantum, L. braziliensis*) e 1766 genes específicos do gênero *Leishmania*, dentre os parasitos da família Tripanosomatidae. Ao fazer a interseção dessas duas listas, restaram 1487 genes, que foram reduzidos à 229 ao restringir os resultados apenas à enzimas e receptores.

4.1.2 Busca por homologia

A busca por similaridade, realizada nas bases de dados DrugBank (DB), STITCH, e TTD, identificou que 85 das 229 sequências avaliadas possuíam pelo menos uma proteína homóloga, considerando os valores de corte estabelecidos (TTD e DB: *e-value* < 10-9, STITCH: *score*: > 0.7). Dessas 85, foram desconsideradas as proteínas homólogas que interagiam com compostos classificados como nutracêuticos, biotecnológicos, imunossupressores, hormônios e anestésicos.

Após essa etapa, permaneceram 37 potenciais alvos identificados a partir do genoma de *Leishmania* spp, que apresentavam 68 homólogos únicos: para alguns alvos mais de uma proteína homóloga foi identificada, e em outros casos, a mesma proteína foi identificada como homóloga de mais de um alvo. Observou-se que 122 fármacos interagiam com os homólogos identificados. Os resultados obtidos nessa etapa do estudo estão expostos na Tabela 2. Cada proteína homóloga é apresentada apenas uma vez, de acordo com o menor *e-value* e/ou maior score em relação aos potencias alvos de *Leishmania*.

A partir dessa lista final, realizou-se uma busca na literatura a fim de avaliar quais desses fármacos haviam sido previamente avaliados em *Leishmania*. Os fármacos ainda não avaliados com relação ao seu potencial leishmanicida deverão ser validados experimentalmente.

Tabela 2 - Resultados obtidos na busca por homologia.

Gene	Produto do gene	Proteína homóloga (Espécie)	*E-value* / *Score*	Fármaco
LmjF 35.0040	Proteína semelhante à fosfolipase fosfatidilinositol-específica	Proteína semelhante à fosfolipase C 1 (*Homo sapiens*)	1,67e-49	Quinacrina
LmjF 34.3330	Proteína semelhante à citocromo P450	Citocromo P450 3A43 (*Homo sapiens*)	1,05e-20	Etosuximida Fenelzina Oxazepam Zalcitabina Praziquantel Dolutegravir
		Citocromo P450 4A11 (*Homo sapiens*)	1,60e-20	Pentamidina Clofibrato
		Tromboxano-A sintase (*Homo sapiens*)	2,92e-18	Sulfasalazina Ridogrel
		Esterol 17-alfa-hidroxilase/17,20 liase (*Homo sapiens*)	4,80e-17	Metoclopramida
		Citocromo P450 2J2 (*Homo sapiens*)	1,22e-16	Masoprocol Rivaroxaban Apixaban Levomilnacipran
		Citocromo P450 26A1 (*Homo sapiens*)	3,53e-14	Cetoconazol Acitretina
		Lanosterol 14-alfa demetilase (*Candida albicans*)	4,13e-14	Tioconazol Cetoconazole Sertraconazol Itraconazole
		Enzima de clivagem de colesterol, mitocondrial (*Homo sapiens*)	2,37e-9	Clotrimazol Omeprazol Digoxina Cetoconazol Aminoglutetimida Terbinafina Clomifeno Dinoprostona Saquinavir Digitoxina
LmjF 32.0780	Proteína quinase, putativa	Fator de crescimento de fibroblasto Receptor 1 (*Homo sapiens*)	3.43e-11	Regorafenibe Ponatinibe Sorafenibe
		Fator de crescimento de fibroblasto Receptor 4 (*Homo sapiens*)	2.37e-11	Ponatinibe
		Fator de crescimento de fibroblasto Receptor 3 (*Homo sapiens*)	1.26e-12	Pasopanibe Ponatinibe

Tabela 2 - Resultados obtidos na busca por homologia.

Gene	Produto do gene	Proteína homóloga (Espécie)	*E-value / Score*	Fármaco
LmjF 01.0530	Ácido graxo de cadeia longa - CoA ligase, putativa	Ácido graxo de cadeia longa - CoA ligase 4 (*Homo sapiens*)	3.74e-25	Troglitazona Rosiglitazona
LmjF 35.1220	Desidrogenase de cadeia curta, putativa	Carbonil redutase [NADPH] 1 (*Homo sapiens*)	1.62e-23	Tretabenazina Doxorubicina Lubiprostona
LmjF 34.0150	Malato desidrogenase, putativa	Malato Desidrogenase (*Escherichia coli*)	4.88e-82	Nitrofural
LmjF 35.2160	Adenina aminohidrolase	Adenosina Desaminase (*Homo sapiens*)	1.24e-21	Dipiridamol Vidarabina Pentostatina Teofilina Nelarabina
LmjF 31.2320	Proteína semelhante à helicase	Proteína de ligação 1 DNA helicase (*Homo sapiens*)	2.12e-21	Epirubicina
LmjF 33.1980	Serina/Treonina-quinase, putativa	Quinase inibidora de kappa-B Subunidade beta (*Homo sapiens*)	4.83e-17	Mesalazina Sulfasalazina Auranofina
		Receptor de fator de crescimento BDNF/NT-3 (*Homo sapiens*)	2.85e-16	Amitriptilina
		Fator de crescimento de fibroblasto Receptor 2 (*Homo sapiens*)	1.09e-16	Talidomida Regorafenib Ponatinib
		Proteína quinase ativada por 5'-AMP Subunidade catalítica 1-alfa (*Homo sapiens*)	2,70e-22	Fenformina AAS
LmjF 31.2490	Adrenodoxina, putativa	Adrenodoxina, mitocondrial (*Homo sapiens*)	1.74e-18	Milotano
LmjF 36.4720	Proteína semelhante à metionina sintase redutase	NADPH--citocromo P450 redutase (*Homo sapiens*)	2.69e-32	Nilutamida Mitomicina Nitrofurantoína Doxorubicina Daunorubicina
LmjF 34.0670	Transportadores ABC subfamília C membro 8, putativa	Transportadores ABC subfamília C membro 8 (*Homo sapiens*)	6,05e-25	Nateglinida Mitiglinida Gliquidona Tolbutamida Glicazida Glipizida Gliburida Repaglinida Clorpropamida

Tabela 2 - Resultados obtidos na busca por homologia.

Gene	Produto do gene	Proteína homóloga (Espécie)	*E-value* / *Score*	Fármaco
LmjF 23.0860	Proteína semelhante à quinona oxidoreductase	Ácido graxo sintase (*Homo sapiens*)	6,95e-9	Orlistat
		Quinona oxidoreductase (*Homo sapiens*)	6,44e-25	Dicoumarol
LmjF 35.0640	Proteína semelhante à frutose fosfofrutofuranosidase	Esfingomielina fosfodiesterase (*Homo sapiens*)	9,89e-13	Amlodipina Clorpromazina Desipramina
LmjF 04.1110	ATPase movida por prótons	K^+ ATPase cadeia alfa 1 (*Homo sapiens*)	5,88e-9	Pantoprazole Omeprazole Lansoprazole Rabeprazole
LmjF 01.0820	Proteína semelhante à canal de potássio	Canal de potássio ativado por cálcio subunidade alfa 1 (*Homo sapiens*)	7,51e-17	Miconazole Clorzoxazona Procaína Hidroflumetiazida Hidroclorotiazida Diazoxida Ácido cromoglicico
LmjF 26.2670	Transportador ABC subfamília B membro 2, putativa	Transportador ABC subfamília A membro 1 (*Homo sapiens*)	2,97e-10	Gliburida Probucol
		Transportador ABC subfamília A membro 3 (*Homo sapiens*)	7,0e-12	Imatinib
		Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (*Homo sapiens*)	6,78e-19	Ivacaftor Ibuprofeno Bumetanida Gliburida
		Transportadores ABC subfamília C membro 9 (*Homo sapiens*)	1,26e-26	Gliburida
		Proteína de resistência à multifármacos 7 (*Homo sapiens*)	1,29e-27	Docetaxel Paclitaxel Citarabina Doxurobicin Sildenafila Tenofovir Gemcitabina Vincristina Verapamil Daunorubina Etoposídeo
		Transportadores ABC subfamília C membro 11(*Homo sapiens*)	4,78e-29	Indometacina

Tabela 2 - Resultados obtidos na busca por homologia.

Gene	Produto do gene	Proteína homóloga (Espécie)	*E-value / Score*	Fármaco
		Proteína de resistência à multifármacos 6 (*Homo sapiens*)	1,14e-44	Indometacina Teniposídeo Cisplatina Sulfinpirazona Vinblastina Dactinomicina Doxorubicina
		Transportador de peptídeos antigênicos 1 (*Homo sapiens*)	1,44e-60	Lapatinib
		Proteína de resistência à multifármacos 3 (*Homo sapiens*)	0.0	Silodosina Etravirina
		Transportadores ABC subfamília A membro 5 (*Homo sapiens*)	7,89e-12	Tacrolimus
LmjF 34.0990	Glicoproteína-P	Proteína de resistência à multifármacos 5 (*Homo sapiens*)	3,8e-39	Atorvastatina Sulfinpirazona Mercapturina Zidovudina Sildenafila Fluoroacil Alprostadil Adefovir Dinoprostone Dipiridamol
		Transportador de pertídeos antigênicos 1 (*Homo sapiens*)	1,64e-60	Lapatinib
		Transportadores ABC subfamília B membro 8, mitocndiral (*Homo sapiens*)	1,51e-83	Doxorubicin
		Proteína de resistência à multifármacos 3 (*Homo sapiens*)	0.0	Silodosina Etravirina
LmjF 17.0390	Proteína quinase, putativa	Tirosina-quinase JAK3 (*Homo sapiens*)	2,44e-19	Tofacitinibe
		Serina/Treonina-quinase B-raf (*Homo sapiens*)	8,61e-20	Sorafenibe Regorafenibe Dabrafenibe Vemurafenibe
		Tirosina-quinase Fyn (*Homo sapiens*)	1,53e-20	Dasatinib
		Tirosina-quinase JAK2 (*Homo sapiens*)	8,19e-21	Ruxolitinibe Tofacitinibe

Tabela 2 - Resultados obtidos na busca por homologia.

Gene	Produto do gene	Proteína homóloga (Espécie)	*E-value* / *Score*	Fármaco
		Tirosina-quinase Yes (*Homo sapiens*)	3,12e-21	Dasatinib
		Proteína de fusão BCR/ABL isoforma X9 (*Homo sapiens*)	4,96e-21	Imatinib
		Tirosina-quinase 2 Abelson (*Homo sapiens*)	6,18e-23	Dasatinibe
		Tirosina-quinase ABL1 (*Homo sapiens*)	2,23e-21	Nilotinibe Imatinibe Dasatinibe Bosutinibe
		Tirosina-quinase Lyn (*Homo sapiens*)	6,67e-24	Ponatinibe Bosutinibe
LmjF 13.1640	Proteína quinase ativada por mitógeno, putativa	Proteína quinase 3 ativada por mitógeno (*Homo sapiens*)	9,54e-46	Sulindac
		Proteína quinase 11 ativada por mitógeno (*Homo sapiens*)	7,71e-41	Regorafenib
LmjF 30.0800	Proteína quinase, putativa	Proteína quinase C tipo alfa (*Homo sapiens*)	9,86e-56	Tamoxifeno Ingenol Mebutato
		Proteína quinase C tipo theta (*Homo sapiens*)	2,93e-56	Tamoxifeno
		Proteína quinase C tipo épsilon (*Homo sapiens*)	7,76e-57	Tamoxifeno
		Proteína quinase C tipo beta (*Homo sapiens*)	1.44e-56	Tamoxifeno
		Proteína quinase C tipo delta (*Homo sapiens*)	5,62e-59	Tamoxifeno Ingenol melbutato
		Proteína quinase C tipo iota (*Homo sapiens*)	3,37e-59	Tamoxifeno
		Proteína quinase 1 dependente de 3-fosfoinositídeo (*Homo sapiens*)	1,04e-40	Celecoxib
		Proteína quinase tipo II dependente de cálcio/calmodulina Subunidade gamma (*Homo sapiens*)	8,13e-35	Bosutinibe

4.2 Quimioinformática: desenvolvimento de modelos de QSAR

4.2.1 Conjunto de dados

O conjunto de dados retirado do *PubChem BioAssay* continha 400 compostos. Desses 400. Após a divisão com o limiar de atividade de 10 μM, 91 moléculas foram definidas como ativas e 309 inativas. O conjunto foi balanceado para a proporção 1:1: 91 ativas e 91 inativas.

4.2.2 Modelos gerados

Utilizando todas as combinações possíveis entre os descritores e os métodos de classificação, oito modelos diferentes foram gerados. Os resultados da validação externa do tipo *5-fold* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados estatísticos dos melhores modelos de QSAR gerados.

Modelo	AC	Sen.	Esp.	Kappa	Cobertura
MACCS-SVM	0,65	0,59	0,70	0,30	1
MACCS-SVM AD	0.64	0,71	0,57	0,29	0,62
FeatMorgan-SVM	0,68	0,66	0,69	0,35	1
FeatMorgan-SVM AD	0,68	0,72	0,63	0,35	0,62
AtomPair - RF	0,67	0,66	0,68	0,34	1
AtomPair - RF AD	0,66	0,68	0,63	0,32	0,66
FeatMorgan - RF	0,65	0,66	0,63	0,30	1
FeatMorgan - RF AD	0,65	0,72	0,55	0,27	0.62
DRAGON - RF	0,7	0,74	0,66	0,40	1
DRAGON - RF AD	0,7	0,79	0,60	0,39	0.69
SiRMS - RF	0,66	0,68	0,65	0,33	1
SiRMS - RF AD	0,66	0,63	0,68	0,31	0.84

AC: acurácia; Sen.: sensibilidade; Esp.: especificidade.

Modelos consenso foram gerados, utilizando os resultados de quatro modelos individuais. Parâmetros estatísticos reproduzidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados estatísticos dos melhores modelos consenso utilizando a combinação de quatro modelos individuais.

Modelo	AC	Sen.	Esp.	Kappa	Cobertura
SiRMS - RF + DRAGON - RF + MACCS-SVM + FeatMorgan-SVM	0,77	0,75	0,79	0,54	1
SiRMS - RF + DRAGON - RF + MACCS-SVM + FeatMorgan-SVM AD	0,72	0,74	0,70	0,44	0,85
SiRMS - RF + DRAGON - RF + AtomPair-SVM + FeatMorgan-SVM	0,76	0,78	0,74	0,51	1
,iRMS - RF + DRAGON - RF + AtomPair-SVM + FeatMorgan-SVM AD	0,67	0.73	0,61	0,34	0,89
SiRMS - RF + DRAGON - RF + MACCS-SVM + AtomPair -SVM	0,77	0,76	0,77	0,53	1
SiRMS - RF + DRAGON - RF + MACCS-SVM + AtomPair -SVM AD	0,72	0,72	0,71	0,43	0,85

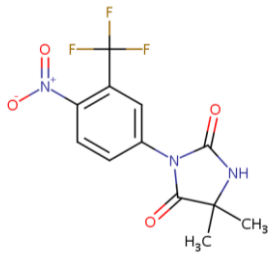
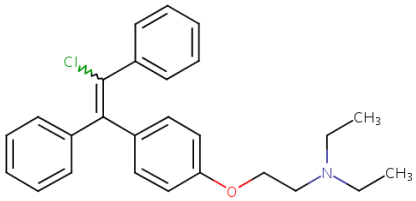
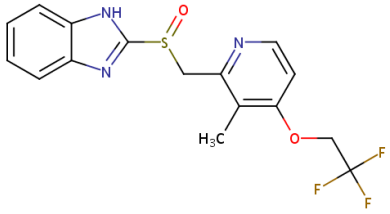
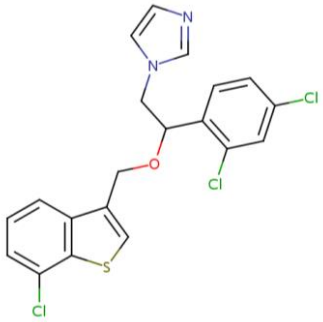
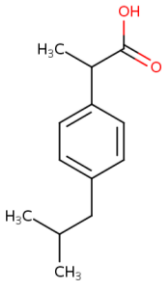
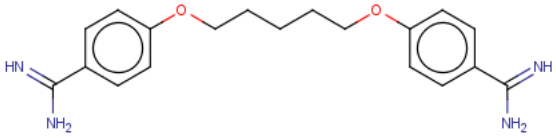
AC: acurácia; Sen.: sensibilidade; Esp.: especificidade.

