



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DA
ENZIMA N-MIRISTOILTRANSFERASE (NMT) EM MALARIA E
LEISHMANIOSE**

Aluna: Mariana Sant' Anna Pereira Nicolau

Orientadora: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

**UBERLÂNDIA - MG
2024**

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DA
ENZIMA N-MIRISTOILTRANSFERASE (NMT) EM MALARIA E
LEISHMANIOSE**

Aluna: Mariana Sant' Anna Pereira Nicolau

Orientadora: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N639p
2024

Nicolau, Mariana Sant' Anna Pereira, 1983-

Prospecção *in silico* e *in vitro* de potenciais inibidores da enzima N-miristoiltransferase (NMT) em malária e leishmaniose [recurso eletrônico] / Mariana Sant' Anna Pereira Nicolau. - 2024.

Orientadora: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2025.5009>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. I. Tadini, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário-Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Vinte e oito de maio de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	12:23h
Matrícula do Discente:	11923GBI010				
Nome do Discente:	Mariana Sant'Anna Pereira Nicolau				
Título do Trabalho:	Prospecção <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de potenciais inibidores da enzima N-miristoiltransferase (NMT) em malária e leishmaniose.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura, função, caracterização de biomoléculas e compostos bioativos e suas aplicações.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Triagem virtual, seleção e teste de toxicidade de potenciais inibidores da N-miristoiltransferase (NMT) de <i>Leishmania chagasi</i> .				

Aos vinte e oito dias do mês de maio de dois mil e vinte e quatro, às 08:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº 06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr. Diego Pandeló José, Dr^a. Daiana Silva Lopes, Dr. Matheus de Souza Gomes, Dr^a. Renata Santos Rodrigues e Dr^a. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini, como presidente da mesa e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Dr^a. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Matheus de Souza Gomes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/05/2024, às 12:25, 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 **Renata Santos Rodrigues, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/05/2024, às 12:25, 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 **Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/05/2024, às 12:25, 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 **Daiana Silva Lopes, Usuário Externo**, em 28/05/2024, às 12:26, 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 Pandeló José, Usuário Externo**, em 28/05/2024, às 12:26, 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://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5388855** e o código CRC **5F5C0CD5**.

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DA
ENZIMA N-MIRISTOILTRANSFERASE (NMT) EM MALARIA E
LEISHMANIOSE**

ALUNA: Mariana Sant' Anna Pereira Nicolau

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

Examinadores:

Daiana Silva Lopes
Diego Pandeló José
Matheus de Souza Gomes
Renata Santos Rodrigues

Data da Defesa: 28 /05 /2024

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, meu marido Nilson pela inspiração e apoio inabalável, e aos meus queridos filhos Guilherme e Gabriela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria ao longo desta jornada. Sem Sua orientação e bênçãos, este trabalho não teria sido possível.

Ao meu querido marido, minha eterna gratidão por seu amor, paciência e apoio incondicional. Sua compreensão e incentivo constante foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios deste percurso.

Aos meus filhos, vocês são minha maior fonte de motivação e alegria.

Aos meus pais, agradeço por todo o amor, educação e valores que me transmitiram. Vocês sempre acreditaram em mim e me incentivaram a alcançar meus objetivos. Sua dedicação e sacrifício foram essenciais para a minha formação e sucesso.

A minhas irmãs por sempre estarem presentes, pelo apoio e pelas palavras de encorajamento.

Agradeço aos meus sobrinhos: Camila, Lucas, Mayara, Julia, Bianca e Rafael.

Agradeço aos meus cunhados: Marcelo, Andréa, Wilson e André.

Aos meus sogros Nilson e Marlene, por cuidarem dos meus filhos para que eu pudesse estudar e concluir meu trabalho. Sou grata pelo carinho, apoio e pela confiança em minha capacidade. Agradeço por me acolherem como filha e por toda a ajuda durante este período.

À Universidade Federal de Uberlândia e aos seus docentes que me incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica, em especial minha orientadora Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini.

Agradeço a todos que apoiaram e incentivaram meu trabalho ao longo desta jornada.

A todos vocês, minha sincera gratidão. Esta conquista é nossa!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - APRESENTAÇÃO	1
1. Doenças Tropicais Negligenciadas	6
2. Malária	7
3. Leishmaniose	13
4. N-Miristoiltransferase (NMT)	19
5. Métodos computacionais em desenvolvimento de fármacos	24
6. Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO II – Artigo I (publicado)	39
RESUMO	39
ARTIGO I (link)	39
CAPÍTULO III – Artigo II (não publicado)	41
RESUMO	42
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	45
METHODS	47
<i>Shape-Based Modeling and Validation</i>	47
<i>Database Preparation</i>	47
<i>Virtual screening and molecular docking</i>	48
<i>Molecular Dynamics</i>	48
<i>Binding free energy calculation</i>	49
<i>Promastigote culture</i>	49
<i>Cytotoxicity assays</i>	49
<i>Statistical Analysis</i>	50
RESULTS	50
<i>Shape-Based Model Validation and Screening for NMT potential ligands</i>	50
<i>Docking and binding mode analysis</i>	52
<i>NMT-ligand complexes stability analysis</i>	55
<i>NMT-ligand complexes interaction analysis</i>	56
<i>Potential inhibitors cytotoxicity</i>	58
DISCUSSION	60
CONCLUSION	62
ACKNOWLEDGMENTS	62
DISCLOSURE STATEMENT	62
FUNDING	62
REFERENCES	63

APRESENTAÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de enfermidades infecciosas que afetam principalmente populações em áreas tropicais e subtropicais, predominantemente em países de baixa renda. Estas doenças recebem pouca atenção em termos de pesquisa, desenvolvimento de medicamentos e investimento em saúde pública, apesar de causarem um fardo significativo em termos de morbidade, mortalidade e impacto socioeconômico. Entre as DTNs mais comuns estão: dengue, leishmaniose, doença de Chagas, esquistossomose, filariose linfática, entre outras. Essas doenças são frequentemente transmitidas por vetores como mosquitos, moscas e carrapatos, e muitas vezes afetam comunidades carentes com acesso limitado a saneamento básico, água potável e serviços de saúde.

Os desafios no controle das DTNs incluem a falta de infraestrutura de saúde adequada, baixo acesso a tratamentos eficazes, resistência a medicamentos, falta de investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias, além da complexidade das interações entre os parasitos, seus hospedeiros e o meio ambiente. Os esforços recentes para combater as DTNs incluem programas de prevenção e controle, acesso a medicamentos e tratamentos, investimentos em pesquisa e desenvolvimento de vacinas e terapias mais eficazes, além de iniciativas de melhoria na infraestrutura de saúde e educação em saúde pública. O combate efetivo às DTNs requer uma abordagem integrada e colaborativa entre governos, organizações não governamentais, instituições acadêmicas e setor privado.

