

Artigo

Prospecção de Alvos Bioquímicos para Estudo *in silico* na Quimioterapia Antileishmania

Figueiredo, K. A.; Figueiredo, J. F. S.; Costa, R. K. M.; Alves, M. M. M.; Magalhães, J. L.;* Carvalho, A. L. M.; Lima, F. C. A.

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (5), 1485-1501. Data de publicação na Web: 1 de outubro de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Prospecting Biochemical Targets for *in silico* Study for Antileishmania Chemotherapy

Abstract: The objective of this work is to carry out a prospection of docking molecular on biochemical targets of *Leishmania* sp. The scientific prospection was executed in May /2017 and based on the search for articles in the Virtual Health Library (VHL). In 2006-2017, 84 articles were selected from several countries, including India, Brazil and Mexico. In the classification of the Protein Data Bank (PDB), molecular targets were found belongs to oxidoreductases, hydrolases, transferases, isomerases, DNA, proteases, etc. The most important species of *Leishmania* sp. were *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, etc. The 3 main molecular targets were found trypanothione reductase, pteridine reductase and topoisomerase I, besides various targets involved in the immune system, carbohydrate metabolism, ATP, nitrogen bases, amino acids, etc. It was possible to find the 3 most studied enzymes (trypanothione reductase - 2JK6; pteridine reductase 1 - 1E7W; topoisomerase I - 2B9S) what play important biological functions in the parasites and important molecular targets in antileishmania therapy.

Keywords: Leishmaniasis; *in silico*; docking; antileishmania therapy.

Resumo

O objetivo deste trabalho é realizar uma prospecção de estudos de docagem molecular em alvos bioquímicos de *Leishmania* sp. A prospecção de estudos de docagem molecular foi realizada em maio/2017 e com base na busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). No período de 2006-2017 foram selecionados 84 artigos de vários países, incluindo Índia, Brasil e México. Segundo a classificação do Protein Data Bank (PDB), foram encontrados alvos moleculares de oxidoreductases, hidrolases, transferases, isomerases, DNA, proteases, etc. As principais espécies de *Leishmania* sp. foram: *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, etc. Os 3 alvos moleculares principais encontrados foram tripanotiona redutase, pteridina redutase e topoisomerase I, além de alvos diversos envolvidos no sistema imune, metabolismo dos carboidratos, ATP, bases nitrogenadas, aminoácidos, etc. Neste estudo, foi possível encontrar as 3 enzimas mais estudadas (tripanotiona redutase - 2JK6; pteridina redutase 1 - 1E7W; topoisomerase I - 2B9S) e que desempenham importantes funções biológicas nos parasitas e são promissores alvos moleculares para o desenvolvimento tecnológico de novos fármacos antileishmania.

Palavras-chave: Leishmaniose; *in silico*; docagem molecular; terapia antileishmania.

* Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

✉ *janildo@ufpi.edu.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20180101](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180101)

Prospecção de Alvos Bioquímicos para Estudo *in silico* na Quimioterapia Antileishmania

Kayo A. Figueiredo,^{a,b} Jéssica F. S. Figueiredo,^c Rayla K. M. Costa,^d Michel M. M. Alves,^e Janildo L. Magalhães,^{f,*} André L. M. Carvalho,^g Francisco C. A. Lima^{b,d}

^a Instituto Federal do Piauí – IFPI, Departamento de Saúde, Campus Teresina Central, Teresina-PI, Brasil.

^b Universidade Federal do Piauí – UFPI, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Teresina-PI, Brasil.

^c Universidade Federal do Piauí – UFPI, Coordenação do Curso de Farmácia, Teresina-PI, Brasil.

^d Universidade Estadual do Piauí – UESPI, Laboratório de Quântica Computacional & Planejamento de Fármaco, Teresina-PI, Brasil.

^e Universidade Federal do Piauí – UFPI, Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Teresina-PI, Brasil.

^f Universidade Federal do Piauí – UFPI, Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Teresina-PI, Brasil.

^g Universidade Federal do Piauí – UFPI, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Teresina-PI, Brasil.

* janildo@ufpi.edu.br

Recebido em 5 de junho de 2018. Aceito para publicação em 25 de setembro de 2018

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão
4. Conclusão

1. Introdução

As leishmanioses são zoonoses parasitárias e afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo. É considerada pela OMS como uma das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando

principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.¹ No Brasil, alguns dados mostram uma incidência para leishmaniose visceral semelhante à de alguns países subdesenvolvidos, com até 1,58 para cada 100.000 hab/ano.²

A infecção por parasitas do gênero *Leishmania* causa um amplo espectro de

manifestações clínicas, incluindo as formas subclínica (inaparente), localizada (lesões na pele) e infecções disseminadas (cutânea, mucosa, ou visceral).² Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos.⁴

O estibogluconato de sódio (Pentostan®), o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e anfotericina B lipossomal (Ambisome®) são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses. O alto custo, as limitações e o fato do parasita já apresentar resistência⁵, tem limitado o uso dos tratamentos convencionais e isso vem sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas para as leishmanioses.^{6,7}

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, sendo ligado as inovações científicas e tecnológicas.⁷ A triagem virtual e, em particular, a triagem virtual baseada em receptores surgiu como um método confiável e acessível para identificar novos compostos, além da triagem *in silico* de bases de dados químicas.^{8,9} A pesquisa de novos compostos contra *Leishmania* spp. permite identificar inibidores específicos de moléculas alvo do parasita.¹⁰

O planejamento de fármacos antiparasitários se baseia, especialmente, na investigação de vias bioquímicas do parasita e, quando apropriado, na comparação dessas com a do hospedeiro. Isso objetiva identificar possíveis alvos para modulação seletiva por pequenas moléculas. Dessa forma, é de grande importância conhecer a estrutura molecular de diversas proteínas em vitais vias metabólicas do parasita.¹¹

A disponibilidade de dados genômicos de *Leishmania* sp. vem permitindo a avaliação de vários alvos farmacológicos uma vez que as sequências genômicas completas permitem a identificação de genes de proteção ao parasita. A triagem virtual *in silico* e procedimentos de ancoragem usando modelos de homologia são abordagens

preditivas para projetar novos medicamentos contra alvos específicos do parasita.¹² No entanto, tais modelos construídos a partir de dados genômicos de outras espécies podem apresentar baixa identidade entre as sequências de aminoácidos em relação a macromolécula construída.¹³

A pesquisa de novos fármacos antileishmania envolve a busca dos alvos bioquímicos relacionados aos mecanismos de defesa, metabolismo de RNA, DNA, glicose, esteróis, ácidos graxos, vias das purinas, nucleotídeos ou qualquer rota bioquímica do parasita que possa ser atacada pela molécula e que seja seguro para o hospedeiro.¹⁴ Dessa forma, o objetivo deste trabalho é apresentar uma prospecção de estudos de docagem molecular de alvos bioquímicos através de uma busca de literatura científica de macromoléculas de *Leishmania* sp e, assim, servir de subsídio teórico para estudos *in silico* na triagem de novos fármacos para a terapia antileishmania.