4.3 Avaliação biológica

4.3.1 Triagem biológica e determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE50) dos fármacos estudados

A concentração efetiva 50% (CE50) em promastigotas de *L. amazonensis* para os compostos avaliados estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores expressos em µM das CE50 dos fármacos avaliados contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Fármaco	Estrutura química	CE50 µM (IC 95%)
Nilutamida		NA
Clomifeno		5,75 (4,77 - 6,91)
Lansoprazol		NA
Sertaconazol		< 15**
Ibuprofeno		55,08 (49,66 - 61,23)
Pentamidina*		7,24 (5,25 - 10,23)

CE50: concentração requerida para a inibição do crescimento de 50% das células. IC 95%: intervalo de confiança de 95%; NA: sem atividade; ND: não determinada; *Pentamidina: fármaco padrão; **CE50 não foi determinado, mas nas concentração de 15 µM todos os parasitos encontravam-se inviáveis..

5 DISCUSSÃO

5.1 Bioinformática: seleção de possíveis novos alvos moleculares e fármacos aprovados para o reposicionamento

Ao longo dos anos, o reposicionamento de fármacos demonstrou demonstrou-se uma estratégia bem sucedida. Praticamente todo os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da leishmaniose enquadra-se nesse caso: miltefosina, anfotericina B e pentamidina foram previamente aprovados concebidos e/ou aprovados para outras indicações (OPREA et al., 2011; POLLASTRI; CAMPBELL, 2011; NOVAC, 2013; NAGLE et al., 2014).

Devido a esse panorama, decidiu-se trabalhar com informações disponíveis no genoma de espécies de *Leishmania*, buscando por alvos homólogos validados. A justificativa para a utilização do grupo de genes gênero-específico e comuns às quatro espécies como ponto de partida baseia-se em alguns pressupostos: ao buscar genes comuns a todas as espécies, espera-se que, caso algum alvo molecular seja encontrado e validado, esse esteja presente em todas as espécies, representando um potencial alvo para ação de fármacos com amplo espectro, que possa vir a ser efetivo no tratamento das diversas formas clínicas da doença.

Nesse sentido, foi conveniente que dentre as quatro espécies com genoma disponibilizado na TDR, encontram-se espécies causadoras de doenças no Novo Mundo (*L. braziliensis*), no Velho Mundo (*L. major*), e das formas tegumentar (*L. mexicana*) e visceral (*L. infantum*).

A vantagem esperada ao reduzir esses possíveis alvos para aqueles gêneros-específicos baseia-se na idéia de que esses genes são importantes no que diferencia o parasito dos outros da mesma família, visto que eles evoluíram de um ancestral comum, o que pode ter implicância (podem ser essenciais) no desenvolvimento e no estabelecimento da doença específica do gênero *Leishmania* (BEVERLEY, 2003; PEACOCK et al., 2007). Não obstante, vale ressaltar que existem diversas etapas pré e pós-transcricionais que podem também exercer um papel importante nessas diferenças.

Imunossupressores, por causarem a depressão do sistema de defesa dos indivíduos, não são alternativas viáveis para o tratamento de uma doença infecciosa, mesmo que possuam atividade leishmanicida, como é o caso da ciclosporina (YAU et al., 2010). Também existem evidências de que pacientes tratados com corticosteróides ou metotrexato estão em risco (WHO, 2010b). Esses são exemplos de fármacos imunossupressores identificados na busca por homologia que foram descartados.

Nutracêuticos (quase sempre o próprio substrato natural da enzima, ou algum cofator) foram retirados porque foi considerado que muito dificilmente esses compostos causariam algum dano ao parasito. Hormônios, por exercerem muitos efeitos colaterais, foram considerados inconvenientes para o reposicionamento, assim como os anestésicos inalantes. Por fim, foram excluídos produtos biotecnológicos (peptídeos), pois se visava trabalhar apenas com moléculas pequenas.

Alvos homólogos que interagem com um número muito grande de moléculas (> 30) também foram desconsiderados, por dois motivos: o primeiro é prático, considerando que seria inviável, por exemplo, avaliar os 568 fármacos que interagem com a CYP3A4, principal enzima responsável pelo metabolismo de fármacos, e homóloga ao LmjF.34.3330, e o segundo, mais importante, é o fato de que essas proteínas não tem especificidade com relação ao seu substrato, podendo sofrer diversas modificações estruturais para acomodar moléculas estruturalmente muito diferentes. Estratégias baseadas na estrutura primária das proteínas, como a utilizada aqui, não contemplam essas variações estruturais, perdendo a especificidade da relação entre proteína e molécula pequena, que é a base desse estudo (ZHOU, 2008; SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013)

Nesse mesmo sentido, de falta de especificidade da relação proteína-molécula, fármacos indutores também foram desconsiderados. A indução, geralmente, ocorre via interação com uma segunda proteína, um fator de transcrição, que aumenta a expressão da primeira proteína (a proteína homóloga, no caso). Portanto, a interação direta ocorre entre o fármaco e o fator de transcrição, e não entre o fármaco e a proteína homóloga (WATKINS; NOBLE; REDINBO, 2002; GALETIN; GERTZ; HOUSTON, 2010).

É importante salientar que, observadas todas as restrições e filtragens realizadas, nenhum fármaco foi identificado nas bases de dados TTD e STITCH sem que tivessem sido previamente identificados pelo DB. Alguns alvos foram identificados unicamente pela TTD, e/ou STITCH, entretanto nenhum desses alvos estava associado a fármacos (o foco primário do estudo) que não tivessem sido identificados pelo DB.

Com relação aos 37 potenciais alvos identificados, 35 são expressos constitutivamente nas duas fases de vida do parasito (LEIFSO et al., 2007). Um único gene, o LmjF35.2160, tem maior expressão em promastigotas, e é considerado não essencial (BOITZ; ULLMAN, 2006; LEIFSO et al., 2007), não sendo, portanto um alvo viável. Além disso, 12 dos potenciais alvos identificados já haviam sido previamente sugeridos como possíveis alvos terapêuticos por outro estudo *in silico* (FLÓREZ et al., 2010). A validação desses alvos,

portanto, deve ser priorizada. Outro ponto que merece destaque é o fato de que 41% dos potenciais alvos identificados são proteínas quinase.

Estima-se que entre 30 e 35% dos programas de P&D estejam destinados ao estudo de quinases (WEINMANN; METTERNICH, 2005). A relevância desses alvos está amplamente documentada, especialmente no campo da oncologia. Diante desse cenário, diversos esforços vêm sendo realizados na investigação dessas proteínas como alvos para doenças parasitárias (DOERIG; TOBIN, 2010; ROTELLA, 2012). Não há dúvidas com relação ao potencial de interação e modulação por moléculas pequenas dessas proteínas, contudo, ainda não se sabe se será possível identificar compostos seletivos para os parasitos, vistos que a maioria dos inibidores de quinase apresenta toxicidade elevada. Estudos de homologia identificaram 179 genes com homólogos em eucariotos, e 17 genes codificando quinases atípicas (PARSONS et al., 2005). Talvez a exploração dessas quinases atípicas seja o melhor caminho para a busca de compostos seletivos.

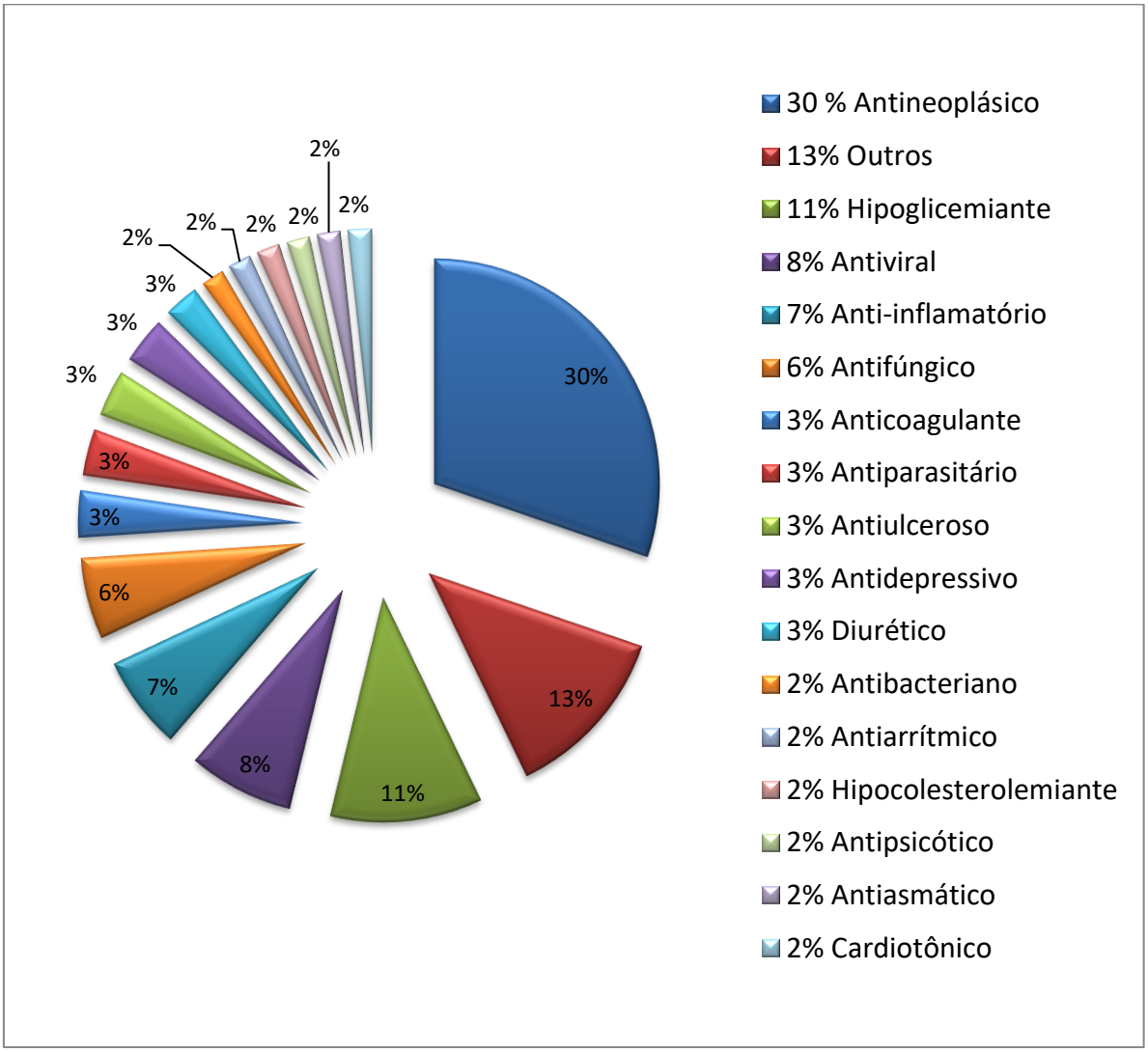


Figura 14 - Distribuição dos fármacos identificados pela estratégia de bioinformática por classe terapêutica.

Ao analisar a distribuição de fármacos de acordo com a classe terapêutica (Figura 14), percebe-se que a classe com o maior número de compostos identificados é a de antineoplásicos. Dados da literatura mostram, de fato, que um grande número de compostos utilizados e/ou planejados para o tratamento do câncer tem atividade leishmanicida (KLINKERT; HEUSSLER, 2006; FUERTES et al., 2008). A própria miltefosina é o melhor exemplo dessa relação: inicialmente planejada como um agente anticâncer, tornou-se o primeiro fármaco ativo por via oral no tratamento da leishmaniose (MACHADO et al., 2010).

Outras das classes com maior número de retornos também apresentam compostos com atividade leishmanicida reportada. A glibenclamida, um hipoglicemiante (segunda maior classe) (PONTE-SUCRE; FIGARELLA; MOLL, 2001; SERRANO-MARTÍN; PAYARES; MENDOZA-LEÓN, 2006; PADRÓN-NIEVES et al., 2009), tem atividade conhecida contra a doença. Diversos antifúngicos, como a própria anfotericina B e o cetoconazol, ambos utilizados na terapia, conseguem eliminar o parasito (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Antivirais inibidores de protease, como o Nefinavir, também já foram validados experimentalmente como inibidores do crescimento do parasito (DESJEUX; ALVAR, 2003; SANTOS et al., 2009; KUMAR et al., 2010).

Essa estratégia permitiu a identificação de 28 (22%) fármacos com algum tipo de atividade leishmanicida (Tabela 6), demonstrando a sua alta capacidade em recuperar esses compostos. Se considerados fármacos não avaliados, mas estruturalmente semelhantes, ou com o mesmo mecanismo de ação dos ativos, esse número salta pra 46 (37%). Para apenas 12 (9%) fármacos existem evidências de que não possuam atividade leishmanicida. Essa discrepância entre ativos e inativos talvez possa ser mais bem explicada com base na falta de interesse na publicação de resultados negativos do que na maior capacidade de identificação de moléculas ativas, propriamente. Desses 12 sem atividade leishmanicida, 7 podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento da doença em alguns casos, como, por exemplo, o verapamil, capaz de reduzir a resistência à alguns fármacos *in vitro* (via inibição de transportadores que podem atuar como bombas de efluxo), apesar de, individualmente, não ser capaz de inibir o crescimento do parasito (KAUR; DEY, 2000; SHOKRI et al., 2012).

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

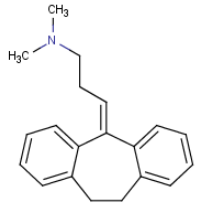
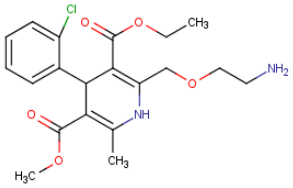
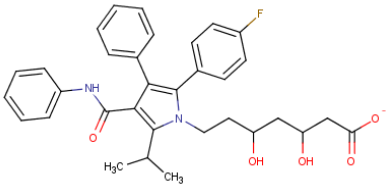
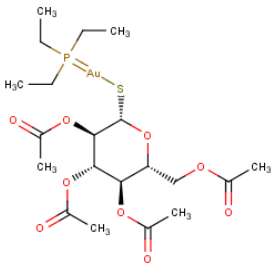
Fármacos	Observações	Referências
 **Amitriptilina**	Antidepressivos tricíclicos (ATC) já foram sugeridos como potenciais fármacos antileishmania. ATCs cujo anel central contém apenas carbono são mais potentes. CE50: 5 µM em promastigotas de *L. donovani*.	(ZILBERSTEIN; LIVEANU; GEPSTEIN, 1990; PARVEEN et al., 2005)
 **Amlodipina**	Atividade *in vitro* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. brasiliensis*) e *in vivo* (*L. donovani*). Outros compostos da mesma classe, como azelnidipina e nicardipina também apresentam atividade.	(PALIT; ALI, 2008; REIMÃO; SCOTTI; TEMPONE, 2010)
 **Atorvastatina**	Inibição de formas promastigotas de *L. donovani:* CE50 19,4 µM. Sinvastatina também inibe o crescimento de promstigotas, mas é menos potente.	(DINESH et al., 2014)
 **Auranofina**	Atividade *in vitro* (*L. major* e *L. amazonensis* com CE50, em amastigotas, de 0,07 e 0,27 µM, respectivamente) e *in vivo* (*L. major*).	(ILARI et al., 2012; SHARLOW et al., 2014)