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, transmitida aos seres humanos através da picada de insetos vetores do gênero *Anopheles* infectados com o parasito. Apesar de não ser considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ela é uma das doenças tropicais mais prevalentes e mortais no mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, com um impacto significativo em países de baixa renda. Os sintomas da malária incluem febre, calafrios, dores de cabeça, náuseas e vômitos, podendo progredir para complicações graves, como anemia, disfunção cerebral, insuficiência renal e até mesmo óbito, especialmente em casos de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, o tipo mais letal. O controle da malária

depende de várias estratégias, incluindo o uso de mosquiteiros tratados com inseticidas, pulverização residual de inseticidas, tratamento precoce e eficaz dos casos diagnosticados, e, quando possível, o desenvolvimento de vacinas. No entanto, a resistência aos medicamentos antimaláricos e aos inseticidas, juntamente com desafios socioeconômicos, como acesso limitado a cuidados de saúde e infraestrutura precária, continuam a ser obstáculos significativos no combate à doença. Apesar desses desafios, houve progresso significativo na redução da incidência e mortalidade por malária ao longo das últimas décadas, graças a iniciativas globais de controle e investimentos em pesquisa, diagnóstico e tratamento. No entanto, a erradicação completa da malária ainda é um objetivo desafiador, exigindo esforços contínuos e coordenados em níveis local, nacional e internacional.

Outra, importante e complexa enfermidade entre as DTNs está a leishmaniose, uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. O parasito é transmitido aos seres humanos pela picada de insetos vetores infectados do gênero *Phlebotomus* (na região do Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (na região do Novo Mundo). Existem diferentes formas de leishmaniose, incluindo a cutânea, a mucocutânea e a visceral, sendo esta última a mais grave e potencialmente fatal se não tratada adequadamente. A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é caracterizada por febre prolongada, perda de peso, aumento do baço e fígado, anemia e comprometimento do sistema imunológico. A leishmaniose cutânea causa úlceras na pele, enquanto a forma mucocutânea pode levar à destruição de mucosas nasais e orais. A doença é endêmica em muitas partes do mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente populações carentes com acesso limitado a cuidados de saúde e condições sanitárias inadequadas. O controle da leishmaniose envolve medidas de prevenção da picada de inseto, diagnóstico precoce e tratamento eficaz com medicamentos antiparasitários. Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a leishmaniose continua sendo um problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento, com desafios como a resistência aos medicamentos, a falta de vacina eficaz e barreiras socioeconômicas para o acesso aos cuidados de saúde. Programas de controle integrados, pesquisa contínua e esforços colaborativos são fundamentais para a redução da incidência e impactos dessa doença debilitante.

Uma das abordagens para enfrentar o problema das DTNs é a busca de novas terapêuticas, como por exemplo a busca por inibidores para alvos biológicos específicos dos parasitos. Um dos alvos biológicos atuais em malária e em tripanossomatídeos é a enzima N-miristoiltransferase (NMT). A NMT é uma enzima essencial em muitos organismos e desempenha um papel fundamental na modificação pós-traducional de proteínas. Sua principal função é adicionar uma cadeia de ácido mirístico à extremidade N-terminal de proteínas específicas, o que pode afetar sua localização celular, atividade e interações com outras moléculas. A miristoilação, catalisada pela NMT, é um processo importante para a ancoragem de proteínas em membranas celulares, sendo comum em proteínas associadas à membrana plasmática e organelas como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Esta modificação pode influenciar a função de proteínas envolvidas em uma variedade de processos biológicos, incluindo sinalização celular, transporte vesicular, e regulação do citoesqueleto. Tendo em vista o papel importante desta enzima em processos fisiológicos, a inibição da NMT tem sido investigada como um alvo terapêutico potencial para a prospecção de novas drogas visando o tratamento de várias doenças, incluindo câncer, doenças parasitárias e virais. Em parasitos como *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei*, a NMT é um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que a inibição da miristoilação de proteínas essenciais pode resultar na morte do parasito. Além disso, estudos recentes têm explorado o potencial da NMT como um alvo terapêutico em câncer, devido ao seu papel na regulação de vias de sinalização associadas à proliferação celular e metástase. Inibidores da NMT estão sendo desenvolvidos e testados como uma nova abordagem para o tratamento de certos tipos de câncer, oferecendo uma nova esperança na luta contra essa doença devastadora. Portanto, a compreensão do papel da NMT na biologia desses parasitos é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose e malária, duas doenças que afetam milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em regiões de baixa renda.

Visando a busca de potenciais inibidores para NMT, novas abordagens vêm sendo utilizadas com auxílio de métodos computacionais no desenvolvimento de fármacos. Atualmente os métodos computacionais desempenham um papel significativo na descoberta de novos fármacos, oferecendo ferramentas poderosas para prever e otimizar

propriedades de moléculas candidatas a medicamentos. Esses métodos abrangem uma variedade de técnicas e abordagens, incluindo modelagem molecular, simulação por dinâmica molecular, *docking* molecular, triagem virtual e *design* de fármacos baseado em estrutura. Na modelagem molecular, as estruturas tridimensionais de moléculas biológicas e compostos candidatos são construídas e otimizadas computacionalmente, permitindo a previsão de propriedades físico-químicas, interações moleculares e atividades biológicas. A simulação por dinâmica molecular permite simular o comportamento de moléculas em escala atômica ao longo do tempo, fornecendo *insights* sobre sua dinâmica, conformação e interações com o ambiente circundante. O *docking* molecular é utilizado para prever a geometria e a afinidade de ligação entre uma molécula candidata a fármaco e seu alvo biológico, facilitando a identificação de compostos com potencial atividade farmacológica. A triagem virtual é uma abordagem computacional para identificar rapidamente compostos promissores em grandes bancos de dados de moléculas, selecionando aqueles que são mais propensos a interagir com um alvo específico. O *design* de fármacos baseado em estrutura utiliza informações detalhadas sobre a estrutura tridimensional de alvos biológicos e compostos candidatos para projetar moléculas com propriedades farmacológicas desejadas, como alta seletividade, afinidade e atividade biológica. Esses métodos computacionais são frequentemente combinados com experimentos de laboratório, *in vitro* e *in vivo*, para acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos, reduzir custos e aumentar a taxa de sucesso na descoberta de novos medicamentos. Como resultado, eles desempenham um papel fundamental na otimização de candidatos a fármacos, identificação de novos alvos terapêuticos e compreensão dos mecanismos moleculares relacionados às doenças.

Este trabalho teve como objetivo identificar potenciais inibidores da NMT, visando o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas para doenças como a malária e a leishmaniose. A pesquisa envolve a triagem de compostos em busca de moléculas capazes de interromper seletivamente a atividade da NMT nos parasitos responsáveis por essas doenças. O intuito é fornecer uma base para o desenvolvimento de novos tratamentos, mais eficazes e menos tóxicos.

Esta tese foi dividida em 3 capítulos. O capítulo 1 apresentará a fundamentação teórica iniciando com uma introdução sobre doenças tropicais negligenciadas, com ênfase na leishmaniose, e abordagem sobre a malária. Na sequência, apresenta uma descrição da

enzima N-miristoiltransferase (NMT) como alvo terapêutico, incluindo sua função e importância nos parasitos causadores dessas doenças. E por fim, os métodos computacionais empregados para o desenvolvimento de fármacos. O capítulo 2 apresenta, na forma de artigo publicado, a identificação de potenciais inibidores da NMT para a malária e descreve os métodos utilizados para triagem e identificação de compostos com potencial atividade inibitória. Por fim, o capítulo 3, trata da identificação de inibidores da NMT para a leishmaniose, contendo uma exposição detalhada dos achados da investigação voltada para a identificação de inibidores da NMT direcionados à leishmaniose. Serão apresentados os métodos empregados na pesquisa, incluindo ensaios *in silico* e *in vitro*, bem como as análises dos resultados e sua relevância para o avanço no tratamento da leishmaniose.