2. Materiais e Métodos

A prospecção científica foi realizada em Maio/2017 e com base na busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) utilizando a associação dos descritores "Leishmania" e "Docking/Docagem" (português, inglês e espanhol e descritos no DECS), conforme esquema apresentado pela Figura 1. Foi realizada a leitura exploratória dos resumos e como critérios de inclusão foram utilizados: artigos publicados entre 2006-2017 e relacionados a estudos de docagem molecular em alvos moleculares de espécies de *Leishmania* sp. Foram incluídas no trabalho estruturas PDB obtidas tanto por técnicas de purificação a partir do parasita assim como aquelas obtidas por modelagem por homologia utilizando estruturas de outras espécies (citando o código PDB). Foram excluídos artigos que não apresentaram o código PDB da molécula, a espécie do parasita, ausência de ligantes na docagem molecular, artigos fora do tema e de revisão.

Realizou-se ainda a busca de estruturas protéicas de *Leishmania* sp. publicadas no *Protein Data Bank*.

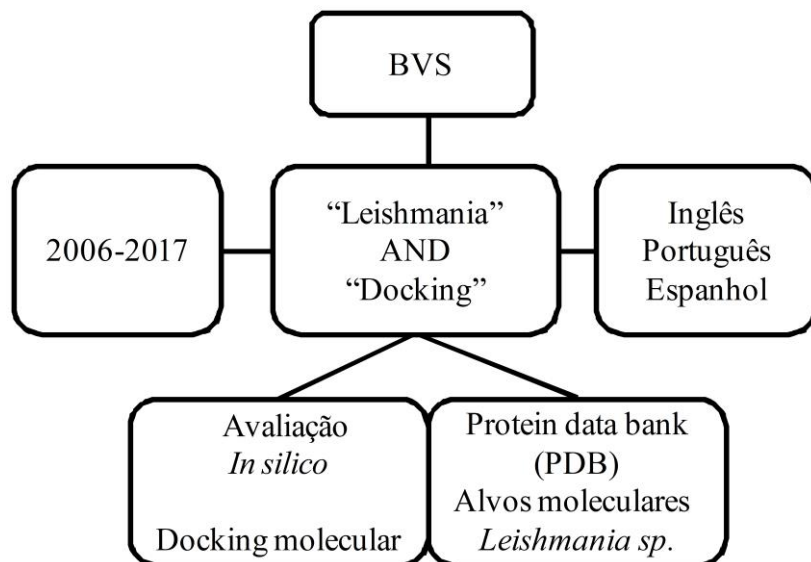


Figura 1. Metodologia para realização da prospecção científica

3. Resultados e Discussão

De acordo com a busca na BVS (descritores em inglês), foram encontrados 152 artigos e, de acordo com os critérios de inclusão, foi possível selecionar 84 trabalhos científicos que abordavam o tema proposto. Com os descritores em português e espanhol nenhum artigo foi encontrado.

Nas Figuras 2 e 3, pode-se observar a evolução ano a ano de tais estudos. Publicações referentes a tal tema vêm se tornando mais frequentes e novas estruturas PDB de diversas espécies de *Leishmania* vem sendo publicadas.

A conclusão do projeto genoma humano resultou em um número crescente de novos alvos terapêuticos para a descoberta de fármacos. Ao mesmo tempo, o surgimento de novas técnicas de purificação de proteínas, além das técnicas de cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN), contribuiu para muitos detalhes estruturais

desses alvos moleculares. Tais avanços vêm permitindo que novas ferramentas computacionais sejam incorporadas ao estudo de novos candidatos a fármacos. Comparado aos testes experimentais tradicionais, os estudos *in silico* como a docagem molecular são uma abordagem do desenvolvimento de fármacos mais direta e racional e tem a vantagem de ser bastante eficaz e de baixo custo.¹⁵

Métodos de triagem virtual de fármacos baseados em docagem molecular vem se destacando como uma poderosa ferramenta na descoberta de novas moléculas bioativas. Estes são capazes de calcular o modo de ligação e a afinidade de um dado ligante ao sítio ativo do receptor.¹⁶ Geralmente são utilizados banco de dados de alvos moleculares (como o PDB, entre outros) e é realizada a análise dos cálculos de energia de ligação ligante-receptor, indicando, assim, uma possibilidade de potencial ação farmacológica. Dessa forma, métodos *in silico* de docagem molecular podem reduzir gastos com purificação de proteínas, além de ter

grande importância na elucidação na estrutura tridimensional de biomoléculas¹⁷, previsão de efeitos adversos/tóxicos e no

reposicionamento da utilização de fármacos já existentes no mercado.¹⁸

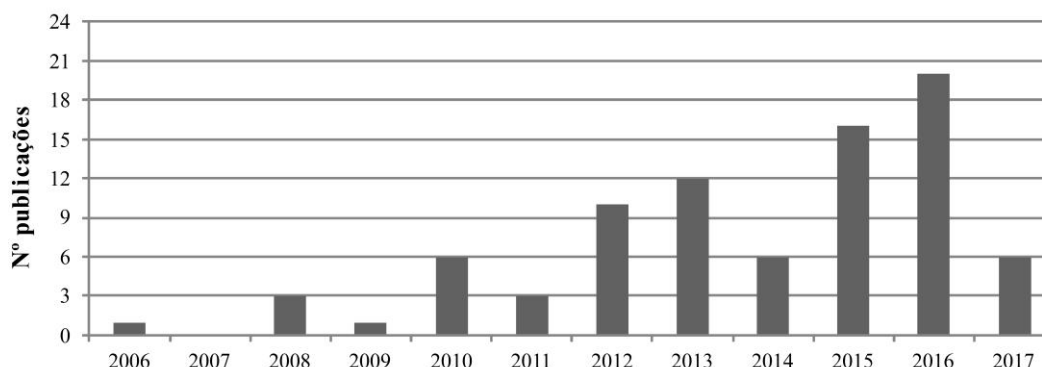


Figura 2. Classificação dos artigos encontrados de acordo com o ano de publicação