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

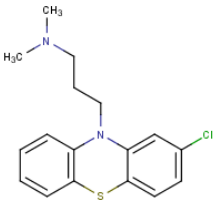
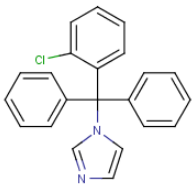
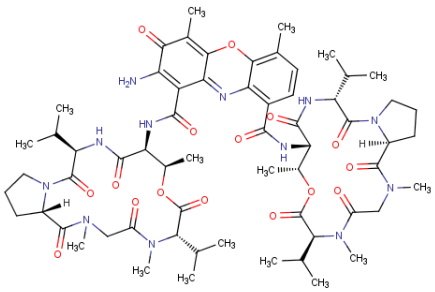
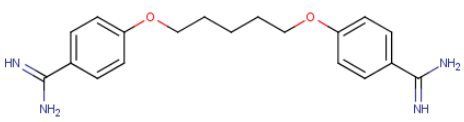
Fármacos	Observações	Referências
Cisplatina	Atividade *in vivo* (*L. infantum*, CE50 1,88 µM em amastigostas) come *in vitro* (*L. donovani*).	(TAVARES et al., 2007; KAUR et al., 2010)
 **Clorpromazina**	ATCs com atividade comprovada *in vitro* em formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. aethiopica* e *L. major*.	(PEARSON et al., 1984; EL-ON et al., 1986; LIEB, 2004)
 **Clotrimazol**	Atividade em promastigotas de *L. infantum*, CE50 2,81 µM. Outros imidazóis, como o bifonazol e o econazol também apresentam atividade, sendo o último também ativo nas formas amastigotas.	(MESQUITA et al., 2014)
 **Dactinomicina**	Atividade em promastigotas de *L. donovani*.	(REINER; KAZURA, 1982)
 **Pentamidina**	Fármaco leishmanicida utilizado na clínica.	(SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013)

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

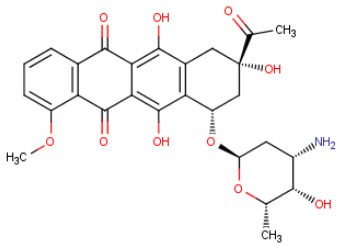
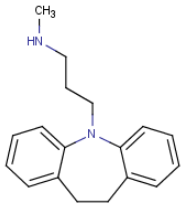
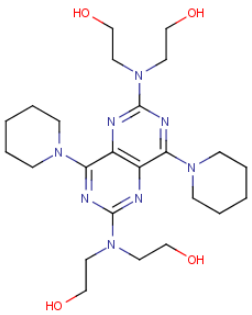
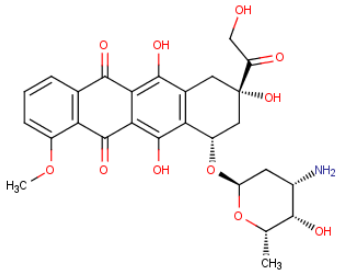
Fármacos	Observações	Referências
 **Daunorubicina**	Atividade em promastigotas de *L. tropica*. CE50 2,6 μM.	(CHIQUERO et al., 1998; KLOKOUZAS, 2003; SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2012)
 **Desipramina**	ATC com atividade *in vitro* em promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (CE50: 16,0 μM) *L. amazonensis* (CE50: 8,5 μM).	(EVANS; CROFT, 1994; MUKHERJEE et al., 2012)
 **Dipiridamol**	Inibidor de PDE com atividade em promastigotas de *L. major* (44,7 μM) e amastigotas de *L. infantum*. Outros inibidores de PDE, como o etazolato e trequinsina também possuem atividade.	(JOHNER et al., 2006; WANG et al., 2007; MALKI-FELDMAN; JAFFE, 2009; SEEBECK; STERK; KE, 2011)
 **Doxorubicina**	Atividade *in vitro* (promastigotas e amstigotas, com CE50 de 0,43 e 0,86 μM) *in vivo* em *L. donovani.*	(SETT et al., 1992; KANSAL et al., 2014)

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

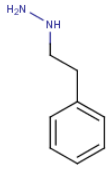
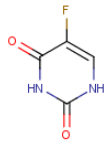
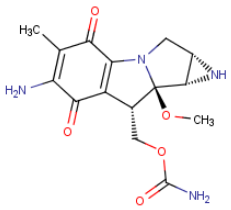
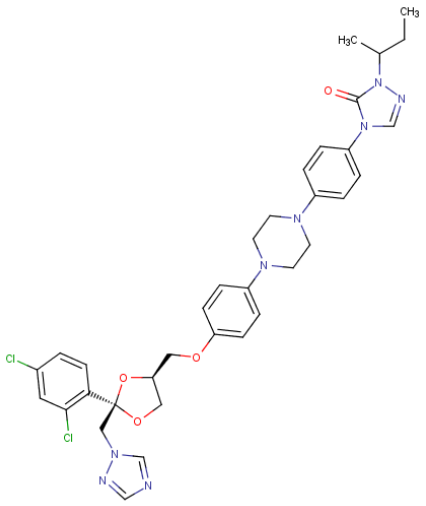
Fármacos	Observações	Referências
 **Fenelzina**	Atividade *in vitro* e *in vivo*.	(EVANS et al., 1989)
 **Fluoroacil**	Atividade em promastigotas de L. amazonensis (CE50: 4,5 µM).	(KATAKURA et al., 2004; RITT et al., 2013)
 **Mitomicina**	Atividade em promastigotas de *L. donovani*.	(REINER; KAZURA, 1982)
 **Itraconazol**	Atividade *in vitro* (CE50: 0,44 µM em promastigotas e 0,08 µM em amastigotas) e *in vivo*.	(A. ZAKAI, S. K. ZIMMO, 2000; DE MACEDO-SILVA et al., 2013)

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

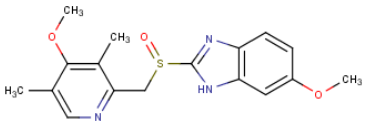
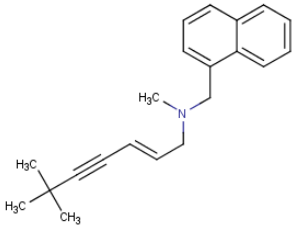
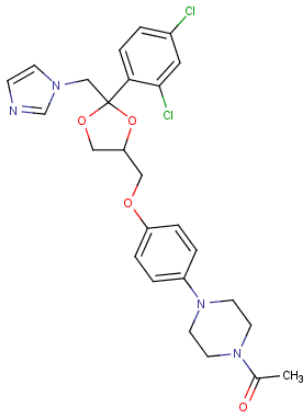
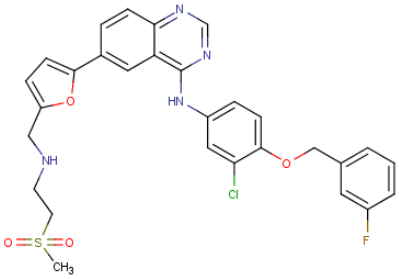
Fármacos	Observações	Referências
 **Omeprazol**	Atividade in vitro em pH ácido (redução > 90% em amastigotas e promastigotas com 150 μM). Combinação entre omeprazol e rifampicina foi efetiva no tratamento da LT *in vivo* (*L. tropica*).	(JIANG et al., 2002; KOCHAR et al., 2006)
 **Terbinafina**	Atividade *in vivo* em *L. major*. Em *L. infantum* não houve redução significativa das lesões.	(A. ZAKAI, S. K. ZIMMO, 2000; SIMÕES-MATTOS et al., 2002; MARCHINI et al., 2003)
 **Cetoconazol**	Atividade *in vivo* e *in vitro*. Utilizado na clínica em algumas regiões do mundo.	(WHO, 2010b; NAGLE et al., 2014)
 **Lapatinibe**	Atividade em amastigotas de *L. donovani*. CE50: 2,5 μM.	(SANDERSON; YARDLEY; CROFT, 2014)

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

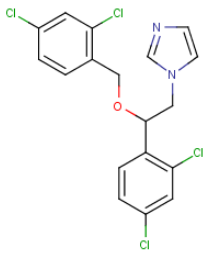
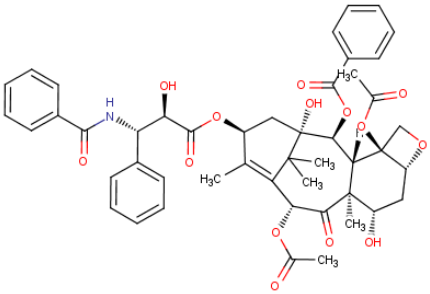
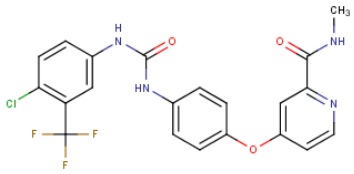
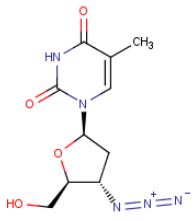
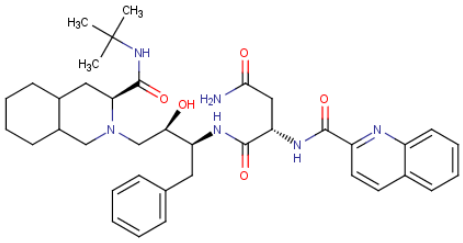
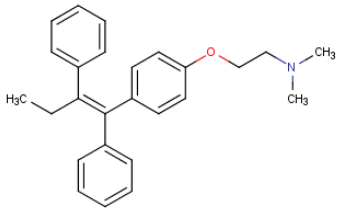
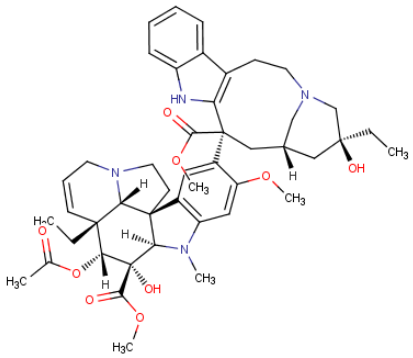
Fármacos	Observações	Referências
 **Miconazol**	CE50 de 14,43 µM em promastigotas *L. donovani* e 7,21 µM em *L. amazonensis*. Em amastigotas, CE50 de 19,23 µM. Atividade sinérgica em combinação com lovastatina *in vitro*, em amastigotas e promastigotas.	(HAUGHAN; CHANCE; GOAD, 1992)
 **Paclitaxel**	Atividade em promastigotas e amastigotas de *L. donovani in vitro*. CE50 de 1,5 µM em amastigotas.	(HAVENS et al., 2000)
 **Sorafenibe**	Atividade em amastigotas de *L. donovani*. CE50: 3,7 µM. Atividade in vitro em amastigotas de *L. amazonensis, L. major L. mexicana*.	(SANDERSON; YARDLEY; CROFT, 2014)
 **Zidovudina**	Atividade *in vitro* em promastigotas em *L. amazonensis*.	(ARAÚJO et al., 2011)

Tabela 6 - Fármacos com atividade leishmanicida identificados pela metodologia de busca por homologia.

Fármacos	Observações	Referências
 **Saquinavir**	Inibidor de protease de HIV com atividade *in vitro* em promastigotas de *L. donovani* (Inibição de 62% do crescimento celular com 25 µM) e de *L. major* (CE50 de 7 µM). Outros inibidores de protease (indinavir, ritonavir, atazanavir) também possuem atividade leishmanicida relatada *in vitro* e *in vivo*. Nelfinavir é mais pontente.	(SAVOIA; ALLICE; TOVO, 2005; TRUDEL et al., 2008; VALDIVIESO et al., 2010; DEMARCHI et al., 2012; SANTOS et al., 2013)
 **Tamoxifeno**	Atividade *in vitro* (CE50 em amastigotas: 1,9 µM. *L. braziliensis* e 2,4 µM. *L. infantum*) e *in vivo* (*L. amazonensis, L. braziliensis, L. infantum*)	(MIGUEL; YOKOYAMA-YASUNAKA; ULIANA, 2008; MIGUEL et al., 2009, 2011; EISSA; AMER; EL SAWY, 2011; TRINCONI et al., 2014)
 **Vinblastina**	Atividade *in vitro* em promastigotas (CE50 de 12 µM em *L. amazonensis*). Em *L. donovani*, o fármaco é menos tóxico ao parasito (CE50 > 100 µM).	(GUEIROS-FILHO et al., 1995; WERBOVETZ; BRENDLE; SACKETT, 1999; GIAROLA et al., 2014)

Muitos desses fármacos ativos *in vivo* e/ou *in vitro* contra *Leishmania* não são utilizados na clínica devido a sua elevada toxicidade e falta de especificidade ao parasito, e ao preço elevado. Entretanto a identificação da atividade dessas moléculas contra o protozoário sugere que novas moléculas possam ser geradas a partir desses fármacos, que sejam mais eficazes e seguras. Por exemplo, a atividade leishmanicida dos inibidores de quinases,

fármacos antineoplásicos tóxicos e de custo bastante elevado, não significa que esses fármacos serão diretamente reposicionados e utilizados na clínica para o tratamento da leishmaniose, mas indica a importância dessas proteínas na sobrevivência o parasito, o que as torna, comprovadamente, alvos moleculares atrativos para o desenvolvimento de fármacos. O mesmo raciocínio serve para as fosfodiesterases (PDE, do inglês *phosphodiesterase*) e seus inibidores.

As PDEs são enzimas expressas em diversos parasitos e possuem um alto grau de homologia com as enzimas humanas. Existem diversos exemplos de inibidores dessas enzimas em humanos, e essas moléculas são utilizadas em diversas áreas da clínica. Alguns desses compostos possuem atividade em parasitos. Como é o caso do dipiridamol, etazolato e trequinsina, com atividade leishmanicida, e a sildenafila e tadalafila, com atividade tripanossomicida (JOHNER et al., 2006; SEEBECK; STERK; KE, 2011; WANG et al., 2012; WOODRING et al., 2013).

Outro exemplo de fármaco identificado e que não teria o reposicionamento viável, mesmo que sua atividade leishmanicida fosse comprovada, é o orlistat, fármaco antiobesidade, responsável pela inibição de enzimas do metabolismo de lipídeo. Esse fármaco é administração por via oral, mas não é absorvido, exercendo sua ação diretamente na luz intestinal (MCCLENDON; RICHE; UWAIFO, 2009). Para atingir o parasito, que é intracelular no homem, o fármaco precisaria ser absorvido e atravessar diversas membranas pra poder atingi-lo.

A seleção dos *hits* encaminhados para a avaliação biológica seguiu os seguintes critérios: fármacos ainda não avaliados, de baixo custo, sem toxicidade pronunciada, estruturas químicas diferentes entre si.

5.2 Quimioinformática: desenvolvimento de modelos de QSAR

O conjunto de dados utilizado para a construção dos modelos, retirado do PubChem BioAssay, foi cuidadosamente preparado, visto que a qualidade e precisão dos dados são considerados os pontos mais importantes para o desenvolvimento de modelos preditivos, seguidos da seleção dos descritores, e, por último, o algoritmo de aprendizado de máquina (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010; YOUNG; YUAN; ZHU, 2012).

O desenvolvimento paralelo de múltiplos modelos de QSAR usando diversas combinações possíveis de diferentes tipos de descritores e vários algoritmos de aprendizado

de máquina, como foi realizado neste trabalho, tem se mostrado superior ao uso de um único modelo (ZHU et al., 2008; KUZ'MIN et al., 2009)

Quase todos os modelos individuais apresentaram valores aceitáveis de acurácia (AC) (>0,65) (LUO et al., 2014) (Tabela 3). Apesar de os valores de AC estarem adequados, os valores de kappa, uma medida de concordância entre as predições e os dados experimentais estão abaixo do recomendado. Essa métrica apresenta valores que vão de -1 a 1, e quanto menor, maior a probabilidade de aquela predição tenha ocorrido por acaso. A concordância é considerada fraca a plausível para valores < 0,40, e moderada >0,40 (excelente acima de 0,75) (ALTMAN, 1990; FLEISS; LEVIN; PAIK, 2003). Todos os modelos individuais, com exceção dos gerados com o descritor Dragon, apresentaram kappa <0,40.

Como vários modelos foram gerados, a predição por consenso foi usada calculando-se a média dos valores preditos por cada modelo, na tentativa de obter melhores valores estatísticos. Modelos consenso permitem que informações dos modelos individuais se complementem. Cada descritor converte a estrutura química da molécula em uma representação matemática diferente, e nesse processo de "tradução" informações importantes podem ser perdidas, ao fazer o consenso de modelos diferentes, pode-se, em teoria, recuperar algumas dessas informações que ajudem a explicar a atividade da molécula (KUZ'MIN et al., 2009; TROPSHA, 2010).

Apesar dessas vantagens evidentes no emprego de métodos de modelagem de QSAR em consenso, é importante ressaltar que alguns estudos (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010) mostraram que não existe necessidade de uma superabundância de modelos, e que a agregação de muitas informações podem inserir ruídos (erros) nos modelos.