CAPÍTULO I - Fundamentação Teórica

1. Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são mais comuns em regiões tropicais, afetando principalmente comunidades carentes que não têm acesso adequado à saúde. Essas doenças têm impactos graves na saúde, na sociedade e na economia. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1,7 bilhão de pessoas precisam de tratamento para pelo menos uma DTN a cada ano (WHO, 2024).

As doenças negligenciadas são caracterizadas por receberem menos atenção, investimento em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, e recursos em comparação com outras doenças. Essas doenças geralmente afetam populações marginalizadas em áreas de baixa renda e podem passar despercebidas. As DTNs representam um grave problema de saúde pública global, principalmente para populações empobrecidas, evidenciando a necessidade de esforços visando a implementação de políticas públicas mais eficazes, controle de vetores e investimento significativo em programas para a descoberta de novos medicamentos. (NASCIMENTO; CAVALCANTI; DE MOURA, 2023).

As DTNs são biologicamente diversas e incluem 20 doenças diferentes, como úlcera de Buruli, doença de Chagas, dengue, chikungunya, dracunculíase (doença do verme da Guiné), equinococose, trematodíases transmitidas por alimentos, tripanossomíase africana humana (doença do sono), leishmaniose, hanseníase (doença de Hansen), filariose linfática, micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas, oncocercose (cegueira dos rios), raiva, escabiose e outros ectoparasitas, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, envenenamento por mordedura de serpente, teníase/cisticercose, tracoma e boubá (treponematoses endêmicas) (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021). Para enfrentar essa questão, uma série de programas foi implementada no passado, sendo que ainda existem metas a serem atingidas até 2030, com o objetivo de controlar e eliminar completamente as DTNs. A OMS recomenda cinco intervenções estratégicas fundamentais para acelerar a prevenção, controle, eliminação e erradicação de DTNs, sendo elas: gestão inovadora e intensificada da doença, quimioterapia preventiva, controle de vetores, saúde pública veterinária e fornecimento de água potável, saneamento e higiene (GENEVA, 2023).

O enfrentamento das DTNs demanda melhorias na vigilância, sistemas de saúde, inovação em medicamentos, foco em doenças negligenciadas e acesso à água e saneamento básico para erradicar essas enfermidades. Recentemente, a pandemia de COVID-19 acrescentou um desafio adicional a essa luta, uma vez que afetou a entrega de produtos e insumos de saúde, o que exigiu esforços para superar obstáculos e garantir o acesso aos tratamentos (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021).

A pesquisa sobre novas estratégias terapêuticas para as DTNs concentra-se na combinação de medicamentos existentes ou reutilizados, visando aprimorar a eficácia/biodisponibilidade dos tratamentos disponíveis. Contudo, a descoberta de novos fármacos também desempenha um papel importante na descoberta de medicamentos para as DTNs. (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021). As terapias atualmente disponíveis exibem, em sua maioria, alta toxicidade e requerem uma duração de tratamento prolongada. Adicionalmente, o desenvolvimento de resistência a medicamentos, especialmente em pessoas infectadas com DTNs como a doença de Chagas e leishmaniose, são frequentes. Essas duas DTNs são conhecidas pela maior taxa de mortalidade em relação às outras (HOTEZ *et al.*, 2007). Dessa forma, a lacuna no arsenal terapêutico e a resistência aos medicamentos atuais justificam a busca por agentes terapêuticos mais eficazes. Nesse contexto, a enzima NMT se destaca como uma das moléculas promissoras para a identificação de novos medicamentos, devido às suas funções críticas na produção de proteínas essenciais para parasitos (NASCIMENTO; CAVALCANTI; DE MOURA, 2023). Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar potenciais inibidores da NMT contra os parasitos *Plasmodium*, causador da malária, e *Leishmania* spp, causador da leishmaniose, avaliando seus potenciais na aplicação terapêutica.

2. Malária

A malária afeta milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. A malária é desencadeada pela presença de parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium*, os quais são disseminados para seres humanos por meio da picada de insetos vetores do gênero *Anopheles* infectado. Entre as diversas espécies de parasitos que podem causar a malária em seres humanos, duas delas - *Plasmodium falciparum* e

Plasmodium vivax - destacam-se como as principais ameaças (WHO, 2024). O gênero *Plasmodium* possui cinco espécies capazes de causar doenças em seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (BANNISTER; SHERMAN, 2009). Apesar da malária não ser considerada uma doença negligenciada, esta apresenta uma importância global, estando mais presente em países tropicais e em populações de baixa renda (SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004). De acordo com o relatório da OMS, houve um estimado 249 milhões de casos de malária e 608 mil mortes em 2022 (WHO, 2024).

O ciclo biológico da malária (Figura 1) começa quando uma fêmea do inseto vetor *Anopheles*, infectada com *Plasmodium*, pica um ser humano e inocula esporozoítos na corrente sanguínea. Os esporozoítos chegam ao fígado, onde invadem hepatócitos e se multiplicam assexuadamente por esquizogonia (formação de esquizontes hepáticos). Dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam e formam esquizontes hepáticos. Este é parte do ciclo biológico chamado de “ciclo exo-eritrocítico”. Os esquizontes hepáticos se rompem, liberando merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos (eritrócitos) e começam o ciclo eritrocítico. Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se multiplicam assexuadamente por esquizogonia, formando novos merozoítos. Este ciclo de invasão, replicação e lise dos eritrócitos (hemólise) gera os sintomas clássicos da malária, como febre, calafrios e anemia. Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos dentro dos eritrócitos. Os gametócitos são a forma do parasito que é adquirida pelo insetor vetor durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. No estômago do mosquito, os gametócitos se fundem, formando zigotos, que se desenvolvem em oocistos. Dentro dos oocistos, ocorre a meiose e formação de esporozoítos. Esta parte do ciclo é conhecida como “ciclo esporogônico”. Os esporozoítos formados se deslocam para as glândulas salivares do inseto vetor. Quando o vetor infectado pica outro hospedeiro humano, os esporozoítos são injetados na corrente sanguínea, reiniciando o ciclo da malária (NEVES *et al.*, 2005; WHITE, 2008). Este ciclo contínuo de infecção, replicação e transmissão é responsável pela propagação da malária. A compreensão detalhada desse ciclo é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e controle da doença.