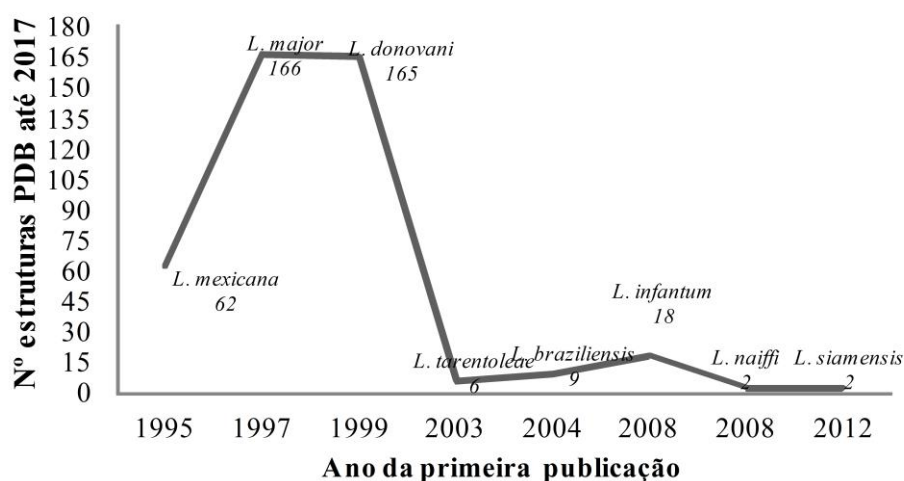


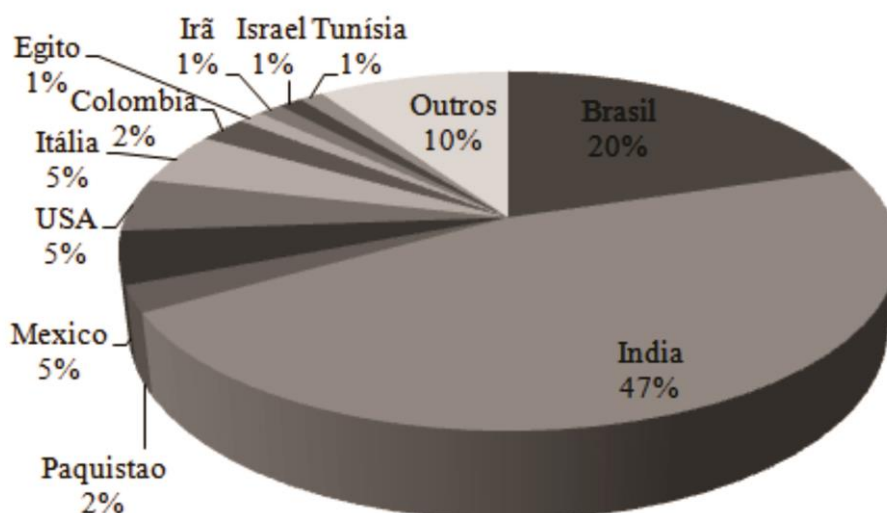
Figura 3. Evolução do número de estruturas encontradas e ano da primeira publicação conforme Protein Data Bank por espécie de *Leishmania*

Pode-se observar na Tabela 1 que o periódico da Université Paris Descartes *European Journal of Medicinal Chemistry* foi responsável por 17,9 % dos trabalhos encontrados. Tal revista científica publica artigos relacionados a síntese orgânica, caracterização e avaliação farmacológica de compostos, desenho de fármacos, QSAR, modelagem molecular, interações fármaco-receptor, aspectos moleculares do metabolismo de fármacos, o direcionamento de fármacos e a síntese de pró-fármacos. As outras revistas científicas apresentaram frequência entre 2,4 a 6,0 % dos trabalhos.

Na Figura 4, Brasil e Índia representam 67% dos países de origem dos estudos analisados. Dados da OMS mostram que, em 2014, mais de 90% dos novos casos de leishmaniose ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Para o Brasil, segundo dados de 2014, a taxa de incidência de novos casos (a cada 10.000 hab/ano) é de 0,54 e 1,67 para a leishmaniose visceral (LV) e cutânea (LC), respectivamente. Na Índia, a incidência de LV é de 0,71 e fortemente mais elevada em países como o Sudão (11,05 e 7,18, respectivamente).¹

Tabela 1. Frequência das principais revistas científicas de acordo com a busca realizada.

Periódico	JCR 2016	Nº	%
<i>European Journal of Medicinal Chemistry</i>	4.519	15	17,9
<i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i>	2.454	5	6,0
<i>Journal of Biomolecular Structure and Dynamics</i>	3.123	4	4,8
<i>ChemMedChem</i>	3.225	3	3,6
<i>Experimental Parasitology</i>	1.724	3	3,6
<i>ACS Medicinal Chemistry Letters</i>	3.746	2	2,4
<i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	4.302	2	2,4
<i>Journal of Chemical Information and Modeling</i>	3.760	2	2,4
<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>	5.071	2	2,4
<i>Molecular BioSystems</i>	2.781	2	2,4
<i>Molecules</i>	2.861	2	2,4
<i>Plos One</i>	2.806	2	2,4
<i>Scientific Reports</i>	4.259	2	2,4
<i>Archiv der Pharmazie</i>	1.994	1	1,2
Outras		37	44,0
Total		84	100

**Figura 4.** Distribuição dos artigos encontrados de acordo com o país de origem do autor principal

Há muitas espécies de *Leishmania* que podem infectar humanos e são responsáveis por diferentes formas clínicas da doença: mucocutânea, cutânea, visceral e cutânea difusa.³ *L. donovani* e *L. infantum* são os principais agentes da LV, enquanto *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* causam principalmente a forma cutânea.¹⁹

A leishmaniose mucocutânea é causada por *L. braziliensis* e desenvolve úlceras na pele e mucosas enquanto a forma cutânea é causada por *L. major*. A LV pode ser causada

por qualquer espécie como *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi*. Esta é a forma mais grave da doença, que pode ser fatal se não tratada. A cutânea difusa é causada por *L. amazonensis* e gera ulcerações crônicas na pele que são difíceis de tratar.²⁰ *L. major* e *L. donovani* foram aquelas mais encontradas nos estudos de docagem molecular (Figura 5), o que corrobora os dados da Figura 4, pois a Índia apresentou quase 50% do estudos e que tais espécies são encontradas na Ásia e África.²¹ Além disso, tais espécies apresentaram o maior número de estruturas PDB publicadas até 2017 (Figura 3).

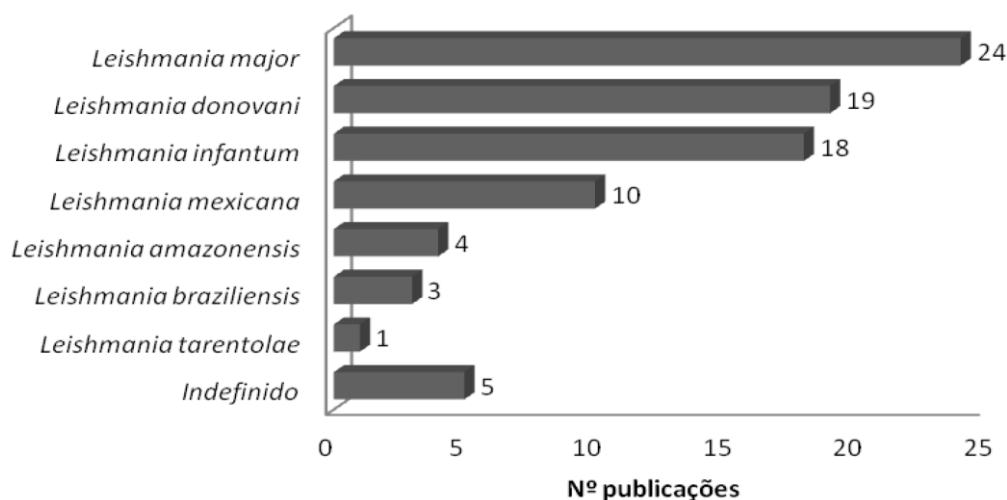


Figura 5. Distribuição dos artigos encontrados de acordo a espécie de *Leishmania* sp. estudada.