Os resultados dos melhores modelos gerados por consenso (**Erro! Fonte de r eferência não encontrada.**), foram superiores aos dos modelos individuais (AC > 0,7 e kappa > 0,5). O fato de que alguns parâmetros dos modelos não serem considerados excelentes (kappa > 0,7, por exemplo) podem ser explicados por limitações intrínsecas ao conjunto de dados utilizado, como, por exemplo: as informações são provenientes de um ensaio fenotípico (a atividade biológica pode ser decorrente da interação com múltiplos alvos distintos, e as moléculas apresentam elevada diversidade estrutural), e a faixa de atividade é curta (CE50 variando entre 0,125 e 25,39 μM). Esses fatores dificultam a classificação e diferenciação entre os compostos definidos como ativos e inativos.

O principal propósito dessa análise de QSAR é a aplicação dos modelos desenvolvidos para a identificação de novos compostos com propriedades desejadas ou eliminar estruturas com propriedades desfavoráveis (CHERKASOV et al., 2014). Assim, pretende-se aplicar os

modelos gerados neste trabalho em um processo de triagem virtual (TV), utilizando como ponto de partida, uma base de dados apenas de fármacos aprovados, como, por exemplo, a NCGC *Pharmaceutical Collection* (HUANG et al., 2011). Entretanto, para aumentar a confiabilidade das predições, recomenda-se que modelos de QSAR sejam validados com um conjunto externo adicional, e randomização da variável "y" antes de serem utilizados em processos de TV (TROPSHA; GRAMATICA; GOMBAR, 2003; LUO et al., 2014)**.**

5.3 Avaliação biológica

A triagem biológica de compostos pode ser realizada, basicamente, de duas maneiras: utilizando alvos moleculares específicos e isolados, ou em ensaios fenotípicos, onde se utiliza o organismo inteiro. Nesse estudo optou-se pela realização de ensaios fenotípicos para a validação experimental *in vitro*. Esses ensaios permitem que os compostos são avaliados contra todo o organismo aumentando as chances de se identificar compostos verdadeiramente eficazes, além de poder ser mais bem sucedido na identificação de resistência em potencial (SCHENONE et al., 2013; DON; IOSET, 2014).

No caso da leishmaniose, por exemplo, a forma intracelular amastigota está localizada no interior do vacúolo parasitóforo macrófagos, onde o composto precisa penetrar para exercer sua atividade. Consequentemente, para a molécula manter a atividade, ele deve ser capaz de permear diversas membranas, e ser estável em ambiente ácido. Além disso, o composto não deve ser passível de inativação metabólica, tanto por enzimas do hospedeiro, quanto do próprio parasito. Diversos programas de P&D, como o do DNDi, por exemplo, estabeleceram a tiragem fenotípica como o processo padrão na avaliação inicial dos compostos e, de fato, a maioria NEQs descobertas para as DTNs são, de fato, provenientes de campanhas de descoberta de compostos por esse tipo de estudo (GILBERT; LEROY; FREARSON, 2011; DON; IOSET, 2014; NJOROGE et al., 2014; REGUERA et al., 2014)

As culturas *in vitro* de promastigotas de *Leishmania* relativamente fáceis de manusear, mas essa forma representa o estágio do inseto no ciclo de vida do parasito, de pouco intresse quando se tem como o objetivo a identificação de compostos que possam ser utilizados no tratamento da doença em humanos. Além disso, tem sido sugerido que apenas 4% das moléculas ativas em promastigotas tem efeito sobre a forma amastigota intracelular (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Dessa maneira, os ensaios fenotípicos realizados em amastigosta são os métodos mais adequados. Culturas axênicas de amastigotas estão disponíveis e são de mais fácil manuseio e cultivo, quando comparadas a cultura de

amastigotas intracelulares, entretanto, já foi comprovado que essas formas apresentam muitas diferenças com relação ao nível de expressão de diversas proteínas (HOLZER; MCMASTER; FORNEY, 2006; BUSTAMANTE et al., 2011). Assim, ensaios fenotípicos devem ser, também, realizados nas formas amastigotas intracelulares (REGUERA et al., 2014).

A opção por realizar a avaliação e validação experimental dos compostos selecionados nesse estudo em ensaios fenotípicos contempla também todos os alvos potenciais sugeridos presentes (é possivel, entretanto, que algum desses alvos não tenha expressão significativa, por exemplo), além de outros possíveis (BEGHYN et al., 2011; NJOROGE et al., 2014).

A utilização do MTT para a avaliação *in vitro* da atividade de compostos em *Leishmania* está amplamente descrita na literatura (TEMPONE; TANIWAKI; REIMÃO, 2009; ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010; MOURA DO CARMO et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2012; REIMÃO et al., 2014; DUTRA et al., 2014). O resultado final, com CE50 de μM para a pentamidina, fármaco padrão, está dentro do que é geralmente descrito quando as mesmas condições são utilizadas (TEMPONE; TANIWAKI; REIMÃO, 2009).

Dos cinco fármacos avaliados (lansoprazol, ibuprofeno, sertaconzol, nilutamida e clomifeno), três apresentaram atividade (mais de 50% de morte dos parasitos) na triagem biológica com 100 μM do compostos. Esses fármacos (ibuprofeno, sertaconzol, e clomifeno) foram encaminhados para determinação da concentração efetiva em 50%. Ibuprofeno apresentou CE50 de 55,08 μM . A CE50 do clomifeno 5,75 μM ficou abaixo da CE50 da pentamidina (7,24), fármaco padrão, sugerindo um potencial de atividade interessante. Para o sertaconazol a CE50 não foi ainda determinada, mas na concentração de 15 μM todas as leishmânias encontravam-se inviáveis.

O próximo passo é a avaliação de compostos selecionados em formas amastigotas, etapa essencial para confirmar essas atividades na forma de maior interesse para o desenvolvimento/reposicionamento de fármacos. Os fármacos selecionados pela estratégia de busca por homologia serão avaliados *in vitro*, em promastigotas e amastigotas de *L. infantum* no Instituto Adolfo Lutz (IAL - SP), sob a supervisão do Dr. André Tempone, em estágio a ser desenvolvido em Fevereiro/2015.

6 CONCLUSÃO

- A estratégia de busca por homologia permitiu a identificação de 36 novos possíveis alvos moleculares, que precisam ser validados experimentalmente, e de fármacos com potencial atividade leishmanicida que ainda não foram avaliados experimentalmente.
- A utilização de diferentes combinações de descritores e aprendizados de máquina, e de consensos, permitiu a criação de modelos de QSAR binários com parâmetros estatísticos confiáveis.
- Os melhores modelos de QSAR passarão por validação externa adicional, e serão utilizados como filtros em processo de triagem virtual.
- Ensaios *in vitro* na forma promastigota de *L. amazonensis* foram padronizados, e utilizados na avaliação de cinco compostos selecionados.
- Três compostos apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigota, sendo um deles (clomifeno) mais potente que o fármaco padrão.
- Os fármacos serão avaliados contra formas amastigotas e, se confirmadas as atividades, podem ser pontos de partida importantes para o reposicionamento desses compostos.

REFERÊNCIAS

A. ZAKAI, S. K. ZIMMO, H. Effects of itraconazole and terbinafine on Leishmania major lesions in BALB/c mice. **Annals of Tropical Medicine And Parasitology**, v. 94, n. 8, p. 787–791, 2000.

ADEUSI, S. O. **Pharmaceutical R&D : an organizational design approach to enhancing productivity**. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 2011.

AGUIAR-PULIDO, V.; GESTAL, M.; CRUZ-MONTEAGUDO, M.; RABUÑAL, J. R.; DORADO, J.; MUNTEANU, C. R. Evolutionary computation and QSAR research. **Current computer-aided drug design**, v. 9, n. 2, p. 206–225, 2013.

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research**. 1st. ed. Londres: Chapman and Hall/CRC, 1990.

ARAÚJO, C. A; ARAÚJO, A. A; BATISTA, C. L.; OLIVEIRA, M. A P.; OLIVEIRA, V.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C.; BEZERRA, J. C. B. Morphological alterations and growth inhibition of Leishmania (L.)amazonensis promastigotes exposed to zidovudine (AZT). **Parasitology research**, v. 108, n. 3, p. 547–551, 2011.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.

AUBÉ, J. Drug repurposing and the medicinal chemist. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 6, p. 442–444, 2012.

BAHIA, D.; OLIVEIRA, L. M.; LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; SILVEIRA, J. F. DA; MORTARA, R. A.; RUIZ, J. C. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania major, Leishmania braziliensis and Leishmania infantum--new tools for designing specific inhibitors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 390, n. 3, p. 963–970, 2009.

BAJORATH, J. Computational chemistry in pharmaceutical research: at the crossroads. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, n. 1, p. 11–12, 2012.

BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1–109, 2007.

BEGHYN, T. B.; CHARTON, J.; LEROUX, F.; LACONDE, G.; BOURIN, A.; COS, P.; MAES, L.; DEPREZ, B. Drug to genome to drug: discovery of new antiplasmodial compounds. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3222–3240, 2011.

BEVERLEY, S. M. Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 1, p. 11–19, 2003.

BEYRER, C.; VILLAR, J. C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S. D.; MILLS, E. J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. **Lancet**, v. 370, n. 9587, p. 619–627, 2007.

BISPO, N. A.; CULLETON, R.; SILVA, L. A.; CRAVO, P. A systematic in silico search for target similarity identifies several approved drugs with potential activity against the Plasmodium falciparum apicoplast. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59288, 2013.

BLEICHER, K. H.; BÖHM, H.-J.; MÜLLER, K.; ALANINE, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 5, p. 369–378, 2003.

BOITZ, J. M.; ULLMAN, B. A conditional mutant deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of Leishmania donovani. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 23, p. 16084–16089, 2006.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 2006: [s.n.].

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: [s.n.].

BRASIL. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução de letalidade**. Brasília, DF: [s.n.].

BREDEL, M.; JACOBY, E. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 4, p. 262–275, 2004.

BROOKER, S.; AKHWALE, W.; PULLAN, R.; ESTAMBALE, B.; CLARKE, S. E.; SNOW, R. W.; HOTEZ, P. J. Epidemiology of plasmodium-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6 Suppl, p. 88–98, 2007.

BUCHWALD, P.; BODOR, N. Computer-aided drug design: the role of quantitative structure-property, structure-activity and structure-metabolism relationships (QSPR, QSAR, QSMR). **Drugs of the Future**, v. 27, n. 6, p. 577, 2002.

BURROWS, J. N.; ELLIOTT, R. L.; KANEKO, T.; MOWBRAY, C. E.; WATERSON, D. The role of modern drug discovery in the fight against neglected and tropical diseases. **MedChemComm**, v. 5, n. 6, p. 688, 2014.

BUSTAMANTE, J. M.; PARK, H. J.; TARLETON, R. L.; THE CHAGAS DRUG DISCOVERY CONSORTIUM. Report of the 2nd Chagas Drug Discovery Consortium meeting, held on 3 November 2010; Atlanta GA, USA. **Expert opinion on drug discovery**, v. 6, n. 9, p. 965–973, 2011.

CAFFREY, C. R.; ROHWER, A.; OELLIEN, F.; MARHÖFER, R. J.; BRASCHI, S.; OLIVEIRA, G.; MCKERROW, J. H.; SELZER, P. M. A comparative chemogenomics strategy to predict potential drug targets in the metazoan pathogen, Schistosoma mansoni. **PloS one**, v. 4, n. 2, p. e4413, 2009.

CHATELAIN, E.; IOSET, J.-R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug design, development and therapy**, v. 5, p. 175–181, 2011.

CHERKASOV, A.; MURATOV, E. N.; FOURCHES, D.; VARNEK, A.; BASKIN, I. I.; CRONIN, M.; DEARDEN, J.; GRAMATICA, P.; MARTIN, Y. C.; TODESCHINI, R.; CONSONNI, V.; KUZ'MIN, V. E.; CRAMER, R.; BENIGNI, R.; YANG, C.; RATHMAN, J.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J.; RICHARD, A.; TROPSHA, A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977–5010, 2014.

CHIQUERO, M. J.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; O'VALLE, F.; GONZÁLEZ-ROS, J. M.; DEL MORAL, R. G.; FERRAGUT, J. A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Altered Drug Membrane Permeability in a Multidrug-Resistant Leishmania tropica Line. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 131–139, 1998.

CHUNGE, C. N.; OWATE, J.; PAMBA, H. O.; DONNO, L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 221–225, 1990.

CLARK, P. M.; DAWANY, N.; DAMPIER, W.; BYERS, S. W.; PESTELL, R. G.; TOZEREN, A. Bioinformatics analysis reveals transcriptome and microRNA signatures and drug repositioning targets for IBD and other autoimmune diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 12, p. 2315–2333, 2012.

COHEN, C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996.

CRAMER, R. D. **The inevitable QSAR renaissanceJournal of Computer-Aided Molecular Design**, 2012.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against Leishmania donovani , Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1041–1047, 1996.

CROWTHER, G. J.; SHANMUGAM, D.; CARMONA, S. J.; DOYLE, M. A; HERTZ-FOWLER, C.; BERRIMAN, M.; NWAKA, S.; RALPH, S. A; ROOS, D. S.; VAN VOORHIS, W. C.; AGÜERO, F. Identification of attractive drug targets in neglected-disease pathogens using an in silico approach. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e804, 2010.

DE BENEDETTI, P. G.; FANELLI, F. Computational quantum chemistry and adaptive ligand modeling in mechanistic QSAR. **Drug discovery today**, v. 15, n. 19-20, p. 859–866, 2010.

DE MACEDO-SILVA, S. T.; URBINA, J. A; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against Leishmania amazonensis. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83247, 2013.

DE OLIVEIRA, A.; MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. G.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from Piper malacophyllum is related to plasma membrane disruption. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 3, p. 383–387, 2012.

DEMARCHI, I. G.; SILVEIRA, T. G. V; FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C. Effect of HIV protease inhibitors on New World Leishmania. **Parasitology international**, v. 61, n. 4, p. 538–544, 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 97 Suppl 1, p. 3–15, 2003.

DINESH, N.; SREE, D.; PALLERLA, R.; KAUR, P. K.; BABU, N. K.; SINGH, S. Microbial Pathogenesis Exploring Leishmania donovani 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) as a potential drug target by biochemical , biophysical and inhibition studies. **Microbial Pathogenesis**, v. 66, p. 14–23, 2014.

DOERIG, C.; TOBIN, A. B. Parasite protein kinases: at home and abroad. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 4, p. 305–307, 2010.

DON, R.; IOSET, J.-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014.

DONOVICK, R.; GOLD, W.; PAGANO, J. F.; STOUT, H. A. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. **Antibiotics annual**, v. 3, p. 579–586, 1956.

DREWES, G. Chemical proteomics in drug discovery. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 803, p. 15–21, 2012.

DUDEK, A. Z.; ARODZ, T.; GÁLVEZ, J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 9, n. 3, p. 213–228, 2006.

DUFFY, B. C.; ZHU, L.; DECORNEZ, H.; KITCHEN, D. B. Early phase drug discovery: Cheminformatics and computational techniques in identifying lead series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 18, p. 5324–5342, 2012a.

DUFFY, B. C.; ZHU, L.; DECORNEZ, H.; KITCHEN, D. B. Early phase drug discovery: cheminformatics and computational techniques in identifying lead series. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 18, p. 5324–5342, 2012b.

DUJARDIN, J. Structure, dynamics and function of Leishmania genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? **Infection genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, p. 290–297, 2009.

DUNCAN, R.; GANNAVARAM, S.; DEY, R.; DEBRABANT, A.; LAKHAL-NAOUAR, I.; NAKHASI, H. L. Identification and characterization of genes involved in leishmania pathogenesis: the potential for drug target selection. **Molecular biology international**, v. 2011, p. 428486, 2011.

DUTRA, L. A.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. A E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. A S.; DOS SANTOS, J. L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119–122, 2005.

EISSA, M. M.; AMER, E. I.; EL SAWY, S. M. F. Leishmania major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 128, n. 4, p. 382–390, 2011.

EKINS, S.; WILLIAMS, A. J.; KRASOWSKI, M. D.; FREUNDLICH, J. S. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug discovery today**, v. 16, n. 7-8, p. 298–310, 2011.

ELEBRING, T.; GILL, A.; PLOWRIGHT, A. T. **What is the most important approach in current drug discovery: Doing the right things or doing things right?Drug Discovery Today**, 2012.

EL-ON, J.; RUBINSTEIN, N.; KERNBAUM, S.; SCHNUR, L. F. In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of chlorpromazine alone and combined with N-meglumine antimonate. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 80, n. 5, p. 509–517, 1986.