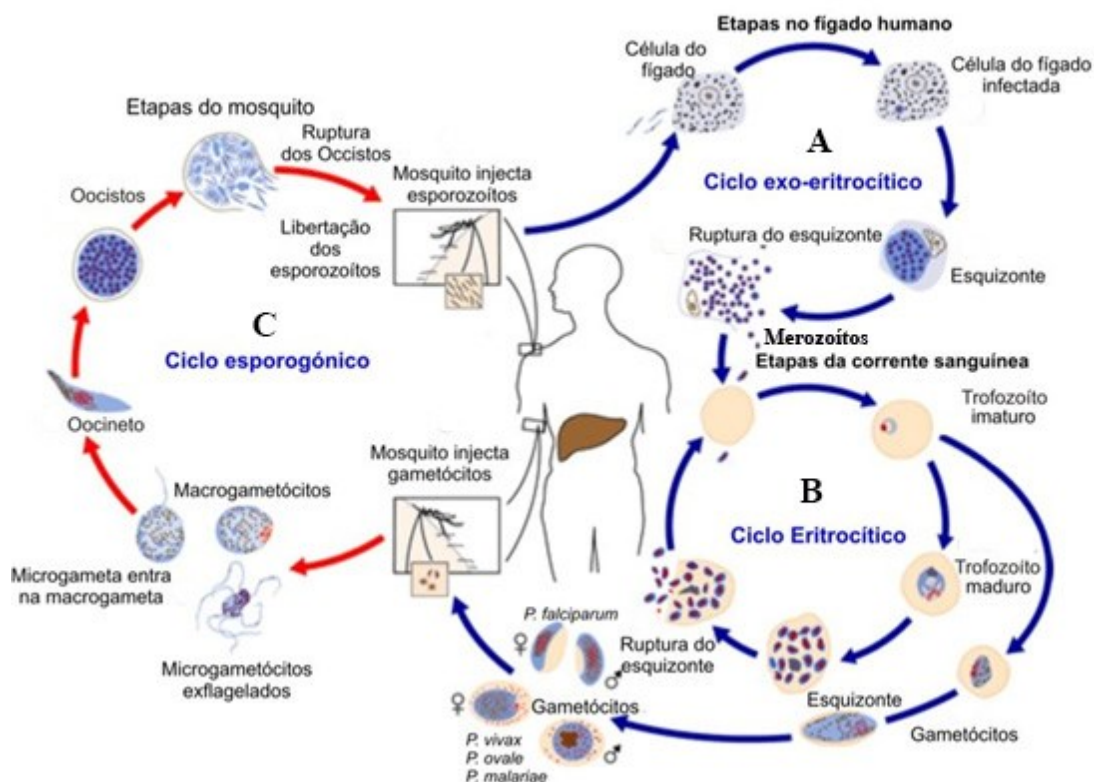


Figura 1. Ciclo biológico da malária. (A) Ciclo exo-eritrocítico e (B) ciclo eritrocítico que ocorrem no hospedeiro vertebrado. (C) Ciclo esporogônico que ocorre no inseto vetor. Fonte: Adaptado de CDC (2024).

Existem uma variedade de espécies de *Plasmodium* que contribuem para a complexidade da malária, sendo o *P. falciparum* o mais letal. Além disso, fatores genéticos humanos e do vetor influenciam a resistência ou susceptibilidade à infecção (COWMAN; CRABB, 2006).

A malária é endêmica em muitas regiões, com fatores climáticos e ambientais desempenhando um papel crucial na transmissão. Intervenções como mosquiteiros impregnados ou não com inseticidas, medicamentos antimaláricos e programas de erradicação, buscam amenizar a propagação da doença (MURRAY et al., 2012). Avanços na compreensão desses aspectos são essenciais para aprimorar as estratégias de controle e erradicação. À medida que novas tecnologias e descobertas emergem, a esperança é que a

pesquisa contribua para a redução do impacto global da malária, melhorando a qualidade de vida em regiões afetadas (BRASIL, 2024). No Brasil, a malária é predominantemente concentrada na região amazônica, representando aproximadamente 99,9% dos casos em 2021. Dentro dessa região, 33 municípios foram responsáveis por mais de 80% do total de casos no país, sendo causada por três espécies de protozoários: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Casos de malária por *P. ovale* podem ocorrer devido à disseminação por pessoas infectadas de outros continentes (BRASIL, 2024b). Em 2022, o Brasil registrou 131.224 casos de malária, indicando uma redução de 6,6% em relação ao ano anterior, que apresentou 140.488 casos notificados. Entre esses, aproximadamente 1,7% (2.256 casos) foram importados de outros países, destacando-se principalmente a América do Sul, com as principais fontes sendo Peru (678 casos), Guiana (529 casos), Venezuela (498 casos) e Bolívia (226 casos) (BRASIL, 2024b).

O período de incubação da malária varia entre 8 e 30 dias, dependendo da espécie de plasmódio: 8-12 dias para *P. falciparum*, 13-17 dias para *P. vivax* e 18-30 dias para *P. malariae*. Os sintomas agudos da malária incluem calafrios, febre e sudorese que podem durar de 6 a 12 horas, com temperatura corporal podendo chegar a 40°C. Não é sempre que ocorre o padrão clássico de febre a cada dois dias. Os episódios também podem vir acompanhados de cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos. Após os primeiros episódios, a febre pode se tornar intermitente e o quadro clínico nem sempre é típico da doença (SAÚDE, 2020). O tratamento da malária visa combater o parasito em etapas-chave do seu ciclo, sendo elas: interrupção da esquizogonia sanguínea destruição de formas latentes do parasito (hipnozoítos), para evitar recaídas; e impedir a transmissão da doença, bloqueando o desenvolvimento de gametócitos (SAÚDE, 2020).

Atualmente, diversas moléculas estão disponíveis ou em desenvolvimento para o tratamento da malária, tais como 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, 4-aminoálcoois, endoperóxidos, antibióticos, antifolatos, naftoquinonas, sulfonamidas e moléculas contendo fragmentos triazol-1,2,3 e triazol-1,2,4 (RAVINDAR et al., 2023). Apesar da redução nas taxas de mortes relacionadas à malária nos últimos anos, o progresso está começando a desacelerar devido à recente resistência à terapia combinada com artemisinina (ACT), tornando urgente a busca por novos medicamentos antimaláricos com mecanismos de ação inovadores (RAVINDAR et al., 2023; TSE; KORSIK; TODD, 2019).

Quando a produção de vacinas para a malária, recentemente, duas vacinas, RTS,S/AS01e R21/Matrix-M, foram recomendadas pela OMS para uso em populações onde a malária é endêmica, porém, estas ainda demonstram eficácia moderada (TAKASHIMA *et al.*, 2024). Avanços recentes indicam que uma abordagem promissora, para interromper o ciclo de vida do parasito da malária em diversas etapas, poderia incluir a combinação de vacinas para a fase pré-eritrocítica, como RTS,S/AS01 ou R21, que têm eficácia parcial, juntamente com vacinas destinadas à fase assexuada da circulação sanguínea. No momento, as vacinas mais avançadas para a fase assexuada da malária são aquelas baseadas no antígeno 1 de membrana apical (AMA1) FMP2.1/AS02A (THERA *et al.*, 2011), e no antígeno proteína 3 de superfície de merozoíto (MSP3) GMZ2 (SIRIMA *et al.*, 2016). Os antígenos utilizados nas vacinas contra a malária, como o AMA1 e o MSP3, são proteínas essenciais para a sobrevivência e ciclo de vida do parasito. Eles desempenham papéis críticos na invasão das células do hospedeiro e na formação do complexo de invasão. Ao direcionar esforços de vacinação para esses antígenos, busca-se induzir uma resposta imunológica que combata eficientemente o parasito. O objetivo é interromper a disseminação do parasito no sangue, reduzindo a carga parasitária e, conseqüentemente, os sintomas da malária e o risco de complicações. Assim, esses antígenos são alvos importantes para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e controle da doença (TAKASHIMA *et al.*, 2024).

Essas vacinas, apesar de terem sido submetidas a ensaios clínicos de fase 2b (testes em pacientes voluntários em um grande grupo amostral), não demonstraram uma eficácia clínica considerável. Conseqüentemente, é necessário empreender esforços imediatos e abrangentes de descoberta genômica para identificação de novos candidatos a vacinas destinadas à fase assexuada da malária (TAKASHIMA *et al.*, 2024).