A disponibilidade de um grande número de estruturas 3D de proteínas estimulou o desenvolvimento de metodologias teóricas para a busca de alvos de moléculas bioativas em um processo chamado de docagem reversa²² e que permite a seleção de compostos para posteriores testes bioquímicos e/ou biológicos.⁷ Dessa forma, conhecer os alvos moleculares em um dado parasita/alvo é de grande importância no desenvolvimento de novos fármacos. Neste trabalho, conforme Tabela 2, foi possível identificar várias proteínas que são potenciais alvos moleculares antileishmania.

Estudos recentes mostraram que mais de 29 enzimas de *L. major*, *L. donovani*, *L.*

mexicana e *L. infantum* poderiam ser utilizadas como alvos terapêuticos.²³ A base de dados do Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da OMS fornece um banco de alvos potenciais obtidos a partir de dados bioquímicos, genéticos e farmacológicos de vários patógenos bem conhecidos. No topo desta lista podem ser encontrados os alvos necessários para a sobrevivência do parasita, tais como a tripanotiona redutase, a dihidrofolato redutase, a cisteína-protease B, as DNA topoisomerasas, entre outras.¹²

De acordo com a Figura 6, pode-se notar a classificação das diversas proteínas encontradas, sendo as oxidoredutases, mais

particularmente a tripanotona redutase a principal proteína encontrada em 19 dos 84 artigos.

Leishmania e outros tripanossomatídeos apresentam um sistema bioquímico para remoção do estresse oxidativo e manter o equilíbrio redox análogo ao dos mamíferos,

porém único: o sistema tripanotona redutase. Tal enzima é a única flavoenzima NADPH dependente que combate o estresse oxidativo pela manutenção de níveis adequados de tripanotona reduzida.²⁴ De tal forma, este alvo molecular tem grande importância para o desenvolvimento de inibidores da sobrevivência dos parasitas.²⁵

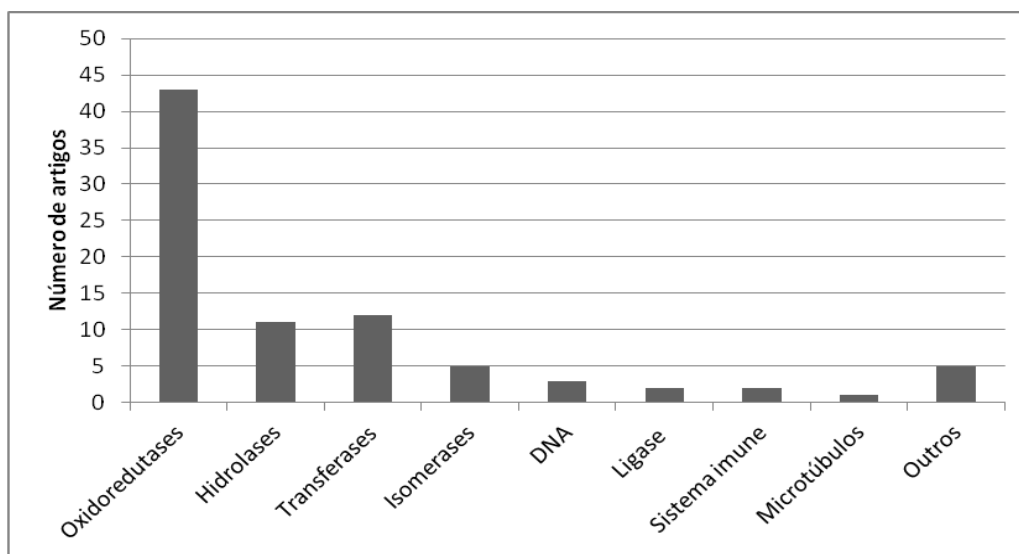


Figura 6. Distribuição dos artigos encontrados de acordo com a classificação PDB da proteína alvo

Outra enzima envolvida no equilíbrio redox é triparedoxina peroxidase I (Tabela 2). Ela tem papel importante na redução do peróxido de hidrogênio a água pelos grupos ditiol da tripanotona²⁶ e tem sido demonstrado que é vital para sobrevivência do parasita através do *knockout* do seu gene em amastigotas de *L. infantum*.²⁷

A γ -glutamilcisteína sintetase, outra enzima do metabolismo redox dos tripanosomatídeos e que funciona como fator de virulência frente a sua sobrevivência dentro dos macrófagos (Tabela 2). É uma proteína essencial da via biossintética da tripanotona que catalisa a ligação ATP-dependente de L-cisteína a L-glutamato, formando γ -glutamilcisteína.²⁸

A *Leishmania* requer pteridinas reduzidas (pterinas e folatos) para a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas e, portanto, captam a biopterina ou folato das células do seu hospedeiro. Estes dois compostos sofrem duas reduções sucessivas para gerar a forma ativa de tetra-hidrofolato. A diididrofolato-reductase-timidilato sintase bifuncional (DHFR-TS) e a pteridina redutase são as duas enzimas que realizam estas reações.²⁹ Além disso, é a principal enzima para a redução do folato e 7,8-dihidrofolato (DHF) para 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) e é vital para o crescimento *in vivo* dos parasitas.³⁰ Entretanto, inibidores do DHF (metotrexato) falham ao inibir esta via por desvio no metabolismo.³¹

Tabela 2. Principais alvos para quimioterapia antileishmania avaliados nos estudos de docagem molecular. Fonte: Elaboração própria