EVANS, A. T.; CROFT, S. L. Antileishmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity. **Biochemical pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 613–616, 1994.

EVANS, A. T.; CROFT, S. L.; PETERS, W.; NEAL, R. A. Hydrazide antidepressants possess novel antileishmanial activity in vitro and in vivo. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 83, n. 1, p. 19–24, 1989.

FLEISS, J. L.; LEVIN, B.; PAIK, M. C. **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 3rd. ed. Londres: Wiley-Interscience, 2003.

FLÓREZ, A. F.; PARK, D.; BHAK, J.; KIM, B.-C.; KUCHINSKY, A.; MORRIS, J. H.; ESPINOSA, J.; MUSKUS, C. Protein network prediction and topological analysis in Leishmania major as a tool for drug target selection. **BMC bioinformatics**, v. 11, p. 484, 2010.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2010.

FRECER, V.; MEGNASSAN, E.; MIERTUS, S. Design and in silico screening of combinatorial library of antimalarial analogs of triclosan inhibiting Plasmodium falciparum enoyl-acyl carrier protein reductase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 7, p. 3009–3019, 2009.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International journal for parasitology: Drugs and drug resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012.

FUERTES, M. A; NGUEWA, P. A; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 433–439, 2008.

FURTADO, T. A.; CISALPINO, E. O.; SANTOS, U. M. In vitro studies of the effect of amphotericin B on Leishmania brasiliensis. **Antibiotica et chemotherapia. Fortschritte. Advances. Progrès**, v. 10, p. 692–693, 1960.

GALETIN, A.; GERTZ, M.; HOUSTON, J. B. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 25, n. 1, p. 28–47, 2010.

GASHAW, I.; ELLINGHAUS, P.; SOMMER, A.; ASADULLAH, K. **What makes a good drug target?Drug Discovery Today**, 2011a.

GASHAW, I.; ELLINGHAUS, P.; SOMMER, A.; ASADULLAH, K. What makes a good drug target? **Drug discovery today**, v. 16, n. 23-24, p. 1037–1043, 2011b.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. (Ed.). . **Pasitologia Humana**. 11. ed. ed.São Paulo: Atheneu, 2005. p. 47–64.

GIAROLA, N. L. L.; SILVEIRA, T. S.; INACIO, J. D. F.; VIEIRA, L. P.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; MEYER-FERNANDES, J. R. Leishmania amazonensis: Increase in ecto-ATPase activity and parasite burden of vinblastine-resistant protozoa. **Experimental parasitology**, v. 146, p. 25–33, 2014.

GILBERT, I. H.; LEROY, D.; FREARSON, J. A. Finding new hits in neglected disease projects: target or phenotypic based screening? **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1284–1291, 2011.

GOODWIN, L. G. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 339–341, 1995.

GRAMATICA, P.; PILUTTI, P.; PAPA, E. Validated QSAR prediction of OH tropospheric degradation of VOCs: splitting into training-test sets and consensus modeling. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 5, p. 1794–1802, 2004.

GUEIROS-FILHO, F. J.; VIOLA, J. P.; GOMES, F. C.; FARINA, M.; LINS, U.; BERTHO, A. L.; WIRTH, D. F.; LOPES, U. G. Leishmania amazonensis: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a Leishmania mdr1 gene. **Experimental parasitology**, v. 81, n. 4, p. 480–490, 1995.

GUERRA, J. A. DE O.; PRESTES, S. R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L. I. DE A. R. C.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M. DAS G. V.; FERREIRA, L. C. DE L. Mucosal Leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, 2011.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2008.

GUPTA, S.; YARDLEY, V.; VISHWAKARMA, P.; SHIVAHARE, R.; SHARMA, B.; LAUNAY, D.; MARTIN, D.; PURI, S. K. Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2014.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular biology international**, v. 2011, p. 571242, 2011.

HANSCH, C.; FUJITA, T. p -σ-π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1616–1626, 1964.

HAUGHAN, P. A.; CHANCE, M. L.; GOAD, L. J. Synergism in vitro of lovastatin and miconazole as anti-leishmanial agents. **Biochemical pharmacology**, v. 44, n. 11, p. 2199–2206, 1992.

HAVENS, C. G.; BRYANT, N.; ASHER, L.; LAMOREAUX, L.; PERFETTO, S.; BRENDLE, J. J.; WERBOVETZ, K. A. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on L. donovani. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 110, n. 2, p. 223–236, 2000.

HOLZER, T. R.; MCMASTER, W. R.; FORNEY, J. D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in Leishmania mexicana. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 146, n. 2, p. 198–218, 2006.

HOPFINGER, A. J.; WANG, S.; TOKARSKI, J. S.; JIN, B.; ALBUQUERQUE, M.; MADHAV, P. J.; DURAISWAMI, C. Construction of 3D-QSAR Models Using the 4D-QSAR Analysis Formalism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 43, p. 10509–10524, 1997.

HUANG, R.; SOUTHALL, N.; WANG, Y.; YASGAR, A.; SHINN, P.; JADHAV, A.; NGUYEN, D.-T.; AUSTIN, C. P. The NCGC pharmaceutical collection: a comprehensive resource of clinically approved drugs enabling repurposing and chemical genomics. **Science translational medicine**, v. 3, n. 80, p. 80ps16, 2011.

ILARI, A.; BAIOCCO, P.; MESSORI, L.; FIORILLO, A.; BOFFI, A.; GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T.; COLOTTI, G. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from Leishmania infantum in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. **Amino acids**, v. 42, n. 2-3, p. 803–811, 2012.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M.-A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M. R.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MÜLLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHÄFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B.; MYLER, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JAKOBSEN, P. H.; WANG, M.-W.; NWAKA, S. Innovative partnerships for drug discovery against neglected diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 9, p. e1221, 2011.

JIANG, S.; MEADOWS, J.; ANDERSON, S. A.; MUKKADA, A. J. Antileishmanial Activity of the Antiulcer Agent Omeprazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2569–2574, 2002.

JIN, G.; WONG, S. T. C. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. **Drug discovery today**, v. 19, n. 5, p. 637–644, 2014.

JOHNER, A.; KUNZ, S.; LINDER, M.; SHAKUR, Y.; SEEBECK, T. Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of Leishmania major. **BMC microbiology**, v. 6, p. 25, 2006.

JOMAA, H.; WIESNER, J.; SANDERBRAND, S.; ALTINCICEK, B.; WEIDEMEYER, C.; HINTZ, M.; TÜRBACHOVA, I.; EBERL, M.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H. K.; SOLDATI, D.; BECK, E. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5433, p. 1573–1576, 1999.

JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5665, p. 1813–1818, 2004.

KANSAL, S.; TANDON, R.; VERMA, A; MISRA, P.; CHOUDHARY, A K.; VERMA, R.; VERMA, P. R. P.; DUBE, A; MISHRA, P. R. Coating doxorubicin-loaded nanocapsules with alginate enhances therapeutic efficacy against Leishmania in hamsters by inducing Th1-type immune responses. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 17, p. 4038–4050, 2014.

KATAKURA, K.; FUJISE, H.; TAKEDA, K.; KANEKO, O.; TORII, M.; SUZUKI, M.; CHANG, K. P.; HASHIGUCHI, Y. Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in Leishmania amazonensis. **FEBS letters**, v. 561, n. 1-3, p. 207–212, 2004.

KAUR, J.; DEY, C. S. Putative P-glycoprotein expression in arsenite-resistant Leishmania donovani down-regulated by verapamil. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 271, n. 3, p. 615–619, 2000.

KAUR, S.; SACHDEVA, H.; DHURIA, S.; SHARMA, M.; KAUR, T. Parasitology International Antileishmanial effect of cisplatin against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 59, n. 1, p. 62–69, 2010.

KEISER, M. J.; SETOLA, V.; IRWIN, J. J.; LAGGNER, C.; ABBAS, A. I.; HUFEISEN, S. J.; JENSEN, N. H.; KUIJER, M. B.; MATOS, R. C.; TRAN, T. B.; WHALEY, R.; GLENNON, R. A; HERT, J.; THOMAS, K. L. H.; EDWARDS, D. D.; SHOICHET, B. K.; ROTH, B. L. Predicting new molecular targets for known drugs. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 175–181, 2009.

KIKUTH, W.; SCHMIDT, H. Contribution to the progress of antimony therapy of kala-azar. **Chinese Medical Journal**, v. 52, p. 425–432, 1937.

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

KLINKERT, M.-Q.; HEUSSLER, V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 2, p. 131–143, 2006.

KLOKOUZAS, A. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 301–317, 2003.

KOCHAR, D. K.; SAINI, G.; KOCHAR, S. K.; SIROHI, P.; BUMB, R. A.; MEHTA, R. D.; PUROHIT, S. K. A double blind, randomised placebo controlled trial of rifampicin with omeprazole in the treatment of human cutaneous leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 43, n. 4, p. 161–167, 2006.

KUBINYI, H. **QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1993.

KUBINYI, H. Chemogenomics in drug discovery. **Ernst Schering Research Foundation workshop**, n. 58, p. 1–19, 2006.

KUMAR, P.; LODGE, R.; TRUDEL, N.; OUELLET, M.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. J. Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in Leishmania amastigotes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e642, 2010.

KUZ'MIN, V. E.; ARTEMENKO, A G.; MURATOV, E. N. Hierarchical QSAR technology based on the Simplex representation of molecular structure. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 22, n. 6-7, p. 403–421, 2008.

KUZ'MIN, V. E.; MURATOV, E. N.; ARTEMENKO, A. G.; VARLAMOVA, E. V.; GORB, L.; WANG, J.; LESZCZYNSKI, J. Consensus QSAR Modeling of Phosphor-Containing Chiral AChE Inhibitors. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 6-7, p. 664–677, 2009.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; MCMASTER, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35–46, 2007.

LELL, B.; RUANGWEERAYUT, R.; WIESNER, J.; MISSINOU, M. A.; SCHINDLER, A.; BARANEK, T.; HINTZ, M.; HUTCHINSON, D.; JOMAA, H.; KREMSNER, P. G. Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 735–738, 2003.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2060–2071, 2011.

LIEB, J. The immunostimulating and antimicrobial properties of lithium and antidepressants. **The Journal of infection**, v. 49, n. 2, p. 88–93, 2004.

LIESE, B. H.; SCHUBERT, L. Official development assistance for health-how neglected are neglected tropical diseases? An analysis of health financing. **International health**, v. 1, n. 2, p. 141–147, 2009.

LIU, Z.; FANG, H.; REAGAN, K.; XU, X.; MENDRICK, D. L.; SLIKKER, W.; TONG, W. In silico drug repositioning: what we need to know. **Drug discovery today**, v. 18, n. 3-4, p. 110–115, 2013.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.

LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D. H.; BELL, M. L.; BENJAMIN, E. J.; BENNETT, D.; BHALLA, K.; BIKBOV, B.; BIN ABDULHAK, A.; BIRBECK, G.; BLYTH, F.; BOLLIGER, I.; BOUFOUS, S.; BUCELLO, C.; BURCH, M.; BURNEY, P.; CARAPETIS, J.; CHEN, H.; CHOU, D.; CHUGH, S. S.; COFFENG, L. E.; COLAN, S. D.; COLQUHOUN, S.; COLSON, K. E.; CONDON, J.; CONNOR, M. D.; COOPER, L. T.; CORRIERE, M.; CORTINOVIS, M.; DE VACCARO, K. C.; COUSER, W.; COWIE, B. C.; CRIQUI, M. H.; CROSS, M.; DABHADKAR, K. C.; DAHODWALA, N.; DE LEO, D.; DEGENHARDT, L.; DELOSSANTOS, A.; DENENBERG, J.; DES JARLAIS, D. C.; DHARMARATNE, S. D.; DORSEY, E. R.; DRISCOLL, T.; DUBER, H.; EBEL, B.; ERWIN, P. J.; ESPINDOLA, P.; EZZATI, M.; FEIGIN, V.; FLAXMAN, A. D.; FOROUZANFAR, M. H.; FOWKES, F. G. R.; FRANKLIN, R.; FRANSEN, M.; FREEMAN, M. K.; GABRIEL, S. E.; GAKIDOU, E.; GASPARI, F.; GILLUM, R. F.; GONZALEZ-MEDINA, D.; HALASA, Y. A.; HARING, D.; HARRISON, J. E.; HAVMOELLER, R.; HAY, R. J.; HOEN, B.; HOTEZ, P. J.; HOY, D.; JACOBSEN, K. H.; JAMES, S. L.; JASRASARIA, R.; JAYARAMAN, S.; JOHNS, N.; KARTHIKEYAN, G.; KASSEBAUM, N.; KEREN, A.; KHOO, J.-P.; KNOWLTON, L. M.; KOBUSINGYE, O.; KORANTENG, A.; KRISHNAMURTHI, R.; LIPNICK, M.; LIPSHULTZ, S. E.; OHNO, S. L.; MABWEIJANO, J.; MACINTYRE, M. F.; MALLINGER, L.; MARCH, L.; MARKS, G. B.; MARKS, R.; MATSUMORI, A.; MATZOPOULOS, R.; MAYOSI, B. M.; MCANULTY, J. H.; MCDERMOTT, M. M.; MCGRATH, J.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MICHAUD, C.; MILLER, M.; MILLER, T. R.; MOCK, C.; MOCUMBI, A. O.; MOKDAD, A. A.; MORAN, A.; MULHOLLAND, K.; NAIR, M.

N.; NALDI, L.; NARAYAN, K. M. V.; NASSERI, K.; NORMAN, P.; O'DONNELL, M.; OMER, S. B.; ORTBLAD, K.; OSBORNE, R.; OZGEDIZ, D.; PAHARI, B.; PANDIAN, J. D.; RIVERO, A. P.; PADILLA, R. P.; PEREZ-RUIZ, F.; PERICO, N.; PHILLIPS, D.; PIERCE, K.; POPE, C. A.; PORRINI, E.; POURMALEK, F.; RAJU, M.; RANGANATHAN, D.; REHM, J. T.; REIN, D. B.; REMUZZI, G.; RIVARA, F. P.; ROBERTS, T.; DE LEÓN, F. R.; ROSENFELD, L. C.; RUSHTON, L.; SACCO, R. L.; SALOMON, J. A.; SAMPSON, U.; SANMAN, E.; SCHWEBEL, D. C.; SEGUI-GOMEZ, M.; SHEPARD, D. S.; SINGH, D.; SINGLETON, J.; SLIWA, K.; SMITH, E.; STEER, A.; TAYLOR, J. A.; THOMAS, B.; TLEYJEH, I. M.; TOWBIN, J. A.; TRUELSEN, T.; UNDURRAGA, E. A.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VIJAYAKUMAR, L.; VOS, T.; WAGNER, G. R.; WANG, M.; WANG, W.; WATT, K.; WEINSTOCK, M. A.; WEINTRAUB, R.; WILKINSON, J. D.; WOOLF, A. D.; WULF, S.; YEH, P.-H.; YIP, P.; ZABETIAN, A.; ZHENG, Z.-J.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; ALMAZROA, M. A.; MEMISH, Z. A. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012.

LUO, M.; WANG, X. S.; ROTH, B. L.; GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Application of quantitative structure-activity relationship models of 5-HT1A receptor binding to virtual screening identifies novel and potent 5-HT1A ligands. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 2, p. 634–647, 2014.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L. H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A. T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R. S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E. M. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MALKI-FELDMAN, L.; JAFFE, C. L. Leishmania major: effect of protein kinase A and phosphodiesterase activity on infectivity and proliferation of promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 123, n. 1, p. 39–44, 2009.

MANLY, C. J.; LOUISE-MAY, S.; HAMMER, J. D. The impact of informatics and computational chemistry on synthesis and screening. **Drug discovery today**, v. 6, n. 21, p. 1101–1110, 2001.

MARCHINI, J. F. M.; CRUZ, A. K.; BEVERLEY, S. M.; TOSI, L. R. O. The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in Leishmania major. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 131, n. 1, p. 77–81, 2003.

MAY, R. M. Parasites, people and policy: infectious diseases and the Millennium Development Goals. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 10, p. 497–503, 2007.

MCCLENDON, K. S.; RICHE, D. M.; UWAIFO, G. I. Orlistat: current status in clinical therapeutics. **Expert opinion on drug safety**, v. 8, n. 6, p. 727–744, 2009.