Os medicamentos de primeira linha para o tratamento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, o tipo mais mortal de malária, consistem de combinações terapêuticas conhecidas como terapias combinadas de artemisinina (ACTs, do inglês “Artemisinin-based Combination Therapies”). Nesse caso, a artemisinina é combinada com outros medicamentos antimaláricos para formar essas combinações. Alguns exemplos de ACTs incluem: Artemether + Lumefantrina (Coartem), Artesunato + Amodiaquina, Dihidroartemisinina + Piperaquina (WHO, 2020). A combinação de artemisinina com

outros medicamentos antimaláricos foi adotada, principalmente, devido à crescente resistência do *P. falciparum* aos medicamentos de primeira linha utilizados anteriormente. A artemisinina tem uma ação rápida contra os parasitos, enquanto os outros medicamentos usados na combinação ajudam a eliminar os parasitos remanescentes e prevenir a resistência (WHO, 2020). A toxicidade dos ACTs é geralmente considerada baixa quando usada corretamente e sob supervisão médica. No entanto, como todos os medicamentos, podem causar efeitos colaterais. Alguns efeitos colaterais comuns incluem náuseas, vômitos, diarreia, tontura e dor de cabeça. Em relação as contraindicações, convém destacar que em crianças, a dosagem e a escolha do medicamento podem variar com base na idade e peso, sendo de grande importância o acompanhamento médico. No caso de gestantes, a segurança do uso de ACTs durante a gravidez ainda é um tópico que requer estudos mais detalhados. Entretanto, dependendo da situação, podem ser usados, mas sob supervisão médica. Para os cardiopatas, algumas combinações podem ter efeitos no sistema cardiovascular, então, é essencial que pessoas com problemas cardíacos sejam cuidadosamente monitoradas durante o tratamento. Pacientes com doença renal devem ser monitorados cuidadosamente, pois a excreção de medicamentos pode ser afetada e a dosagem necessitar de ajuste. Assim, sempre é importante o acompanhamento médico para determinação do tratamento mais adequado, garantindo a segurança do paciente (CDC, 2023).

O aumento contínuo da resistência aos medicamentos de primeira linha, incluindo terapias combinadas com artemisinina, representa uma ameaça aos esforços globais de controle e erradicação da malária. Isso ressalta a urgente necessidade de identificação de novas estratégias e agentes quimioterápicos. Em ambientes de pesquisa experimental, a seleção de medicamentos pode ser explorada para identificação e validação de alvos terapêuticos, compreensão de mecanismos moleculares subjacentes à diminuição na eficácia do tratamento contra parasitos, direcionamento de esforços visando a descoberta de medicamentos e aprimoramento da afinidade, especificidade e seletividade dos inibidores (ARIEY et al., 2014; COWELL et al., 2018).

3. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2024), afeta mais de 350 milhões de pessoas globalmente e apresenta cerca de um milhão de novos casos ao ano. A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos para hospedeiros vertebrados, como humanos e outros animais, através da picada de insetos vetores do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Europa, Ásia, África e partes do Oriente Médio), ou *Lutzomyia*, no Novo Mundo (América do Sul, América Central e América do Norte) (WHO, 2024).

O protozoário *Leishmania* se alterna entre duas principais formas parasitárias, a forma promastigota flagelada e a forma amastigota, com flagelo internalizado. Em seu ciclo de vida, o protozoário pode ser encontrado em dois tipos de hospedeiro: os vertebrados, como seres humanos, e os invertebrados, que é o inseto vetor (Figura 2). No hospedeiro vertebrado, a infecção é iniciada quando uma fêmea do inseto vetor infectada com o parasito pica o hospedeiro vertebrado, introduzindo formas promastigota na corrente sanguínea do hospedeiro. Esses promastigotas são então fagocitados por macrófagos, células do sistema imunológico do hospedeiro. No interior dos macrófagos, os promastigotas são diferenciados em amastigotas, a forma intracelular do parasito. Os amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos que, repletos de parasitos, rompem-se, liberando os amastigotas que infectarão novas células hospedeiras. Dessa forma, com o progresso da infecção, danos teciduais serão observados, levando ao desenvolvimento de sintomas da doença. Quando um inseto vetor pica um hospedeiro vertebrado infectado, ele ingere os amastigotas juntamente com o sangue. No interior do inseto vetor, os amastigotas sofrem transformação para promastigotas no intestino do inseto. Os promastigotas se multiplicam nas glândulas do intestino do vetor e migram para a probóscida (a parte picadora do inseto vetor), onde estão prontos para serem transmitidos para um novo hospedeiro vertebrado durante uma picada (CDC, 2017; NEVES *et al.*, 2005). Alguns animais, como roedores, cães e outros mamíferos, podem servir como reservatórios do parasito, contribuindo para a manutenção do ciclo (CDC, 2017). Sabe-se que fêmeas de flebotomíneos, quando infectadas por parasitos, possuem a habilidade de transmitir mais de 21 espécies de *Leishmania* aos seres humanos (ANVERSA *et al.*, 2018).

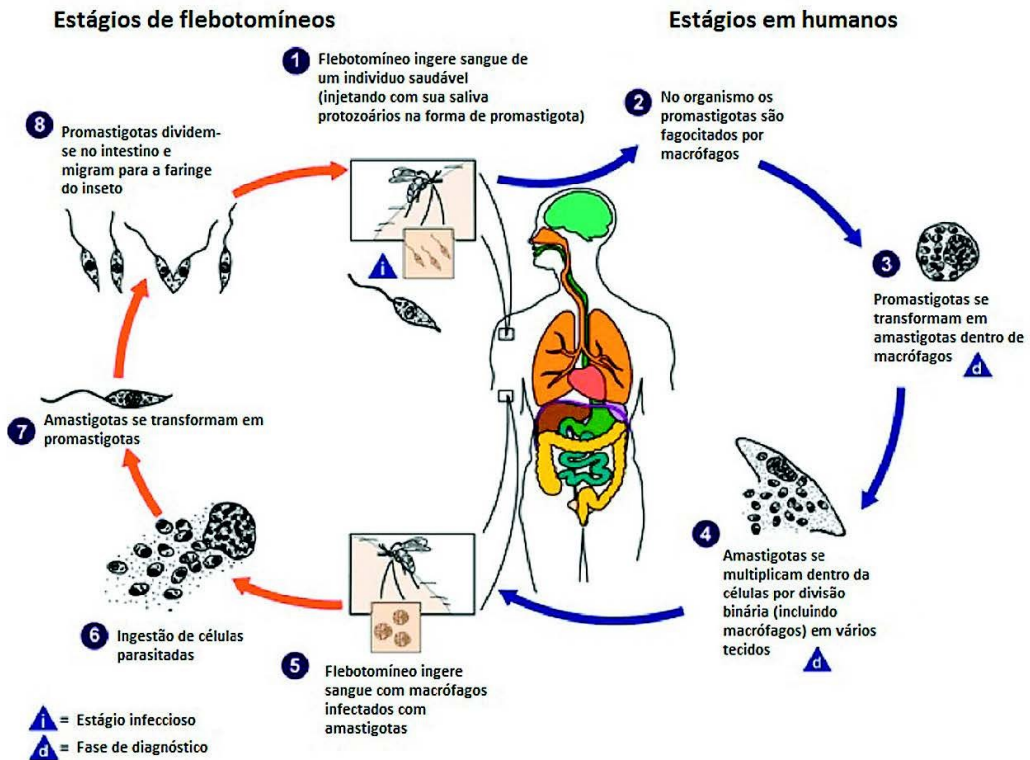


Figura 2 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de CDC (2024).