ALVOS	Nº	PDB	ESPÉCIE	VIA METABÓLICA/FUNÇÃO
Tripanotiona redutase	19	2JK6	<i>L. infantum</i>	Metabolismo redox (sobrevivência do parasita)
Pteridina redutase	17	1E7W, 2XOX	<i>L. major</i> , <i>L. donovani</i>	Metabolismo de ácidos nucleicos
Topoisomerase I	5	2B9S	<i>L. donovani</i>	Relaxamento na tensão na hélice de DNA
Arginase	5	1RLA, 1T5F	Homologia	Metabolismo de aminoácidos
DNA	3	1D64	Homologia	DNA
MAPK4 (proteína quinase ativada por mitogeno)	3	1PME, 2Y9Q	Homologia	Serina/treonina quinase (sinalização intracelular)
6-Fosfogliconolactonase	2	3CH7	<i>L. braziliensis</i>	Via da pentose fosfato
<u>Triparedoxina peroxidase</u>	2	3TUE	<i>L. major</i>	Metabolismo redox (sobrevivência do parasita)
↓ Proteinase leishmanolisina (gp63)	1	1LML	<i>L. major</i>	Fator de virulência
Adenina fosforibosil transferase	1	1QB8	<i>L. donovani</i>	Metabolismo de ácidos nucleicos
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	2	1GYP, 1N1E	<i>L. mexicana</i>	Metabolismo da glicose
Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase	1	1PZM	<i>L. tarentolae</i>	Metabolismo de ácidos nucleicos
Oligopeptidase B	1	2XE4	<i>L. major</i>	Protease/fator de virulência
γ-Glutamilcisteína sintetase	1	3LVV	Homologia	Metabolismo redox (sobrevivência do parasita)
Nucleosídeo hidrolase	1	1EZR	<i>L. major</i>	Metabolismo de ácidos nucleicos
Alvos diversos	21	-	-	-
Total	84			

As proteases de parasitas são fatores de virulência para o hospedeiro e são alvos promissores, uma vez que são expressas em todo o ciclo de vida do parasita e não foram identificadas em seres humanos. A oligopeptidase B é uma proteína citoplasmática e há evidências de que está presente nas vesículas (endossomas).³² A leishmanolisina (gp63), fator de virulência para a infecção em *L. major*, *L. mexicana* e *L. donovani*, é responsável pela inibição da lise pelas proteínas do complemento e sua liberação extracelular pode facilitar a migração e difusão da forma evolutiva promastigota através dos tecidos. Gp63 também cliva MHC e fatores de ativação de macrófagos.³³

A sobrevivência e o crescimento das leishmanias dependem de bases de poliamina, principalmente a espermidina, as quais são sintetizadas em um processo metabólico que envolve a enzima arginase.³⁴ Interferir neste processo pode ser uma potencial solução para finalizar o ciclo de vida destes parasitas. Conforme Tabela 2, cinco estudos avaliaram o potencial inibitório *in silico* de algumas moléculas sobre as algumas enzimas arginases.³⁵⁻³⁹ Em tais trabalhos, a estrutura 3D foi construída através de homologia com a enzima de *Rattus norvegicus*. No entanto, como relatado anteriormente, modelos de homologia podem apresentar baixa identidade com o receptor de interesse,

podendo não refletir nas reais interações moleculares fármaco-receptor.

A via de salvamento de purinas é importante para a sobrevivência do parasita e que têm uma variedade de funções que incluem processos celulares e metabólicos vitais, como produção de energia, sinalização celular, síntese de cofatores e ácidos nucleicos. Ao contrário das células hospedeiras, em *Leishmania sp.* não há uma alternativa para a síntese de purinas,⁴⁰ o que a torna um alvo molecular atraente para a descoberta de fármacos antiparasitários.

A enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase desempenha um papel central no processo de aquisição de purinas e que é responsável por reciclar a purina dentro de células parasitárias.⁴¹ Esta via de recuperação recupera purinas (adenina e guanina) dos produtos de degradação do metabolismo de nucleotídeos e de hipoxantina e xantina. Em *Leishmania*, três fosforribosiltransferases estão envolvidas na reciclagem de purinas: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, adenina fosforribosiltransferases e xantina fosforribosiltransferases todas as quais são alvos potenciais para drogas.⁴⁰ As características das duas primeiras enzimas podem ser encontradas na Tabela 2.

Ainda na via do metabolismo de ácidos nucleicos, outra importante enzima foi encontrada nos estudos de docagem molecular: a nucleosídeo hidrolase. Ela é capaz de catalisar a hidrólise de N-ribosila de todas as purinas e pirimidinas. Os parasitas usam a via de salvamento de purinas em vez de obter nucleósidos de seu hospedeiro. As nucleosídeo hidrolases foram encontradas em procariontes e eucariontes, mas não em mamíferos,⁴² tornando-as alvos interessantes para o desenvolvimento de drogas mais seletivas. Tal enzima é um marcador filogenético importante em *Leishmania*, pois é o antígeno principal da primeira vacina licenciada contra a LV canina.⁴³

Pesquisas recentes têm sido focadas nas topoisomerases de DNA, enzimas que

modulam a replicação, transcrição e recombinação do DNA⁴⁴ e a topoisomerase I foi o terceiro alvo mais encontrado nos estudos (Tabela 2). O DNA do cinetoplasto do parasita possui vários locais de ligação apropriados para fármacos antileishmania e a replicação do DNA cinetoplástico circular interligado parece ser particularmente sensível a tais inibidores. Não existem estruturas de DNA conhecidas nos seres humanos que sejam equivalentes aquelas pertencentes ao cinetoplasto, sendo assim, uma via seletiva para a terapia antileishmania.⁴⁵

Fazendo parte da família das proteínas de sinalização intracelular das serina/treonina quinases, as MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno) foram encontradas em três estudos com docagem realizada por meio de modelagem por homologia (Tabela 2). As MAPK possuem função de transdução de sinal que regulam as funções celulares essenciais para a sobrevivência, a morfogênese de tecidos, rearranjos do citoesqueleto, proliferação, diferenciação e respostas imunológicas e resposta ao stress.⁴⁶ Em protozoários, as MAPK4 auxiliam na fuga do sistema imunológico do hospedeiro e desempenha um papel significativo na diferenciação morfológica de promastigotas em formas amastigotas do parasita. As MPK4 de *L. mexicana* apresentam consideráveis diferenças em relação as sequências de aminoácidos com as MAPKs de mamífero, tornando-se, assim, um potencial alvo para agentes antileishmania.⁴⁷

Por último, abordamos aqui as proteínas da via glicolítica, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e da via das pentoses fosfato, a 6-fosfogliconolactonase. O metabolismo energético dos tripanossomatídeos depende unicamente das fontes de carbono disponíveis no hospedeiro. Como os parasitas carecem de um ciclo funcional de Krebs, eles usam a glicólise como a única fonte de geração de ATP.⁴⁸ Sete das enzimas glicolíticas são compartimentalizadas em organelas de tipo peroxissomo, os glicosomas, que é uma característica única dos tripanossomatídeos.

Isto indica que é possível bloquear a produção de energia por síntese de inibidores específicos das enzimas da via glicolítica, uma vez que a glicólise é a única fonte de energia para esses parasitas.⁴⁹

Além das enzimas da via glicolítica, alvos promissores para inibição também incluem as enzimas da via pentose fosfato, que convertem glicose-6-fosfato em ribose-5-fosfato. Tal etapa metabólica tem papel crucial na proteção desses parasitas contra o stress oxidativo, assim como na produção de precursores dos nucleotídeos.⁵⁰

Scotti *et al.*¹⁴ descreveu vários alvos moleculares de diversas vias metabólicas que foram excluídos deste trabalho: via das pentose fosfato (ribose-5-fosfato isomerase); metabolismo do lipídeos (esterol 24-C metiltransferase); via glicolítica (fosfoglicomutase); reguladores da expressão gênica (histona desacetilase); metabolismo do folato e ácidos nucléicos (serina hidroximetiltransferase); síntese de glicoproteínas de superfície (manosiltransferase); via da respiração anaeróbia (fumarate redutase), síntese de poliaminas (spermidina sintase, S-adenosilmetionina descarboxilase); enzimas proteolíticas (dipeptidil carboxipeptidase).