MELVILLE, J. L.; BURKE, E. K.; HIRST, J. D. Machine learning in virtual screening. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 12, n. 4, p. 332–343, 2009.

MESQUITA, J. T.; DA COSTA-SILVA, T. A.; BORBOREMA, S. E. T.; TEMPONE, A. G. Activity of imidazole compounds on Leishmania (L.) infantum chagasi: reactive oxygen species induced by econazole. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 389, n. 1-2, p. 293–300, 2014.

MESSORI, A.; FADDA, V.; MARATEA, D.; TRIPPOLI, S.; MARINAI, C. Nephrotoxicity of different formulations of amphotericin B: summarizing evidence by network meta-analysis. **Clinical infectious**

diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 57, n. 12, p. 1783–1784, 2013.

MESTRE-FERRANDIZ, J.; SUSSEX, J.; TOWSE, A. **The R&D Cost of a New Medicine**. London: Office of Health Economics, 2012.

MIAO, Q.; ZHANG, C.-C.; KAST, J. Chemical proteomics and its impact on the drug discovery process. **Expert review of proteomics**, v. 9, n. 3, p. 281–291, 2012.

MICHALICK, M. S. M. Gênero Leishmania. In: DAVID PEREIRA NEVES (Ed.). . **Pasitologia Humana**. 11. ed ed.São Paulo: Atheneu, 2005. p. 41–46.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P. (Ed.). . **Pasitologia Humana**. 11. ed. ed.São Paulo: Atheneu, 2005. p. 67–83.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen is effective in the treatment of Leishmania amazonensis infections in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 6, p. e249, 2008.

MIGUEL, D. C.; ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi infections. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 365–368, 2009.

MIGUEL, D. C.; ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; PEREIRA, L. I. A; JERÔNIMO, S. M. B.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. B. Clinical isolates of New World Leishmania from cutaneous and visceral leishmaniasis patients are uniformly sensitive to tamoxifen. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 1, p. 93–94, 2011.

MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; KAMALI-SARVESTANI, E. Leishmania major: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 3, p. 422–429, 2008.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A.-L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS medicine**, v. 6, n. 2, p. e30, 2009.

MOURA DO CARMO, D. F.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, J. R. D. A. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of Piper species. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 2, p. 1819–1829, 2012.

MUKHERJEE, S.; MUKHERJEE, B.; MUKHOPADHYAY, R.; NASKAR, K.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J. C.; DAS, A. K.; ROY, S. Imipramine is an orally active drug against both antimony sensitive and resistant Leishmania donovani clinical isolates in experimental infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 12, p. e1987, 2012.

MURATOV, E. N.; ARTEMENKO, A. G.; VARLAMOVA, E. V; POLISCHUK, P. G.; LOZITSKY, V. P.; FEDCHUK, A. S.; LOZITSKA, R. L.; GRIDINA, T. L.; KOROLEVA, L. S.; SIL'NIKOV, V. N.; GALABOV, A. S.; MAKAROV, V. A.; RIABOVA, O. B.; WUTZLER, P.; SCHMIDTKE, M.; KUZ'MIN, V. E. Per aspera ad astra: application of Simplex QSAR approach in antiviral research. **Future medicinal chemistry**, v. 2, n. 7, p. 1205–1226, 2010.

MURRAY, C. J. L.; VOS, T.; LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FLAXMAN, A. D.; MICHAUD, C.; EZZATI, M.; SHIBUYA, K.; SALOMON, J. A.; ABDALLA, S.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ACKERMAN, I.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALI, M. K.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BAHALIM, A. N.; BARKER-COLLO, S.; BARRERO, L. H.; BARTELS, D. H.; BASÁÑEZ, M.-G.; BAXTER, A.; BELL, M. L.; BENJAMIN, E. J.; BENNETT, D.; BERNABÉ, E.; BHALLA, K.; BHANDARI, B.; BIKBOV, B.; BIN ABDULHAK, A.; BIRBECK, G.; BLACK, J. A.; BLENCOWE, H.; BLORE, J. D.; BLYTH, F.; BOLLIGER, I.; BONAVENTURE, A.; BOUFOUS, S.; BOURNE, R.; BOUSSINESQ, M.; BRAITHWAITE, T.; BRAYNE, C.; BRIDGETT, L.; BROOKER, S.; BROOKS, P.; BRUGHA, T. S.; BRYAN-HANCOCK, C.; BUCELLO, C.; BUCHBINDER, R.; BUCKLE, G.; BUDKE, C. M.; BURCH, M.; BURNEY, P.; BURSTEIN, R.; CALABRIA, B.; CAMPBELL, B.; CANTER, C. E.; CARABIN, H.; CARAPETIS, J.; CARMONA, L.; CELLA, C.; CHARLSON, F.; CHEN, H.; CHENG, A. T.-A.; CHOU, D.; CHUGH, S. S.; COFFENG, L. E.; COLAN, S. D.; COLQUHOUN, S.; COLSON, K. E.; CONDON, J.; CONNOR, M. D.; COOPER, L. T.; CORRIERE, M.; CORTINOVIS, M.; DE VACCARO, K. C.; COUSER, W.; COWIE, B. C.; CRIQUI, M. H.; CROSS, M.; DABHADKAR, K. C.; DAHIYA, M.; DAHODWALA, N.; DAMSERE-DERRY, J.; DANAEI, G.; DAVIS, A.; DE LEO, D.; DEGENHARDT, L.; DELLAVALLE, R.; DELOSSANTOS, A.; DENENBERG, J.; DERRETT, S.; DES JARLAIS, D. C.; DHARMARATNE, S. D.; DHERANI, M.; DIAZ-TORNE, C.; DOLK, H.; DORSEY, E. R.; DRISCOLL, T.; DUBER, H.; EBEL, B.; EDMOND, K.; ELBAZ, A.; ALI, S. E.; ERSKINE, H.; ERWIN, P. J.; ESPINDOLA, P.; EWOIGBOKHAN, S. E.; FARZADFAR, F.; FEIGIN, V.; FELSON, D. T.; FERRARI, A.; FERRI, C. P.; FÈVRE, E. M.; FINUCANE, M. M.; FLAXMAN, S.; FLOOD, L.; FOREMAN, K.; FOROUZANFAR, M. H.; FOWKES, F. G. R.; FRANSEN, M.; FREEMAN, M. K.; GABBE, B. J.; GABRIEL, S. E.; GAKIDOU, E.; GANATRA, H. A.; GARCIA, B.; GASPARI, F.; GILLUM, R. F.; GMEL, G.; GONZALEZ-MEDINA, D.; GOSSELIN, R.; GRAINGER, R.; GRANT, B.; GROEGER, J.; GUILLEMIN, F.; GUNNELL, D.; GUPTA, R.; HAAGSMA, J.; HAGAN, H.; HALASA, Y. A.; HALL, W.; HARING, D.; HARO, J. M.; HARRISON, J. E.; HAVMOELLER, R.; HAY, R. J.; HIGASHI, H.; HILL, C.; HOEN, B.; HOFFMAN, H.; HOTEZ, P. J.; HOY, D.; HUANG, J. J.; IBEANUSI, S. E.; JACOBSEN, K. H.; JAMES, S. L.; JARVIS, D.; JASRASARIA, R.; JAYARAMAN, S.; JOHNS, N.; JONAS, J. B.; KARTHIKEYAN, G.; KASSEBAUM, N.; KAWAKAMI, N.; KEREN, A.; KHOO, J.-P.; KING, C. H.; KNOWLTON, L. M.; KOBUSINGYE, O.; KORANTENG, A.; KRISHNAMURTHI, R.; LADEN, F.; LALLOO, R.; LASLETT, L. L.; LATHLEAN, T.; LEASHER, J. L.; LEE, Y. Y.; LEIGH, J.; LEVINSON, D.; LIM, S. S.; LIMB, E.; LIN, J. K.; LIPNICK, M.; LIPSHULTZ, S. E.; LIU, W.; LOANE, M.; OHNO, S. L.; LYONS, R.; MABWEIJANO, J.; MACINTYRE, M. F.; MALEKZADEH, R.; MALLINGER, L.; MANIVANNAN, S.; MARCENES, W.; MARCH, L.; MARGOLIS, D. J.; MARKS, G. B.; MARKS, R.; MATSUMORI, A.; MATZOPOULOS, R.; MAYOSI, B. M.; MCANULTY, J. H.; MCDERMOTT, M. M.; MCGILL, N.; MCGRATH, J.; MEDINA-MORA, M. E.; MELTZER, M.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MEYER, A.-C.; MIGLIOLI, V.; MILLER, M.; MILLER, T. R.; MITCHELL, P. B.; MOCK, C.; MOCUMBI, A. O.; MOFFITT, T. E.; MOKDAD, A. A.; MONASTA, L.; MONTICO, M.; MORADI-LAKEH, M.; MORAN, A.; MORAWSKA, L.; MORI, R.; MURDOCH, M. E.; MWANIKI, M. K.; NAIDOO, K.; NAIR, M. N.; NALDI, L.; NARAYAN, K. M. V.; NELSON, P. K.; NELSON, R. G.; NEVITT, M. C.; NEWTON, C. R.; NOLTE, S.; NORMAN, P.; NORMAN, R.; O'DONNELL, M.; O'HANLON, S.; OLIVES, C.; OMER, S. B.; ORTBLAD, K.; OSBORNE, R.; OZGEDIZ, D.; PAGE, A.; PAHARI, B.; PANDIAN, J. D.; RIVERO, A. P.; PATTEN, S. B.; PEARCE, N.; PADILLA, R. P.; PEREZ-RUIZ, F.; PERICO, N.; PESUDOVS, K.; PHILLIPS, D.; PHILLIPS, M. R.; PIERCE, K.; PION, S.; POLANCZYK, G. V; POLINDER, S.; POPE, C. A.; POPOVA, S.; PORRINI, E.; POURMALEK, F.; PRINCE, M.; PULLAN, R. L.; RAMAIAH, K. D.; RANGANATHAN, D.; RAZAVI, H.; REGAN, M.; REHM, J. T.; REIN, D. B.; REMUZZI, G.; RICHARDSON, K.; RIVARA, F. P.; ROBERTS, T.; ROBINSON, C.; DE LEÒN, F. R.; RONFANI, L.; ROOM, R.; ROSENFELD, L. C.; RUSHTON, L.; SACCO, R. L.; SAHA, S.; SAMPSON, U.; SANCHEZ-RIERA, L.; SANMAN, E.; SCHWEBEL, D. C.; SCOTT, J. G.; SEGUI-GOMEZ, M.; SHAHRAZ, S.; SHEPARD, D. S.; SHIN, H.; SHIVAKOTI, R.; SINGH, D.; SINGH, G. M.; SINGH, J. A.; SINGLETON, J.; SLEET, D. A.; SLIWA, K.; SMITH, E.; SMITH, J. L.; STAPELBERG, N. J. C.; STEER, A.; STEINER, T.; STOLK, W. A.; STOVNER, L. J.; SUDFELD, C.; SYED, S.; TAMBURLINI, G.; TAVAKKOLI, M.; TAYLOR, H. R.; TAYLOR, J. A.; TAYLOR, W. J.; THOMAS, B.; THOMSON, W. M.; THURSTON, G. D.; TLEYJEH, I. M.; TONELLI, M.; TOWBIN, J. A.; TRUELSEN, T.; TSILIMBARIS, M. K.; UBEDA, C.; UNDURRAGA, E. A.; VAN DER WERF, M. J.; VAN OS, J.; VAVILALA, M. S.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; WANG, M.; WANG, W.; WATT, K.; WEATHERALL, D. J.; WEINSTOCK, M. A.; WEINTRAUB, R.; WEISSKOPF, M. G.; WEISSMAN, M. M.; WHITE, R. A.; WHITEFORD, H.; WIEBE,

N.; WIERSMA, S. T.; WILKINSON, J. D.; WILLIAMS, H. C.; WILLIAMS, S. R. M.; WITT, E.; WOLFE, F.; WOOLF, A. D.; WULF, S.; YEH, P.-H.; ZAIDI, A. K. M.; ZHENG, Z.-J.; ZONIES, D.; LOPEZ, A. D.; ALMAZROA, M. A.; MEMISH, Z. A. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197–2223, 2012.

MURRAY, H.; BERMAN, J.; DAVIES, C.; SARAVIA, N. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, 2005.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKYY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical reviews**, 2014.

NAVIN, T. R.; ARANA, B. A.; ARANA, F. E.; BERMAN, J. D.; CHAJÓN, J. F. **Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala.The Journal of infectious diseases**. [s.l: s.n.].

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed ed.São Paulo: Atheneu, 2005.

NJOGU, P. M.; CHIBALE, K. Recent developments in rationally designed multitarget antiprotozoan agents. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1715–1742, 2013.

NJOROGE, M.; NJUGUNA, N. M.; MUTAI, P.; ONGARORA, D. S. B.; SMITH, P. W.; CHIBALE, K. Recent Approaches to Chemical Discovery and Development Against Malaria and the Neglected Tropical Diseases Human African Trypanosomiasis and Schistosomiasis. **Chemical reviews**, v. 114, n. 22, p. 11138–11163, 2014.

NOVAC, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 5, p. 267–272, 2013.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. **Current medicinal chemistry**, v. 7, n. 2, p. 141–158, 2000.

OPREA, T. I.; BAUMAN, J. E.; BOLOGA, C. G.; BURANDA, T.; CHIGAEV, A.; EDWARDS, B. S.; JARVIK, J. W.; GRESHAM, H. D.; HAYNES, M. K.; HJELLE, B.; HROMAS, R.; HUDSON, L.; MACKENZIE, D. A.; MULLER, C. Y.; REED, J. C.; SIMONS, P. C.; SMAGLEY, Y.; STROUSE, J.; SURVILADZE, Z.; THOMPSON, T.; URSU, O.; WALLER, A.; WANDINGER-NESS, A.; WINTER, S. S.; WU, Y.; YOUNG, S. M.; LARSON, R. S.; WILLMAN, C.; SKLAR, L. A. Drug Repurposing from an Academic Perspective. **Drug discovery today. Therapeutic strategies**, v. 8, n. 3-4, p. 61–69, 2011.

OPREA, T. I.; MATTER, H. Integrating virtual screening in lead discovery. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 4, p. 349–358, 2004.

OPREA, T. I.; MESTRES, J. Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. **The AAPS journal**, v. 14, n. 4, p. 759–763, 2012.

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

OVERINGTON, J. P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. L. How many drug targets are there? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 12, p. 993–996, 2006.

PADRÓN-NIEVES, M.; DÍAZ, E.; MACHUCA, C.; ROMERO, A.; PONTE SUCRE, A. Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in Leishmania major. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 331–337, 2009.

PAHO. **Leishmaniasis : Epidemiological Report of the Americas**. [s.l: s.n.].

PALIT, P.; ALI, N. Oral Therapy with Amlodipine and Lacidipine, 1,4-Dihydropyridine Derivatives Showing Activity against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 374–377, 2008.

PARSONS, M.; WORTHEY, E. A.; WARD, P. N.; MOTTRAM, J. C. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi. **BMC genomics**, v. 6, p. 127, 2005.

PARVEEN, S.; KHAN, M. O. F.; AUSTIN, S. E.; CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; ROCK, P.; DOUGLAS, K. T. Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor, and of N-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 25, p. 8087–8097, 2005.

PAUL, S. M.; MYTELKA, D. S.; DUNWIDDIE, C. T.; PERSINGER, C. C.; MUNOS, B. H.; LINDBORG, S. R.; SCHACHT, A. L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 203–214, 2010.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M.-A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R. O.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, p. 839–847, 2007.

PEARSON, R. D.; MANIAN, A. A.; HALL, D.; HARCUS, J. L.; HEWLETT, E. L. Antileishmanial activity of chlorpromazine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 25, n. 5, p. 571–574, 1984.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J.-H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371–e379, 2013.

PHRMA. **Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, 2013 Biopharmaceutical Research Industry Profile**. Washington, DC: [s.n.].

POLLASTRI, M. P. Finding new collaboration models for enabling neglected tropical disease drug discovery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2866, 2014.

POLLASTRI, M. P. M.; CAMPBELL, R. R. K. Target repurposing for neglected diseases. **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1307–1315, 2011.

PONDER, E. L.; FREUNDLICH, J. S.; SARKER, M.; EKINS, S. Computational models for neglected diseases: gaps and opportunities. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 2, p. 271–277, 2014.