O curso da infecção varia conforme a espécie de *Leishmania*, as características genéticas do hospedeiro e sua resposta imune. Assim, a doença se divide em duas principais categorias: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV é a forma mais severa da doença e afeta órgãos como fígado e baço, podendo ser fatal se não tratada. Esta forma é também conhecida como calazar. Os sintomas iniciais podem incluir febre de longa duração, fraqueza, perda de peso, anorexia e aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia). À medida que a doença progride, podem ocorrer complicações como anemia, trombocitopenia, leucopenia, distúrbios hemorrágicos e comprometimento do sistema imunológico (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). *Leishmania infantum* (também conhecida como *Leishmania chagasi* nas Américas), é a espécie mais comumente associada à LV nas regiões do Velho Mundo, incluindo países da Europa, África, Ásia e América Latina. No Brasil, é a principal espécie associada à LV. A *Leishmania donovani* é a principal espécie associada à LV encontrada na Europa, Norte da África e América Latina (LUKEŠ *et al.*, 2007).

A LT pode se manifestar de forma cutânea (LC) ou mucocutânea (LMC). A LC é caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele. As lesões geralmente começam como pápulas ou nódulos que se desenvolvem em úlceras cutâneas abertas típicas. As lesões podem ser únicas ou múltiplas, localizadas em áreas expostas ao inseto vetor. As lesões podem ser indolores ou causar dor e coceira. A cicatrização das lesões sem tratamento pode resultar em deformidades e cicatrizes. A LMC ocorre quando a infecção se dissemina das lesões cutâneas para as membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Os sintomas incluem destruição progressiva dos tecidos moles e cartilagosos, resultando em ulcerações nas mucosas nasais, bucais e faríngeas. Assim, essa forma da doença pode levar a deformidades graves, como perda de tecido nasal, erosão do palato e deformidades faciais. A LMC pode ser desfigurante e causar sérios problemas respiratórios e de alimentação. Algumas vezes, infecções secundárias podem estar presentes e agravar o quadro clínico do paciente.

É importante destacar que as manifestações clínicas podem variar de pessoa para pessoa, devido ao caráter imunológico de resposta individual, e dependem da espécie de parasito envolvido na infecção do hospedeiro. O diagnóstico preciso e o tratamento adequado são essenciais para o manejo eficaz da doença. (ANVERSA *et al.*, 2018; BI *et al.*, 2018; MOSIMANN *et al.*, 2018). *Leishmania major* é uma das principais espécies associadas à LT em regiões da África, Ásia e Oriente Médio. *Leishmania tropica* também é comumente associada à LT em regiões do Oriente Médio, África e Ásia. As principais espécies associadas LT e prevalentes no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) lainsoni* (NEVES *et al.*, 2005).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é uma das espécies importantes associadas à LT nas Américas, especialmente no Brasil, uma vez que pode causar a LMC. A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, vem expandindo sua distribuição geográfica no Brasil, o que está associado a apresentações clínicas atípicas, ou seja, que não seguem o padrão típico ou esperado para uma determinada condição médica em áreas de transmissão (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007). Classicamente, a *L. (L.) amazonensis* está associada ao desenvolvimento da forma cutânea da doença. Entretanto, estudos mostram a complexidade da doença que parece ser influenciada por uma combinação de fatores

genéticos do parasito, como modificações em moléculas relacionadas à virulência e ao metabolismo, e pelo histórico e estado imunológico do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2021). Assim, esta espécie tem sido associada com várias apresentações clínicas da doença, incluindo as formas cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e, ainda, existem relatos do desenvolvimento da forma visceral e da leishmaniose dérmica pós-calazar (BARRAL *et al.*, 1986, 1991). A espécie também foi relatada em infecções de cães com manifestações clínicas de leishmaniose visceral em áreas onde *L. (L.) infantum* é endêmica, sugerindo o potencial de adaptação de *L. (L.) amazonensis* a novas áreas endêmicas (VALDIVIA *et al.*, 2017). Além disso, *L. (L.) amazonensis* demonstrou modular as interações hospedeiro-patógeno alterando os perfis de miRNA de macrófagos, o que por sua vez afeta a resposta imune inflamatória do hospedeiro (MUXEL *et al.*, 2017). As características genômicas de *L. (L.) amazonensis*, como níveis moderados de ploidia, alta heterozigosidade e variações estruturais, contribuem para a virulência e sobrevivência do parasito (PATINO *et al.*, 2019). Assim, a capacidade de *L. (L.) amazonensis* em induzir manifestações clínicas variadas da doença em humanos, bem como seu potencial para atravessar a barreira hematoencefálica em infecções experimentais, destaca a necessidade por métodos confiáveis de identificação e mais pesquisas sobre a patogenicidade e tratamento da leishmaniose (ABREU-SILVA *et al.*, 2003; ALEIXO *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 1996).

Em termos epidemiológicos, a leishmaniose é endêmica em várias regiões do Brasil, com diferentes espécies de parasitos e vetores predominantes. Casos, tanto da forma visceral quanto da tegumentar são relatados, sendo a forma visceral uma preocupação de saúde pública em algumas áreas. Cães e outros mamíferos frequentemente atuam como reservatórios do parasito, e várias espécies de flebotomíneos atuam como vetores. As autoridades de saúde têm implementado medidas de controle, incluindo tratamento de casos humanos, controle de reservatórios e programas de controle de vetores (BRASIL, 2024a; WHO, 2024).

Nos últimos 10 anos, o Brasil registrou uma média de 3.379 casos por ano, espalhados por 21 dos 27 estados do país (BRASIL, 2024a). O estado de Mato Grosso (MT) é considerado endêmico para LV, com relatos anuais de casos em humanos e cães de

43,26% (61/141) e 68,79% (97/141) em seus municípios, respectivamente (MATO GROSSO, 2023).

Embora a LV ocorra em uma ampla área geográfica, mais de 90% dos casos estão concentrados em países como Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (ALVAR *et al.*, 2012; WAMAI *et al.*, 2020). Complicações infecciosas e hemorragias são principais fatores de risco para morte por LV. Identificar precocemente pacientes com potencial evolução é crucial para reduzir a letalidade, através de medidas terapêuticas e profiláticas eficazes (BRASIL, 2006).

Entre 2001 e 2021, 17 países da Região das Américas reportaram à Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM), com uma média anual de 52.645 casos. A região andina e o Brasil somaram juntos 896.790 casos, representando 40,79% e 37,60% dos casos na Região, respectivamente. No entanto, durante o mesmo período, a sub-região da América Central apresentou uma incidência média de 32,36 casos por 100.000 habitantes, 83% superior à média regional de 17,67 casos por 100.000 habitantes (SAÚDE, 2022).