Recentes publicações vêm apresentando a estrutura 3D de várias proteínas essenciais ao parasita: fumarato hidratase de *L. major*, que participa do ciclo de Krebs e que possui mecanismo distinto da enzima de seres humanos;⁵¹ o transportador de Fe MIT1, que regula a função mitocondrial;⁵² a proteína NLRP3 envolvida no processo inflamatório e na produção de IL-1 β durante a infecção da células por leishmania.⁵³ Dessa forma, novos alvos farmacológicos vêm sendo estudados e sua estrutura 3D desvendada, tornando possível ampliar os estudos de triagem por meio dos estudos de docagem molecular para novas moléculas para a terapia antileishmania.

A ligação do inibidor e consequente bloqueio do alvo farmacológico é uma condição necessária, mas não suficiente para o sucesso terapêutico. O parasita na sua forma amastigota intracelular é localizado dentro do

vacúolo parasitóforo do macrófago, onde o composto deve entrar e permanecer ativo. A molécula deverá ser permeável o suficiente para passar através de várias membranas, bem como permanecer estável em um ambiente ácido e não deve ser substrato de enzimas metabolizadoras xenobióticas. Além disso, muitos compostos concebidos contra alvos específicos do parasita apresentam geralmente baixa seletividade.¹²

Na Tabela 3, podem encontrar detalhes de alguns trabalhos encontrados sobre alvos para quimioterapia antileishmania e seus respectivos inibidores de acordo com os estudos de docagem molecular analisados. Alguns estudos avaliaram alvos moleculares clássicos por docagem molecular - tripanotona redutase,²⁵ nucleosídeo hidrolase,⁴² entre outros - e com base em investigações preliminares. Já em outros, vários alvos foram avaliados numa tentativa de encontrar aqueles com maior possibilidade de interação com candidatos a fármaco.^{8,23,24} Em alguns deles, foram realizados ainda estudos pré-clínicos com roedores,⁵⁰ bem como testes enzimáticos.²⁸

De forma complementar aos estudos de docagem molecular, é de grande importância a avaliação da dinâmica molecular, técnica computacional que avalia a evolução temporal das posições e velocidades dos átomos do complexo proteína-ligante e que vem sendo utilizada por alguns autores.^{28,54,55} Os estudos de docagem molecular, associados aos estudos *in vitro* e *in vivo*, vem demonstrando ser uma etapa essencial no planejamento de novos fármacos. Novos alvos moleculares essenciais ao metabolismo e sobrevivência do parasita vem sendo descobertos. Além disso, o aprimoramento das técnicas cristalográficas e espectroscópicas vem evoluindo na descoberta de novas estruturas tridimensionais e com melhor resolução.

Tabela 3. Alguns alvos para quimioterapia antileishmania e seus respectivos inibidores de acordo com os estudos de docagem molecular

Alvo/Pdb	Inibidor	País	Inferências	Referência
Oligopeptidase B (2XE4)	Antipain e outros	Brasil	Modelos 3D de oligopeptídeos em <i>L. amazonensis</i> foram obtidos usando modelagem comparativa da enzima de <i>L. major</i> . Os modelos foram utilizados para a triagem virtual. Os compostos selecionados neste estudo mostraram importantes interações as enzimas com resíduos importantes, como Tyr490, Glu612 e Arg655, indicando que poderiam atuar como inibidores dessas proteínas. Avaliações farmacocinéticas e de toxicidade também mostraram bons resultados.	56
Pteridina redutase (1E7W)	Híbridos oxadiazol-benzohidrazonas	Malaysia	O índice de seletividade mostrou que os compostos com maior número de grupos hidroxilas têm esse índice baixo. Os compostos di-hidroxi apresentaram um bom índice de atividade e seletividade. Entre os compostos halogenados, os compostos com substituição de flúor exibiram boa atividade e índice de seletividade com a ordem de 2-F > 3-F > 4-F.	34
Tripanotona redutase (2JK6)	Híbridos aminoácido-triazol	Índia	18 compostos 1,2,3-triazol híbridos com L-aminoácido (Phe / Pro / Trp) foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antileishmaniana contra a forma promastigotas de <i>L. donovani</i> . Alguns compostos não apresentaram citotoxicidade em relação às células de macrófagos. Em estudos de docagem molecular, os inibidores líderes mostraram interações com resíduos chave no sítio catalítico de tripanotona redutase.	57
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (1PZM)	2'-deoxiguanosina 5'-difosfato	Índia	O complexo enzima-inibidor mostrou-se estável após 24 ns em simulação de dinâmica molecular com interação aminoácidos Glu125, Ile127, Lys87 e Val186. Conclui-se que a pontuação de docagem molecular foi inversamente proporcional a sua atividade biológica.	40
Proteinase leishmanolisina (1LML)	Peptídeos	Tunísia	A docagem molecular mostrou que um dos peptídeos tem energia de interação mínima e a complementaridade máxima da forma com o sítio ativo da proteína. Inibe ainda a cinética de crescimento das leishmanas <i>in vitro</i> e reduz as lesões cutâneas em camundongos BALB/c.	58

Alvo/Pdb	Inibidor	Pais	Inferências	Referência
Topoisomerase 1 (2B9S)	Derivados furopiridinodionas	India	A avaliação <i>in vitro</i> dos compostos contra a enzima humana e do parasita (LdTop1) revelou inibição seletiva para LdTop1 em que seis compostos exibiram atividade com EC50 na gama de 1-30 μ M. Também exibiu atividade contra promastigotas de <i>Leishmania donovani</i> . A investigação da modelagem molecular com LdTop1 revelou supostos sítios de ligação na enzima que poderiam ser aproveitados para o desenvolvimento de moléculas com melhor potência.	44
6-Fosfoglicono lactonase (3CH7)	Dialquilfosforil hidrazonas	Brasil	Os compostos mais ativos contra <i>L. braziliensis</i> apresentaram valores de IC50 na gama 10^{-2} mM, semelhante a pentamidina. Dois compostos mostraram uma diminuição dose-dependente no índice de infecção de macrófagos infectados. Usando docagem molecular com 15 enzimas de <i>L. braziliensis</i> indicou que o alvo provável dos compostos ativos é hexocinase, a primeira enzima da via glicolítica.	50
DNA (2B3E)	Arilimidamidas	USA	Os compostos formam complexos 1:1 com sequências AT no sulco menor de DNA e a força de ligação varia com o tamanho do substituinte, carga e polaridade. Os resultados estruturais e estudos de modelagem molecular fornecem uma explicação para as diferenças nas afinidades de ligação para as arilimidamidas.	45
Nucleosídeo hidrolase (1EZR)	Análogos de nucleosídeos	Brasil	Os compostos apresentaram alta afinidade para a enzima. A docagem molecular mostrou a forma de ligação dos compostos no interior do local ativo da nucleosídeo hidrolase revelando os resíduos essenciais para uma inibição eficaz.	42
Tripanotiona redutase (2JK6)	Derivados tríclicos, fenotiazinas e quinonas	India	Foi observado um padrão de pontes de H em todos estes compostos com os resíduos Thr335, Lys60, His461. Com o fato de estes resíduos ajudarem na orientação do FAD para o local ativo formando o núcleo do domínio de ligação ao FAD, o design de compostos seletivos e potentes que poderiam substituir o FAD <i>in vivo</i> durante a síntese de Tripanotiona redutase pode ser implementado como uma estratégia eficaz em conceber novos fármacos para a Leishmaniose.	25