PONTE-SUCRE, A.; FIGARELLA, K.; MOLL, H. Experimental leishmaniasis: the glibenclamide-triggered decrease in parasite growth correlates with changes in macrophage features. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 477–486, 2001.

PRATA, A. Treatment of Kalazar with Amphotericin B. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 266–268, 1963.

RANGEL, H.; DAGGER, F.; HERNANDEZ, A.; LIENDO, A.; URBINA, J. A. Naturally azole-resistant Leishmania braziliensis promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: Comparative study with azole-susceptible Leishmania mexicana promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2785–2791, 1996.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. DE; MARZAL, C.; MEDICINA, I. DE; SÃO, T. DE; PAULO, U. D. S.; ENÉAS, A.; AGUIAR, D. C.; SP, S. P. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 2014.

REGUERA, R. M.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ALVAREZ-VELILLA, R.; BALAÑA-FOUCE, R. Target-based vs. phenotypic screenings in Leishmania drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 4, n. 3, p. 355–357, 2014.

REIMÃO, J. Q.; MIGUEL, D. C.; TANIWAKI, N. N.; TRINCONI, C. T.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2842, 2014.

REIMÃO, J. Q.; SCOTTI, M. T.; TEMPONE, A. G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure-activity relationship study. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 22, p. 8044–8053, 2010.

REINER, N. E.; KAZURA, J. W. Oxidant-mediated damage of Leishmania donovani promastigotes. **Infection and immunity**, v. 36, n. 3, p. 1023–1027, 1982.

RITT, J.-F.; RAYMOND, F.; LEPROHON, P.; LÉGARÉ, D.; CORBEIL, J.; OUELLETTE, M. Gene amplification and point mutations in pyrimidine metabolic genes in 5-fluorouracil resistant Leishmania infantum. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2564, 2013.

ROGERS, D.; HAHN, M. Extended-connectivity fingerprints. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 5, p. 742–754, 2010.

ROTELLA, D. P. Recent results in protein kinase inhibition for tropical diseases. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 22, p. 6788–6793, 2012.

RUNGROTMONGKOL, T.; UDOMMANEETHANAKIT, T.; FRECER, V.; MIERTUS, S. Combinatorial design of avian influenza neuraminidase inhibitors containing pyrrolidine core with a reduced susceptibility to viral drug resistance. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 13, n. 3, p. 268–277, 2010.

SAENZ, R. E.; PAZ, H.; BERMAN, J. D. **Efficacy of ketoconazole against Leishmania braziliensis panamensis cutaneous leishmaniasis.The American journal of medicine**. [s.l: s.n.].

SANDERSON, L.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against Leishmania spp. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1888–1891, 2014.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 625–634, 1985.

SANTOS, L. O.; MARINHO, F. A.; ALTOÉ, E. F.; VITÓRIO, B. S.; ALVES, C. R.; BRITTO, C.; MOTTA, M. C. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of Leishmania amazonensis. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4918, 2009.

SANTOS, L. O.; VITÓRIO, B. S.; BRANQUINHA, M. H.; PEDROSO E SILVA, C. M.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of Leishmania species, including strains obtained from HIV-positive patients. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 348–353, 2013.

SAVOIA, D.; ALLICE, T.; TOVO, P.-A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 1, p. 92–94, 2005.

SCHENONE, M.; DANČÍK, V.; WAGNER, B. K.; CLEMONS, P. A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. **Nature chemical biology**, v. 9, n. 4, p. 232–240, 2013.

SEEBECK, T.; STERK, G. J.; KE, H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1289–1306, 2011.

SERRANO-MARTÍN, X.; PAYARES, G.; MENDOZA-LEÓN, A. Glibenclamide, a blocker of K+(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4214–4216, 2006.

SETT, R.; BASU, N.; GHOSH, A. K.; DAS, P. K. Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. **The Journal of parasitology**, v. 78, n. 2, p. 350–354, 1992.

SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 42, n. 9, p. 3116–3126, 2013.

SHARLOW, E. R.; LEIMGRUBER, S.; MURRAY, S.; LIRA, A.; SCIOTTI, R. J.; HICKMAN, M.; HUDSON, T.; LEED, S.; CARIDHA, D.; BARRIOS, A. M.; CLOSE, D.; GRÖGL, M.; LAZO, J. S. Auranofin is an apoptosis-

simulating agent with in vitro and in vivo anti-leishmanial activity. **ACS chemical biology**, v. 9, n. 3, p. 663–672, 2014.

SHOKRI, A.; SHARIFI, I.; KHAMESIPOUR, A.; NAKHAEE, N.; FASIHI HARANDI, M.; NOSRATABADI, J.; HAKIMI PARIZI, M.; BARATI, M. The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Leishmania tropica to meglumine antimoniate. **Parasitology research**, v. 110, n. 3, p. 1113–1117, 2012.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Nanospheres encapsulating anti-leishmanial drugs for their specific macrophage targeting, reduced toxicity, and deliberate intracellular release. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 12, n. 11, p. 953–960, 2012.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M. .; COSTA, D. .; PRATA, J. R. .; BEVILAQUA, C. M. .; SIDRIM, J. J. .; ROCHA, M. F. . Evaluation of terbinafine treatment in Leishmania chagasi-infected hamsters (Mesocricetus auratus). **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 207–216, 2002.

SINGH, S. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of Leishmania-HIV co-infection in India. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 29C, p. 103–112, 2014.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 159–166, 2010.

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

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S. K. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **The New England journal of medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571–2581, 2007.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.-C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

TALELE, T. T.; KHEDKAR, S. A.; RIGBY, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 127–141, 2010.

TAVARES, J.; OUAISSI, M.; OUAISSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Characterization of the anti-Leishmania effect induced by cisplatin, an anticancer drug. **Acta tropica**, v. 103, n. 2, p. 133–141, 2007.

TEMPONE, A. G.; TANIWAKI, N. N.; REIMÃO, J. Q. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of Leishmania (L.) chagasi treated with the calcium channel blocker nimodipine. **Parasitology research**, v. 105, n. 2, p. 499–505, 2009.

THOR, K. B.; KATOFIASC, M. A. Effects of duloxetine, a combined serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, on central neural control of lower urinary tract function in the chloralose-anesthetized female cat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 274, n. 2, p. 1014–1024, 1995.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525–e532, 2011.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Handbook of Molecular Descriptors**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2608–2613, 2014.

TROPSHA, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6-7, p. 476–488, 2010.

TROPSHA, A.; GRAMATICA, P.; GOMBAR, V. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 22, n. 1, p. 69–77, 2003.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002.

TRUDEL, N.; GARG, R.; MESSIER, N.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. J. Intracellular survival of Leishmania species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 9, p. 1292–1299, 2008.

UTZINGER, J.; KEISER, J. Research and development for neglected diseases: more is still needed, and faster. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e317–e318, 2013.

VALDIVIESO, E.; RANGEL, A.; MORENO, J.; SAUGAR, J. M.; CAÑAVATE, C.; ALVAR, J.; DAGGER, F. Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on Leishmania sp. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 4, p. 557–563, 2010.

VEDANI, A.; BRIEM, H.; DOBLER, M.; DOLLINGER, H.; MCMASTERS, D. R. Multiple-conformation and protonation-state representation in 4D-QSAR: the neurokinin-1 receptor system. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 23, p. 4416–4427, 2000.

VEDANI, A.; DOBLER, M. 5D-QSAR: the key for simulating induced fit? **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2139–2149, 2002.

VEDANI, A.; DOBLER, M.; LILL, M. A. Combining protein modeling and 6D-QSAR. Simulating the binding of structurally diverse ligands to the estrogen receptor. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 11, p. 3700–3703, 2005.

VERT, J.-P.; JACOB, L. Machine Learning for In Silico Virtual Screening and Chemical Genomics: New Strategies. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 11, n. 8, p. 677–685, 2008.

VIANNA, G. **Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético**Anais do VII Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia. **Anais**...1912

VICENS, Q.; WESTHOF, E. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. **Structure**, v. 9, n. 8, p. 647–658, 2001.

WANG, C.; ASHTON, T. D.; GUSTAFSON, A.; BLAND, N. D.; OCHIANA, S. O.; CAMPBELL, R. K.; POLLASTRI, M. P. Synthesis and evaluation of human phosphodiesterases (PDE) 5 inhibitor analogs as trypanosomal PDE inhibitors. Part 1. Sildenafil analogs. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 7, p. 2579–2581, 2012.

WANG, H.; YAN, Z.; GENG, J.; KUNZ, S.; SEEBECK, T.; KE, H. Crystal structure of the Leishmania major phosphodiesterase LmjPDEB1 and insight into the design of the parasite-selective inhibitors. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1029–1038, 2007.

WATKINS, R. E.; NOBLE, S. M.; REDINBO, M. R. Structural insights into the promiscuity and function of the human pregnane X receptor. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 5, n. 1, p. 150–158, 2002.

WEIGELT, J.; MCBROOM-CERAJEWSKI, L. D. B.; SCHAPIRA, M.; ZHAO, Y.; ARROWSMITH, C. H.; ARROWMSMITH, C. H. Structural genomics and drug discovery: all in the family. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 1, p. 32–39, 2008.

WEINMANN, H.; METTERNICH, R. Drug discovery process for kinase inhibitors. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 6, n. 3, p. 455–459, 2005.

WERBOVETZ, K.; BRENDLE, J.; SACKETT, D. Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 53–65, 1999.

WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. [s.l: s.n.].

WHO. **Control of the leishmaniases**. Geneva: [s.n.].

WHO. **Accelerating work to overcome the global impacto of neglected tropical diseases**. [s.l: s.n.].

WHO. **Leishmaniasis : worldwide epidemiological and drug access update**. Geneva: [s.n.].

WHO. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and LeishmaniasisWorld Health. Organ. Tech. Rep. Ser.(975)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Research+Priorities+for+Chagas+Disease+,+Human+African+Trypanosomiasis+and+Leishmaniasis#5>. Acesso em: 13 ago. 2013c.

WHO. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Acesso em: 28 dez. 2014.

WIESNER, J.; BORRMANN, S.; JOMAA, H. Fosmidomycin for the treatment of malaria. **Parasitology research**, v. 90 Suppl 2, p. S71–S76, 2003.

WIESNER, J.; JOMAA, H. Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target. **Current drug targets**, v. 8, n. 1, p. 3–13, 2007.

WILLMANN, J. K.; VAN BRUGGEN, N.; DINKELBORG, L. M.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging in drug development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 7, p. 591–607, 2008.

WOODRING, J. L.; BLAND, N. D.; OCHIANA, S. O.; CAMPBELL, R. K.; POLLASTRI, M. P. Synthesis and assessment of catechol diether compounds as inhibitors of trypanosomal phosphodiesterase B1 (TbrPDEB1). **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 21, p. 5971–5974, 2013.

YAU, W.-L.; BLISNICK, T.; TALY, J.-F.; HELMER-CITTERICH, M.; SCHIENE-FISCHER, C.; LECLERCQ, O.; LI, J.; SCHMIDT-ARRAS, D.; MORALES, M. A.; NOTREDAME, C.; ROMO, D.; BASTIN, P.; SPÄTH, G. F. Cyclosporin A treatment of Leishmania donovani reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e729, 2010.

YOUNG, S. S.; YUAN, F.; ZHU, M. Chemical Descriptors Are More Important Than Learning Algorithms for Modelling. **Molecular Informatics**, v. 31, n. 10, p. 707–710, 2012.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; PEREIRA, L. I. A; PELLI DE OLIVEIRA, M. A; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. B. In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010.

ZHANG, C.-C.; KAST, J. Applications of current proteomics techniques in modern drug design. **Current computer-aided drug design**, v. 6, n. 3, p. 147–164, 2010.

ZHOU, S.-F. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 4, p. 310–322, 2008.

ZHU, H.; TROPSHA, A.; FOURCHES, D.; VARNEK, A.; PAPA, E.; GRAMATICA, P.; OBERG, T.; DAO, P.; CHERKASOV, A.; TETKO, I. V. Combinatorial QSAR modeling of chemical toxicants tested against Tetrahymena pyriformis. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 4, p. 766–784, 2008.

ZILBERSTEIN, D.; LIVEANU, V.; GEPSTEIN, A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in Leishmania donovani promastigotes. **Biochemical pharmacology**, v. 39, n. 5, p. 935–940, 1990.

APENDICE A – Artigo a ser submetido

DRUG REPOSITIONING FOR LEISHMANIA SPP: A CHEMOGENOMIC APPROACH

Diego C. Silva[1,2], Pedro V. L. Cravo[2], Carolina H. Andrade[1,2]

[1] LabMol – Laboratory for Drug Design and Modeling, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

[2] Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

ABSTRACT

Leishmaniases are diseases caused by more than 20 protozoa parasites belonging to the genus *Leishmania*, and transmitted through the bite of infected female phlebotomine sandflies. Currently available drugs have serious limitations regarding their efficacy and especially their toxicity, side effects and costs. Thus, there is a pressing need for new therapies that are safer and more effective. The aim of this work was the search and identification of drugs approved and clinically available with potential antileishmanial activity, using bio- and cheminformatics approaches, and experimental validation of these drugs using *in vitro* assays. Initially, we generated a database of *Leishmania* genes that are common to four species (*L. major, L. braziliensis, L. infantum* e *L.mexicana*), specific to the genus *Leishmania*, trying to explore potential molecular targets that could be effective against all species and essential to the process of development and differentiation of the parasite. This database was used to interrogate three database of approved drugs (DrugBank, STITCH, and TTD) aiming to identify homologues of validated targets for other diseases. Furthermore, binary QSAR models were generated from phenotypic assay data, using different descriptors, and two machine learning methods, and then consensus models were built. Homology serach allowed the identification of 36 new potential molecular targets that need to be validated experimentally, and 122 drugs. Of these 122, 28 were previously reported as actives on the literature. This result assures that this type of methodology can be employ successfully for the identification of drugs for drug repositioning. We suggest that drugs not yet tested should be experimentally evaluated *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: leishmaniasis, drug repositioning, bioinformatics,QSAR, virtual screenig, *in vitro* assays.

INTRODUCTION

The leishmaniases are diseases caused by more than 20 protozoa parasites belonging to the genus *Leishmania*, and transmitted by the bite of infected female phlebotomine sandflies. An estimated 20,000 to 30,000 deaths and 1.3 million new cases occur annually. Leishmania parasites live a dual-form life cycle: the promastigotes, which are found in the insect vector, and the amastigotes, an obligate intracellular form that parasites the macrophages of the mammalian host.

Leishmaniases can cause multiple clinical syndromes, such as cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), visceral leishmaniasis (VL), and post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). VL is most severe form of the disease, being fatal if left untreated, but CL and MCL can cause severe morbidity. The type of clinical manifestation is the result of both the parasite (infecting species,) and host (immunological state, nutrition, age).

Drugs currently available for the treatment have serious limitations regarding their efficacy and especially their toxicity, side effects, costs and the rise of drug resistance. Thus, none of them are ideal for the treatment and there is a pressing need for new therapies that are safer and more effective.

Despite the fact that the disease affects a large number of patients, drugs against leishmaniais provide little financial return to pharmaceutical industries, as the main endemic areas are typically poor. As a result, the investment in research and development of new drugs are severely limited, restricting the introduction of new treatments [1,2].

With the intent of changing this prospect, significant efforts have been made in repositioning drugs with other therapeutic indications. This process enables a shorter and fastest way for drugs to reach the patient, with highly reduced costs, since most of the toxicological data and clinical tests already available. Over the years, drug repositioning proved to be a successful strategy. Virtually all drugs currently available for the treatment of leishmaniasis fits in this case: miltefosine, Amphotericin B and pentamidine were previously designed and/or approved for other indications [3–6].

Over the last few decades, advances in computer technologies, coupled with the increasing amount of biochemistry and structural biology information, came together to provide useful tools to assist early drug discovery and development. The use of *in silico* tools

can reduce the cost and the time required to select the most promising candidates for in vitro and in vivo assays [4,7,8]. These methodologies have greater value when used in a complementary way with experimental methods, leading to selection of molecules with greater probability of success [9,10].

Even with all those advances, when it comes to Neglected tropical diseases (NTDs), such as leishmaniasis, the amount of information available to work with is insufficient. An alternative to overcome this limitation is the use of the genomic data of these organisms. Genomic projects are at a very advanced stage when compared to proteomics and structural biology, and a lot more information is available at this level, even for NTDs [11–13]. One strategy that requires only this type of information is the homology-based searching, which is based on the concept that ‘‘similar targets have similar ligands’’.