A terapêutica contra a leishmaniose enfrenta alguns problemas como contraindicações, alta toxicidade, custos elevados, dificuldades no processo de cicatrização, além de estar associados ao desenvolvimento de resistência por parte do parasito (OLIVEIRA *et al.*, 2011; VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009). Nos tratamentos atualmente utilizados para essas infecções, são utilizadas terapias que incluem o antimônio pentavalente (o principal tratamento medicamentoso), anfotericina B, miltefosina e paromomicina (DOS SANTOS *et al.*, 2023). Embora eficazes, esses medicamentos podem apresentar efeitos colaterais graves como cardiotoxicidade, toxicidade renal, pancreática e hepática, bem como teratogenicidade. Além disso, casos de resistência a medicamentos são comuns, especialmente em relação aos antimoniais pentavalentes usados no tratamento da leishmaniose (PRADHAN *et al.*, 2022).

A falta de eficácia, a considerável toxicidade e/ou a emergência de resistência parasitária aos medicamentos anti-*Leishmania* atualmente disponíveis têm criado uma necessidade urgente de um tratamento seguro e eficaz para a leishmaniose (ORABI *et al.*, 2023). Portanto, é essencial empreender a busca por novos agentes terapêuticos, começando pela identificação e otimização de candidatos a fármacos que tenham como

alvo enzimas ou rotas metabólicas inexistentes em seus hospedeiros. Esse enfoque visa evitar a ocorrência de efeitos colaterais graves (YUNTA *et al.*, 2019). Embora ainda não haja vacina disponível para as leishmanioses em humanos, é recomendável a implementação de medidas educativas e preventivas. Isso inclui o manejo ambiental, como a limpeza de quintais e terrenos, para evitar a formação de locais propícios à proliferação das larvas do inseto vetor (BRASIL, 2024a).

Até o momento, esforços predominantes no desenvolvimento de medicamentos para a leishmaniose têm se concentrado em estratégias farmacológicas voltadas para o direcionamento de vias enzimáticas lipídicas específicas de parasitos *Leishmania*, especialmente aquelas associadas à biossíntese de fosfolipídios e esteróis, bem como à miristoilação (LEROUX *et al.*, 2023). A busca por potenciais alvos terapêuticos, focando em vias bioquímicas e metabólicas, revelou os inibidores da biossíntese de esteroides como uma abordagem promissora. Nesta classe de inibidores, encontramos o cetoconazol, um inibidor clássico da 14 α -metil esterol 14-desmetilase. Esses inibidores levam os parasitos à morte, tornando-os suscetíveis ao tratamento com cetoconazol em modelos *in vitro* (NUNES *et al.*, 2022).

Mais de trezentos milhões de indivíduos estão em situação de vulnerabilidade à leishmaniose, uma enfermidade que faz parte do grupo de doenças parasitárias tropicais negligenciadas, e que está fortemente vinculada à condição de pobreza. Esta doença resulta em aproximadamente trinta mil óbitos a cada ano, conforme destacado por Alvar *et al.*, (2012). Para intensificar esse quadro, em contraste com outras doenças que resultam em óbitos e recebem atenção e financiamento para pesquisa em países em desenvolvimento, as doenças tropicais negligenciadas, entre as quais a leishmaniose se inclui, representam uma categoria de enfermidades infecciosas com escasso investimento na busca por novos medicamentos e em ações direcionadas ao controle da doença (DE VLAS *et al.*, 2016; LINDOSO; LINDOSO, 2009). A leishmaniose é particularmente preocupante devido à sua transmissão complexa e à falta de uma vacina eficaz. Além disso, as condições socioeconômicas incertas e o deslocamento da população em áreas endêmicas tornam o controle da doença um grande desafio. Portanto, compreender a leishmaniose, seus vetores e suas diversas manifestações clínicas é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento. A investigação contínua nesta

área é essencial para reduzir o impacto desta doença nas comunidades vulneráveis e melhorar a saúde global.

4. N-Miristoiltransferase (NMT)

Devido as dificuldades no combate às doenças tropicais parasitárias e malária, associadas principalmente a resistência a medicamentos, novos alvos biológicos vêm sendo identificados visando a busca de fármacos eficientes contra a doença. Um dos alvos mais proeminentes da atualidade é a N-miristoiltransferase (NMT). A NMT em eucariotos foi descrita pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* (TOWLER, et al., 1987a). A enzima é responsável pela adição de um grupo de miristoil à extremidade N-terminal de certas proteínas de modo mais específico, a enzima catalisa a transferência do ácido graxo C14:0 ligado a Coenzima A (miristoil-CoA) para o aminoácido glicina N-terminal da cadeia polipeptídica. (SONNENBURG; GORDON, 2013). A adição do grupo miristoil, denominada N-miristoilação, pode acontecer tanto após o processo de tradução proteica (pós-traducional) quanto durante a tradução (co-traducional) (Figura 3) (TOWLER, et al., 1987a; TOWLER, et al., 1987b). A miristoilação co-traducional é a mais comum e acontece quando cerca de 100 resíduos já foram adicionados a cadeia polipeptídica nascente e ainda ligada ao ribossomo. Então, o resíduo metionina iniciador é removido por uma metionina aminopeptidase, expondo a glicina N-terminal. A miristoilação pós-traducional é menos frequente e requer a exposição de uma glicina interna pela clivagem de proteínas pró-apoptóticas após a ação de caspases (WRIGHT et al., 2010).

A N-miristoilação estabiliza a interação proteína-proteína, o que muitas vezes é essencial para a expressão completa da função biológica da proteína miristoilada (PRICE et al., 2003). Além disso, a adição do grupo miristoil é importante para a correta localização da proteína em nível celular, uma vez que muitas proteínas miristoiladas estão associadas com membranas celulares, tais como glicoproteínas ancoradas via GPI (glicosilfosfatidilinositol). Ainda, a miristoilação de proteínas é uma modificação crucial, conservada evolutivamente, envolvida em vários processos fisiológicos. O papel da NMT na mediação das respostas imunes inatas e adaptativas tornou-se cada vez mais evidente, com avanços nos modelos de estudo, a exploração adicional do envolvimento intrínseco da

NMT nos processos imunológicos promete fornecer informações valiosas também no campo da imunologia (UDENWOBELE *et al.*, 2017).

Proteínas miristoiladas também estão envolvidas com inúmeros processos biológicos como a sinalização e regulação celular, via subunidade α de várias proteínas G e proteínas quinases dependentes de c-AMP (GAFFAROGULLARI *et al.*, 2011; MUMBY *et al.*, 1990). Para *S. cerevisiae*, a miristoilação de proteínas é validada como um processo essencial. Esse processo também é primordial para outros fungos como *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* (DURONIO *et al.*, 1989; LODGE *et al.*, 1994). Dessa forma, a NMT de fungos tem sido um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. A NMT também está associada como um importante alvo quimioterápico em parasitos protozoários como *Trypanosoma brucei* (FREARSON *et al.*, 2010; HERRERA *et al.*, 2016), *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum* (BOWYER *et al.*, 2007; BRANNIGAN *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010). No caso desses parasitos, a enzima mostra-se essencial para a viabilidade celular, indicando o importante papel da N-miristoilação em proteínas envolvidas com processos biológicos essenciais (RITZEFELD; WRIGHT; TATE, 2018; ROBERTS *et al.*, 2014; SCHLOTT; HOLDER; TATE, 2018a). Estudos tem mostrado a associação de proteínas miristoiladas de *Toxoplasma gondii* no processo de invasão na célula hospedeira (BRONCEL *et al.*, 2020). Em *P. falciparum*, o bloqueio de proteínas N-miristoiladas impede o desenvolvimento da forma intraeritrocítica, bem como interfere com o processo de invasão em eritrócitos (SCHLOTT *et al.*, 2021). A NMT, portanto, desempenha um papel crucial na sobrevivência desses parasitos, bem como com o processo de interação com o hospedeiro e, dessa forma, apresenta implicações importantes para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias.