4. Conclusão

De acordo com este estudo, foram selecionados 84 importantes artigos científicos. Foi possível encontrar várias proteínas que desempenham importantes funções biológicas nos parasitas e são promissores alvos moleculares para o desenvolvimento tecnológico de novos fármacos antileishmania, sendo as principais: tripanotona redutase (2JK6), pteridina redutase 1 (1E7W) e topoisomerase I (2B9S). O presente estudo é um excelente ponto de partida para futuros estudos de docagem molecular com compostos *leads* que podem apresentar potencial atividade antileishmania.

Referências Bibliográficas

- ¹ OMS - Organização Mundial de Saúde. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 27 maio 2017.
- ² Datasus. Leishmaniose visceral. Sistema Nacional de Agravos de Notificação – Sinan. Brasília, Ministério da Saúde, **2016**. [Link]
- ³ Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Journal of Parasitology* **2000**, *30*, 1269. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Fiocruz-Fundação Osvaldo Cruz. As leishmanioses. Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. Rio de Janeiro, 2018. [Link]
- ⁵ Lahiry, S.; Das, A. K.; Das, S. N.; Manna, N. Ethanolic leaf extract of *Coccinia grandis* is effective against both drug resistant and drug sensitive clinical isolates of Indian Kala-azar. *Journal of Parasitic Diseases* **2018**, *42*, 433. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Blanco, V. R.; Nascimento-Júnior, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Revista Virtual de Química* **2017**, *9*, 861. [CrossRef]
- ⁷ Guido, R. V.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry* **2008**, *15*, 37. [PubMed]
- ⁸ Ammar, Q. *In silico* pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *53*, 61. [CrossRef]
- ⁹ Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; Silva, V. B.; Silva, C. H. T. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 739. [CrossRef]
- ¹⁰ Rebollo, J.; Olivero-Verbel, J.; Reyes, N. New agents with potential leishmanicidal activity identified by virtual screening of chemical databases: New agents with potential leishmanicidal activity. *Revista de la Universidad Industrial de Santander* **2013**, *45*, 33. [Link]
- ¹¹ Guido, R.V.C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos avançados* **2010**, *24*, 81. [CrossRef]
- ¹² Reguera, R. M.; Calvo-Álvarez, E.; Álvarez-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 of Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2014**, *4*, 355. [CrossRef]
- ¹³ Santos Filho, O. A.; Alencastro, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova* **2003**, *26*, 253. [CrossRef]
- ¹⁴ Scotti, L.; Ishiki, H.; Mendonça Júnior, F. J.; da Silva, M. S.; Scotti, M. T. *In-silico* Analyses of Natural Products on *Leishmania* Enzyme Targets. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2015**, *15*, 253. [PubMed]
- ¹⁵ Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current*

- Computer-Aided Drug Design* **2011**, *7*, 146. [PubMed]
- ¹⁶ Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *16*, 2785. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Korendovych, I. V. Rational and Semirational Protein Design. *Methods Molecular Biology* **2018**, *1685*, 15. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Xu, X.; Huang, M.; Zou X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. *Biophysics Reports* **2018**, *4*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ OMS-Organização Mundial de Saúde. *Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases*. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 2010. [Link]
- ²⁰ Shukla, A. K.; Singh, B. K.; Patra, S.; Dubey, V. K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160*, 2208. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Ready, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology* **2014**, *6*, 147. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Rognan, D. Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. *Molecular Informatics* **2010**, *29*, 176. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Bernal, F.A., Coy-Barrera, E. *In silico* analyses of sesquiterpene-related compounds on selected leishmania enzyme-based targets. *Molecules* **2014**, *19*, 5550. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Venkatesan, S. K.; Saudagar, P.; Shukla, A. K.; Dubey, V. K. Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* **2011**, *3*, 217. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Venkatesan, S. K.; Shukla, A. K.; Dubey, V. K. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 2463. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Brindisi, M.; Brogi, S.; Relitti, N.; Vallone, A.; Butini, S.; Gemma, S.; Novellino, E.; Colotti, G.; Angiulli, G.; Di Chiaro, F.; Fiorillo, A.; Ilari, A.; Campiani, G. Structure-based discovery of the first non-covalent inhibitors of *Leishmania major* trypanothione peroxidase by high throughput docking. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 9705. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Romao, S.; Castro, H.; Sousa, C.; Carvalho, S.; Tomás, A. M. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *International Journal of Parasitology* **2009**, *39*, 703. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Agnihotri, P.; Mishra, A. K.; Mishra, S.; Sirohi V. K.; Sahasrabudhe, A. A.; Pratap, J. V. Identification of novel inhibitors of *Leishmania donovani* γ -glutamylcysteine synthetase using structure based virtual screening, docking, molecular dynamics simulation and *in vitro* studies. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2017**, *57*, 815. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Nare, B.; Luba, J.; Hardy, L.W.; Beverley, S. New approaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. *Parasitology* **1997**, *114*, 101. [PubMed]
- ³⁰ Sienkiewicz, N.; Ong, H. B.; Fairlamb, A. H. *Trypanosoma brucei* pteridine reductase 1 is essential for survival *in vitro* and for virulence in mice. *Molecular Microbiology* **2010**, *77*, 658. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Hardy, L. W.; Matthews, W.; Nare, B.; Beverley, S. M. Bio-chemical and genetic tests for inhibitors of *Leishmania pteridine* pathways. *Experimental Parasitology* **1997**, *87*, 157. [PubMed]
- ³² Matos Guedes, H. L. M.; Carvalho, R. S. N.; Gomes, D. C. O.; Rossi-Bergmann, B.; De-Simone, S. G. Oligopeptidase B-2 from *Leishmania amazonensis* with an unusual C-terminal extension. *Acta Parasitologica* **2008**, *53*, 197. [CrossRef]
- ³³ McMahon-Pratt, D.; Alexander, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous

- leishmaniasis or the visceral disease? *Immunological Reviews* **2004**, *201*, 206. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Taha, M.; Ismail, N. H.; Imran, S.; Anouar, E. H.; Selvaraj, M.; Jamil, W.; Ali, M.; Kashif, S. M.; Rahim, F.; Khan, K. M.; Adenan, M. I. Synthesis and molecular modelling studies of phenyl linked oxadiazolephenylhydrazone hybrids as potent antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *126*, 1021. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁵ Reis, M. B. G.; Manjolin, L. C.; Maquiaveli, C. C.; Santos-Filho, O. A.; Silva, E. R. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and Rat Arginases by Green Tea EGCG, (+)-Catechin and (–)-Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions. *PLoS One* **2013**, *8*, 78387. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Manjolin, L. C.; dos Reis, M. B.; Maquiaveli, C. C.; Santos-Filho, O. A.; Silva, E. R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Food Chemistry* **2013**, *1*, 2253. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ Silva, E. R.; Maquiaveli, C. C.; Magalhães, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Experimental Parasitology* **2012**, *130*, 183. [CrossRef]
- ³⁸ Méndez-Cuesta, C. A.; Méndez-Lucio, O.; Castillo, R. Homology modeling, docking and molecular dynamics of the *Leishmania mexicana* arginase: a description of the catalytic site useful for drug design. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2012**, *38*, 50. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁹ Maquiaveli, C. C.; Lucon-Júnior, J. F.; Brogi, S.; Campiani, G.; Gemma, S.; Vieira, P. C.; Silva, E. R. Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania amazonensis*. *Journal of Natural Products* **2016**, *79*, 1459. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Ansari, M. Y.; Dikhit, M. R.; Mansuri, R.; Rana, S.; Ali, V.; Sahoo, G. C.; Das, P. Establishment of correlation between *in-silico* and *in-vitro* test analysis against *Leishmania* HGPRT to inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *83*, 78. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴¹ Ansari, M. Y.; Dikhit, M. R.; Sahoo, G. C.; Das, P. Comparative modeling of HGPRT enzyme of *Leishmania donovani* and binding affinities of different analogs of GMP. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50*, 637. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴² Rennó, M. N.; França, T. C.; Nico, D.; Palatnik-de-Sousa, C. B.; Tinoco, L. W.; Figueroa-Villar, J. D. Kinetics and docking studies of two potential new inhibitors of the nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *56*, 301. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Nico, D.; Claser, C.; Borja-Cabrera, G. P.; Travassos, L. R.; Palatnik, M.; Soares, I. S.; Rodrigues, M. M.; Palatnik-de-Sousa, C. B. Adaptive Immunity against *Leishmania* Nucleoside Hydrolase Maps Its C-Terminal Domain as the Target of the CD4+ T Cell-Driven Protective Response. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2010**, *4*, 866. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ Mamidala, R.; Majumdar, P.; Jha, K. K.; Bathula, C.; Agarwal, R.; Chary, M. T.; Majumder, H. K.; Munshi, P.; Sen, S. Corrigendum: Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 28120. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁵ Chai, Y.; Munde, M.; Kumar, A.; Mickelson, L.; Lin, S.; Campbell, N. H.; Banerjee, M.; Akay, S.; Liu, Z.; Farahat, A. A.; Nhili, R.; Depauw, S.; David-Cordonnier, M. H.; Neidle, S.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W. Structure Dependent Binding of Arylimidamides to the DNA Minor Groove. *Chembiochem* **2014**, *15*, 68. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁶ Gupta, C. L.; Akhtar, S.; Kumar, N.; Ali, J.; Pathak, N.; Bajpai, P. *In Silico* Elucidation and Inhibition Studies of Selected Phytoligands Against Mitogen-Activated Protein Kinases of Protozoan Parasites. *Interdisciplinary*

- Sciences: Computational Life Sciences* **2016**, *8*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Gupta, C. L.; Khan, M. K.; Khan, M. F.; Tiwari, A. K. Homology modeling of LmxMPK4 of *Leishmania mexicana* and virtual screening of potent inhibitors against it. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* **2013**, *5*, 136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Opperdoes, F. R. Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. *Annual Reviews of Microbiology* **1987**, *41*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Chawla, B.; Madhubala, R. Drug targets in *Leishmania*. *Journal of Parasitology Disease* **2010**, *34*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Matta, C. B.; de Queiroz, A. C.; Santos, M. S.; Alexandre-Moreira, M. S.; Gonçalves, V. T.; Del Cistia, C. N.; Sant'Anna, C. M.; da Costa, J. B. Novel dialkylphosphorylhydrazones: Synthesis, leishmanicidal evaluation and theoretical investigation of the proposed mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *101*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Feliciano, P. R.; Drennan, C. L.; Nonato, M. C. Crystal structure of an Fe-S cluster-containing fumarate hydratase enzyme from *Leishmania major* reveals a unique protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **2016**, *113*, 9804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Mitra, B.; Laranjeira-Silva, M. F.; Perrone Bezerra de Menezes, J.; Jensen, J.; Michailowsky, V.; Andrews, N. W. A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function is Required for *Leishmania amazonensis* Virulence. *PLOS Pathogenes* **2016**, *12*, 1005340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Novais, F. O.; Carvalho, A. M.; Clark, M. L.; Carvalho, L. P.; Beiting, D. P.; Brodsky, I. E.; Carvalho, E. M.; Scott, P. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLOS Pathogenes* **2017**, *13*, 1006196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Grover, A.; Katiyar, S.P.; Singh, S.K.; Dubey, V.K.; Sundar, D. A leishmaniasis study: structure-based screening and molecular dynamics mechanistic analysis for discovering potent inhibitors of spermidine synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* **2012**, *1824*, 1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Shinde, S.; Mol, M.; Jamdar, V.; Singh, S. Molecular modeling and molecular dynamics simulations of GPI 14 in *Leishmania major*: insight into the catalytic site for active site directed drug design. *Journal of Theoretical Biology* **2014**, *351*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Sodero, A. C.; Dos Santos, A. C.; Mello, J. F.; de Jesus, J. B.; de Souza, A. M.; Rodrigues, M. I.; de Simone, S. G.; Rodrigues, C. R.; de Matos Guedes, H. L. Oligopeptidase B and B2: comparative modelling and virtual screening as searching tools for new antileishmanial compounds. *Parasitology* **2017**, *144*, 536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Masood, M. M.; Hasan, P.; Tabrez, S.; Ahmad, M. B.; Yadava, U.; Daniliuc, C. G.; Sonawane, Y. A.; Azam, A.; Rub, A.; Abid, M. Anti-leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico physico-chemical properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Rhaïem, R. B.; Houïmel, M. Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Tropica* **2016**, *159*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]