In this context, publicly available databases, such as DrugBank and Therapeutic Target Database (TTD) which integrate information about gene/protein–drug–disease interactions, are useful resources to develop these strategies, and can be a useful resource for identifying drugs and drug target genes that can potentially be used for drug repositioning. The aim of this work was to search and identify approved and clinically available drug with potential antileishmanial activity, integrating genomic data available for different species of *Leishmania* with drug-target databases.

METHODS

Compilation of the list of Leishmania genes

The first step of the work was the creation of a database containing genes encoding potentially attractive drug targets. To this end, it was retrieved from the database TDR Targets (http://tdrtargets.org/) genes encoding only enzymes or receptors, which were concomitantly present in all species of Leishmania available in the database (*L. major, L. infantum, L. mexicana, L. braziliensis*) and absent in the genome of other trypanosomatids (*T. brucei* and *T. cruzi*). As previously suggested, the group of genes that are unique to the *Leishmania* genus but common to all species could be essential to the development of the parasite, representing potential drug targets [14]. After applying these filters, the list of genes was exported from TDR Targets to a spreadsheet in Excel, containing the name of the gene, the name of the protein encoded by this gene, molecular function, biological process, and cellular component. The

predicted primary amino acid sequence in FASTA format was obtained after searching in the database GeneDB (http://www.genedb.org/Homepage).

Identification of putative drug targets using publicly available drug databases

Each of the predicted protein sequences from the list compiled above was treated as a putative drug-target and used to interrogate two different publicly available web databases that provide comprehensive data on drugs and their primary or putative drug targets: DrugBank, and the Therapeutic Target Database (TTD). This strategy was based on the principle of ‘‘target similarity’’ whereby each query is compared for similarity with all known drug targets contained within each of the databases. In cases where homologous drug targets were identified, all proteins with an output expectation value (E-value) lower than 1^{-10} for DrugBank and TTD were listed as potential targets

List of drugs yet to be tested against *Leishmania* species

Finally, we carried out a literature search using PubMED in order to identify approved drugs that had never been evaluated *in vitro* and or *in vivo* against any specie of *Leishmania* by querying all drugs associated with each positive hit in the list obtained from the previous step. Therefore if a given drug is noted as ‘‘not tested’’, it means that no publication records were found after the following search details were entered in PubMED: (‘‘drug name’’[MeSH Terms] OR ‘‘drug name’’[All Fields]) AND ("leishmania"[MeSH Terms] OR "leishmania"[All Fields]), or that the study(ies) retrieved were insufficiently informative to infer the potential usefulness of the drug as an antimalarial.

RESULTS

From the initial filtering process for the construction of the database we obtained 7885 genes common to the four species available on TDR (*L. mexicana, L. major, L. infantum, L. braziliensis*) and 1766 genes specific of the genus Leishmania. Both lists were intersected of, and 1487 genes reamained, which were further reduced to 229 by restricting the results only to the enzymes and receptors.

The similarity search performed in DrugBank databases (DB), and TTD identified that 85 of the 229 sequences evaluated had at least one homologous protein, considering the

established cut-off values (TTD and DB: e-value $<10^{-9}$). Of these 85, homologous proteins that interacted with compounds classified as nutraceuticals, biotechnology, immunosuppressants, hormones and anesthetics were discarded.

After this step, 37 potential targets from the *Leishmania* genome remained, with 68 unique homologues: for some targets more than one homologous protein has been identified, and in other cases, the same protein was identified as homologous to more than one target. It was observed that 122 drugs interacted with the identified homologues. 28 of them were previously reported as actives on the literature (See examples on Table 1).

Table 1. Examples of approved drugs and their potential *Leishmania* spp. targets that were previously reported on the literature, correctly identified by our target-based chemogenomics strategy.

Drug	**Drug class**	***Leishmania major* target (Target ID)**	**Biological process**	**Activity data**
Amitriptyline	Antidepressant	Serine/threonine-protein kinase a, putative (LmjF.33.1980)	Protein phosphorylation	IC50 = 5 µM *L. donovani* [15,16]
Tamoxifen	Antineoplasic	Protein kinase, putative (LmjF.17.0390)	Protein phosphorylation	IC50 = 1.9 µM *L. braziliensis* IC50 = 2.4 µM *L. infantum* [17–19]
Sorafenib	Antineoplasic	Rac serine-threonine kinase, putative (LmjF.30.0800)	Protein phosphorylation	IC50 = 3.7 µM *L. donovani* [20]
Auranofin	Antirheumatic	Serine/threonine-protein kinase a, putative (LmjF.33.1980)	Protein phosphorylation	IC50 = 0,07 µM *L. major* IC50 = 0,27 µM *L. amazonensis* [21,22]

DISCUSSION

The main idea behind the use of genes that are genus-specific and common to all species as a starting point is based on some assumptions: exploring genes that are common to all species may provide a potential drug target with broad spectrum, which may be effective in the treatment of different clinical forms of the disease. In that sense, it is woth noting that the four species exploited in this work can cause the disease on the New World (*L.*

braziliensis), the Old World (*L. major*), and cutaneous (*L. mexicana*) and visceral (*L. infantum*) forms.

The expected advantage when reducing these potential targets for genes that are genus-specific is the assumption that these genes are important in what differentiate this parasite from others in the same family, as they evolved from a common ancestor, which may have implication (can be essential) in the development and establishment of specific genus Leishmania disease [14,23]. Nevertheless, it is noteworthy that there are several pre- and post-transcriptional steps that can also play an important role in these differences.

The restriction for genes encoding enzymes and receptors was carried out in order to give greater focus to the database, since these are the majority of the drug targets currently known [24].

Removal of nutraceuticals, immunosuppressants, hormones, inhalant anesthetics, and biotechnological products was executed because the primary focus of the study was to identify drugs that could be viable to be repositioned for treatment of leishmaniasis. Since they provoke a reduction of the body's immune system, immunosuppressants are not the viable alternatives for the treatment of an infectious disease, even if they have an specific antileishmanial activity, such as cyclosporin [25]. There is also evidence that patients treated with corticosteroids or methotrexate are at risk [26].

Nutraceuticals (often the natural substrate of the enzyme, or some cofactor) were not considered because would not cause any damage to the parasite. Hormones and inhalant anesthetics were also considered inconvenient for repositioning, due to the side effects. Finally, biotech products (peptides) were excluded, as it was intended to work only with small molecules.

Notably, considered all restrictions and filtering performed, no drug has been identified in the TTD database without having been previously identified by the DB. Some targets were identified only by TTD, however none of these targets were associated with approved drugs (the primary focus of the study) that had not been identified by the DB.

Regarding the 37 potential targets identified, 35 are expressed constitutively in the two life stages of the parasite [27]. A single gene, the LmjF35.2160, has higher expression in promastigotes, and is considered nonessential [27,28], and therefore cannot be viable target. In addition, 12 of this potential targets were previously suggested as potential drug target by another in silico study[29]. Therefore, the validation of these targets should be prioritized.

Another point worth mentioning is the fact that 41% of potential targets are identified protein kinases. It is estimated that between 30 and 35% of R & D programs are directed to

the study of kinases [30]. The relevance of these targets has been widely documented, especially in the field of oncology. In this scenario, several efforts have been made in the exploration of these proteins as targets for parasitic diseases [31,32]. To this point, there is no doubt that small molecules can interact and modulate such proteins, however, it is not known if it will be possible to identify selective compounds for parasites seen that most kinase inhibitors have a high toxicity. A study identified 179 genes on the *Leishmania* genome with counterparts in eukaryotes, and 17 genes encoding atypical kinases [33]. Perhaps the exploitation of these atypical kinases is the best way to search selective compounds.

This strategy allowed the identification of 28 (22%) drugs with some kind of leishmanicidal activity (Table 9), demonstrating their high capacity to recover these compounds. If not considered drugs evaluated, but structurally similar, or the same mechanism of action of the active, that number jumps to 46 (37%). For only 12 (9%) there is evidence that drugs do not have leishmanicidal activity. This discrepancy between active and inactive might best be explained on the basis of lack of interest in publishing negative results than in most ability to identify active molecules, properly. Of these 12 without leishmanicidal activity, 7 can be used as adjuvants in the treatment of disease in some cases, for example, verapamil, able to reduce resistance to certain drugs in vitro, although not individually be able to inhibit growth of the parasite [34,35].

Many of these drugs that are actives *in vivo* and / or *in vitro* against Leishmania are not used in the clinic due to their high toxicity, lack of specificity to the parasite, and the high its high price. However, it is still important to identify these activities, since they can provide information that might inspire the design of novel molecules, with higher efficacy and safety. For instance, the leishmanicidal activity of kinase inhibitors, anticancer agents and with high toxicity and very high cost, does not make them good candidates for drug repositiong, however, knowing this activity can indicate these proteins (kinases) are important to the parasite survival, making them an attractive molecular targets for drug development.

We consider that all predicted drugs identified in this study are attractive for further experimental analysis, but we refer specifically to five drugs that we suggest as candidates for *in vitro* and *in vivo* studies, with suitable pharmacokinetic and toxicity properties (Table 2).

Table 2. Examples of potential leishmanicidal drugs and their potential targets revealed in this study.

Drug	Therapeutic class	L. major target (Target ID)	Biological process

Celecoxib	Anti-inflammatory	Protein kinase, putative (LmjF.17.0390)	Protein phosphorylation
Vidarabine	Antiviral	Adenine aminohydrolase (LmjF.35.2160)	Purine-containing compound salvage
Lanzoprazole	Proton pump inhibitor	Proton motive ATPase (LmjF.04.1110)	ATP biosynthetic process
Rosiglitazone	Anti-diabetic	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase, putative (LmjF.01.0530)	Metabolic process
Sulindac	Anti-inflammatory	Mitogen-activated protein kinase 7, putative (LmjF.13.1640)	Protein phosphorylation

CONCLUSION

We describe an *in silico* approach to identify drugs that have been clinically approved for human use, but have never been evaluated against *Leishmania* parasites based on the principle of ‘‘homologous drug target screening’’. In doing so, we were able to identify drugs that we suggest justify experimental evaluation if they were not tested yet. Out of the 122 we identified, 84 would fit that category. Toxicity and price should also be taken into account before further testing. *In vitro* drug screens can provide insights into their ability to inhibit parasite growth and, if any promising activities are disclosed, they could become important leads to drug repositioning.

REFERENCES

1. Ekins, S., Williams, A. J., Krasowski, M. D. & Freundlich, J. S. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov. Today* **16,** 298–310 (2011).

2. Njoroge, M. *et al.* Recent Approaches to Chemical Discovery and Development Against Malaria and the Neglected Tropical Diseases Human African Trypanosomiasis and Schistosomiasis. *Chem. Rev.* **114,** 11138–11163 (2014).

3. Novac, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol. Sci.* **34,** 267–72 (2013).

4. Pollastri, M. P. M. & Campbell, R. R. K. Target repurposing for neglected diseases. *Future Med. Chem.* **3,** 1307–15 (2011).

5. Oprea, T. I. *et al.* Drug Repurposing from an Academic Perspective. *Drug Discov. Today. Ther. Strateg.* **8,** 61–69 (2011).

6. Nagle, A. S. *et al.* Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.* (2014). doi:10.1021/cr500365f

7. Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A. & Asadullah, K. What makes a good drug target? *Drug Discov. Today* **16,** 1037–43 (2011).

8. Njogu, P. M. & Chibale, K. Recent developments in rationally designed multitarget antiprotozoan agents. *Curr. Med. Chem.* **20,** 1715–42 (2013).

9. Aubé, J. Drug repurposing and the medicinal chemist. *Med. Chem. Lett.* **3,** 442–4 (2012).

10. Liu, Z. *et al.* In silico drug repositioning: what we need to know. *Drug Discov. Today* **18,** 110–5 (2013).

11. Duncan, R. *et al.* Identification and characterization of genes involved in leishmania pathogenesis: the potential for drug target selection. *Mol. Biol. Int.* **2011,** 428486 (2011).

12. Bahia, D. *et al.* The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania major, Leishmania braziliensis and Leishmania infantum--new tools for designing specific inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390,** 963–70 (2009).

13. Dujardin, J. Structure, dynamics and function of Leishmania genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **9,** 290–297 (2009).

14. Peacock, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* **39,** 839–847 (2007).

15. Zilberstein, D., Liveanu, V. & Gepstein, A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in Leishmania donovani promastigotes. *Biochem. Pharmacol.* **39,** 935–40 (1990).

16. Parveen, S. *et al.* Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a

new class of trypanothione reductase inhibitor, and of N-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide. *J. Med. Chem.* **48,** 8087–97 (2005).

17. Eissa, M. M., Amer, E. I. & El Sawy, S. M. F. Leishmania major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* **128,** 382–90 (2011).

18. Miguel, D. C. *et al.* Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **63,** 365–8 (2009).

19. Trinconi, C. T., Reimão, J. Q., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Miguel, D. C. & Uliana, S. R. B. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58,** 2608–13 (2014).

20. Sanderson, L., Yardley, V. & Croft, S. L. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against Leishmania spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **69,** 1888–91 (2014).

21. Sharlow, E. R. *et al.* Auranofin is an apoptosis-simulating agent with in vitro and in vivo anti-leishmanial activity. *ACS Chem. Biol.* **9,** 663–72 (2014).

22. Ilari, A. *et al.* A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from Leishmania infantum in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids* **42,** 803–11 (2012).

23. Beverley, S. M. Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat. Rev. Genet.* **4,** 11–9 (2003).

24. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5,** 993–6 (2006).

25. Yau, W.-L. *et al.* Cyclosporin A treatment of Leishmania donovani reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4,** e729 (2010).

26. WHO. *Control of the leishmaniases*. (2010).

27. Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A. & McMaster, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152,** 35–46 (2007).

28. Boitz, J. M. & Ullman, B. A conditional mutant deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of Leishmania donovani. *J. Biol. Chem.* **281,** 16084–9 (2006).

29. Flórez, A. F. *et al.* Protein network prediction and topological analysis in Leishmania major as a tool for drug target selection. *BMC Bioinformatics* **11,** 484 (2010).

30. Weinmann, H. & Metternich, R. Drug discovery process for kinase inhibitors. *Chembiochem* **6,** 455–9 (2005).

31. Rotella, D. P. Recent results in protein kinase inhibition for tropical diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22,** 6788–93 (2012).

32. Doerig, C. & Tobin, A. B. Parasite protein kinases: at home and abroad. *Cell Host Microbe* **8,** 305–7 (2010).

33. Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N. & Mottram, J. C. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi. *BMC Genomics* **6,** 127 (2005).

34. Shokri, A. *et al.* The effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Leishmania tropica to meglumine antimoniate. *Parasitol. Res.* **110,** 1113–7 (2012).

35. Kaur, J. & Dey, C. S. Putative P-glycoprotein expression in arsenite-resistant Leishmania donovani down-regulated by verapamil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271,** 615–9 (2000).

36. Klinkert, M.-Q. & Heussler, V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. *Mini Rev. Med. Chem.* **6,** 131–43 (2006).

37. Fuertes, M. a, Nguewa, P. a, Castilla, J., Alonso, C. & Pérez, J. M. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. *Curr. Med. Chem.* **15,** 433–9 (2008).

38. Machado, P. R. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4,** e912 (2010).

39. Wang, C. *et al.* Synthesis and evaluation of human phosphodiesterases (PDE) 5 inhibitor analogs as trypanosomal PDE inhibitors. Part 1. Sildenafil analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22,** 2579–81 (2012).

40. Woodring, J. L., Bland, N. D., Ochiana, S. O., Campbell, R. K. & Pollastri, M. P. Synthesis and assessment of catechol diether compounds as inhibitors of trypanosomal phosphodiesterase B1 (TbrPDEB1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23,** 5971–4 (2013).

41. Johner, A., Kunz, S., Linder, M., Shakur, Y. & Seebeck, T. Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of Leishmania major. *BMC Microbiol.* **6,** 25 (2006).

42. Seebeck, T., Sterk, G. J. & Ke, H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future Med. Chem.* **3,** 1289–306 (2011).

43. McClendon, K. S., Riche, D. M. & Uwaifo, G. I. Orlistat: current status in clinical therapeutics. *Expert Opin. Drug Saf.* **8,** 727–44 (2009).