A NMT tem sido estudada em testes *in silico* e *in vitro* como um possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra parasitos do gênero *Plasmodium* (NICOLAU *et al.*, 2023; PRICE *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2014). Nas leishmanioses, o desenvolvimento orientado por estruturas de novos compostos líderes a partir de campanhas de triagem de alto rendimento direcionadas à NMT de *L. donovani* tem resultado na descoberta de potentes inibidores. Esses inibidores têm fornecido informações importantes sobre o papel da miristoilação de proteínas nesses parasitas e contribuíram,

inclusive, na validação da NMT como um alvo terapêutico (BRANNIGAN; WILKINSON, 2021).

Muitas proteínas miristoiladas do parasito são essenciais para a sobrevivência e virulência deste parasito, uma vez que desempenham papéis importantes em processos celulares, como sinalização, transporte de membrana e interações com o hospedeiro (PRICE *et al.*, 2003).

A inibição da atividade da NMT em *Leishmania* tem sido investigada como uma possível estratégia para o desenvolvimento de medicamentos anti-*Leishmania*. Ao prevenir a miristoilação de proteínas essenciais, os investigadores esperam afetar ou causar a morte do parasito sem, no entanto, afetar as células hospedeiras, o que resultaria em efeitos colaterais reduzidos (PRICE *et al.*, 2003). Machado e colaboradores (2019) em seu trabalho de revisão descrevem a importância de novas estratégias, visando o suporte na pesquisa de novos medicamentos antiparasitários, como o uso da modelagem molecular e nanotecnologia, cujos alvos principais foram proteases de parasitos *Leishmania*, classe enzimática fundamental para processos fisiológicos e patológicos do parasito, sendo, portanto, um importante alvo terapêutico. Da mesma forma, a validação de novos alvos parasitários é de grande valia para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A NMT permanece como um dos poucos alvos de medicamentos validados com robustez nos tripanossomatídeos, tendo sido confirmada como geneticamente essencial para a sobrevivência de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* sp (CORPAS-LOPEZ *et al.*, 2019).

Estudos de marcação metabólica identificaram cerca de 10 proteínas marcadas com [3H]miristato em *L. major*, incluindo proteínas importantes para estágios infectivos do parasito e proteínas hidrofóbicas aciladas de superfície (HASPs). A proteína HASPB, uma candidata a vacina para leishmaniose visceral, requer miristoilação e palmitoilação para que esta seja translocada para a membrana plasmática do parasito. (PRICE *et al.*, 2003). Ainda, o miristato é componente lipídico de âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI) nas quais importantes componentes de superfície de tripanossomatídeos, como glicoproteínas, lipofosfoglicanos e glicolipídeos, estão ancoradas. No caso da *Leishmania*, o GPI contendo miristato está presente em glicolipídeos do tipo glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) associados com a infectividade do parasito (RALTON; MCCONVILLE, 1998). Estudos de modelagem molecular mostraram recentemente que a NMT de *Leishmania* (*Viannia*)

panamensis pode ser o provável alvo de uma cumarina, denominada composto 6, que mostrou um potente efeito anti-*Leishmania* contra a forma amastigota do parasito (YEPES *et al.*, 2024).

A presença da NMT foi confirmada em *L. major* em 1997 (MCKEAN *et al.*, 1997). Posteriormente, descobriu-se que a enzima está associada com a viabilidade do parasito (PRICE *et al.*, 2003). A deleção no gene da NMT mostrou que a enzima é também essencial para a propagação de *L. donovani* no hospedeiro, uma vez que parasitos com deleção no gene promoveram menor carga parasitária no fígado e baço em modelos animais de infectividade quando comparados com parasitos expressando a NMT (BRANNIGAN *et al.*, 2010). O uso de análogos de miristato (considerados inibidores não específicos da NMT) em *L. major* resultou em interferência na viabilidade e proliferação de formas promastigota do parasito. Além disso, mudanças morfológicas extensivas foram observadas, tais como arredondamento do corpo do parasito e alterações em organelas intracelulares, além de efeito sobre a motilidade flagelar (PRICE *et al.*, 2003). Entretanto, a redução na viabilidade devido aos análogos do miristato não puderam ser correlacionados com redução da N-miristoilação em proteínas alvos, uma vez que, em parasitos *Leishmania*, tais análogos promoveriam interferência na biossíntese de outros compostos, além de proteínas alvo de miristoilação, como âncoras de GPI, glicolípídeos (GIPLs).

Estudos bioquímicos visando a caracterização da NMT em *L. major* mostraram que o gene da NMT expressa uma proteína de 45,8kDa tanto no promastigota quanto no amastigota e que a enzima está presente tanto na membrana quanto no citosol. Porém, mais de 70% da NMT mostra-se associada à membrana plasmática do parasito (PRICE *et al.*, 2003). A clonagem, expressão e purificação da NMT de *L. donovani* (LdNMT) em *Escherichia coli* permitiu a caracterização estrutural e de suas propriedades de ligação ao ligante e atividade enzimática. Esses estudos validaram a NMT de *L. donovani* como um alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra a leishmaniose visceral (BRANNIGAN *et al.*, 2010).

Para *P. falciparum*, mais de trinta proteínas N-miristoiladas foram identificadas em esquizontes eritrocíticos (WRIGHT *et al.*, 2014). Tais proteínas estão envolvidas em uma ampla gama de vias bioquímicas e celulares incluindo: transporte de proteínas, secreção, regulação de canais iônicos e homeostase de proteínas. Além disso, proteínas miristoiladas

estão associadas com a formação do complexo de membrana interna, localizado abaixo da membrana plasmática, associado com sua motilidade e desenvolvimento. Em relação as funções biológicas, essas proteínas variam de hidrolases, quinases e fosfatases, envolvidos com o complexo motor do parasito e, portanto, essencial para impulsionar o processo de invasão (SCHLOTT; HOLDER; TATE, 2018b; WRIGHT *et al.*, 2014).

Em conjunto, as informações, aqui apresentadas, demonstram que a busca por inibidores da NMT constitui uma importante área de pesquisa para o tratamento de doenças nas quais a NMT mostra-se relevante, uma vez que podem fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de terapias eficazes. O potencial de direcionamento da NMT como alvo de medicamentos em doenças como malária e leishmaniose, é um tema de grande relevância.

Portanto, o desafio reside na identificação de novas moléculas com potencial contra tais parasitos. O uso de técnicas *in silico* pode reduzir o tempo e os custos associados ao desenvolvimento de novos medicamentos (RAO; SRINIVAS, 2011) e, dessa forma, mostra-se como uma relevante ferramenta para a elucidação de alvos e descoberta de novas abordagens terapêuticas. A modelagem de farmacóforos, o *docking* e a dinâmica molecular no *design* de pequenos ligantes, e a busca de potenciais fármacos contra estas doenças, pode ser vantajoso e abrir possibilidades para novas abordagens no tratamento.

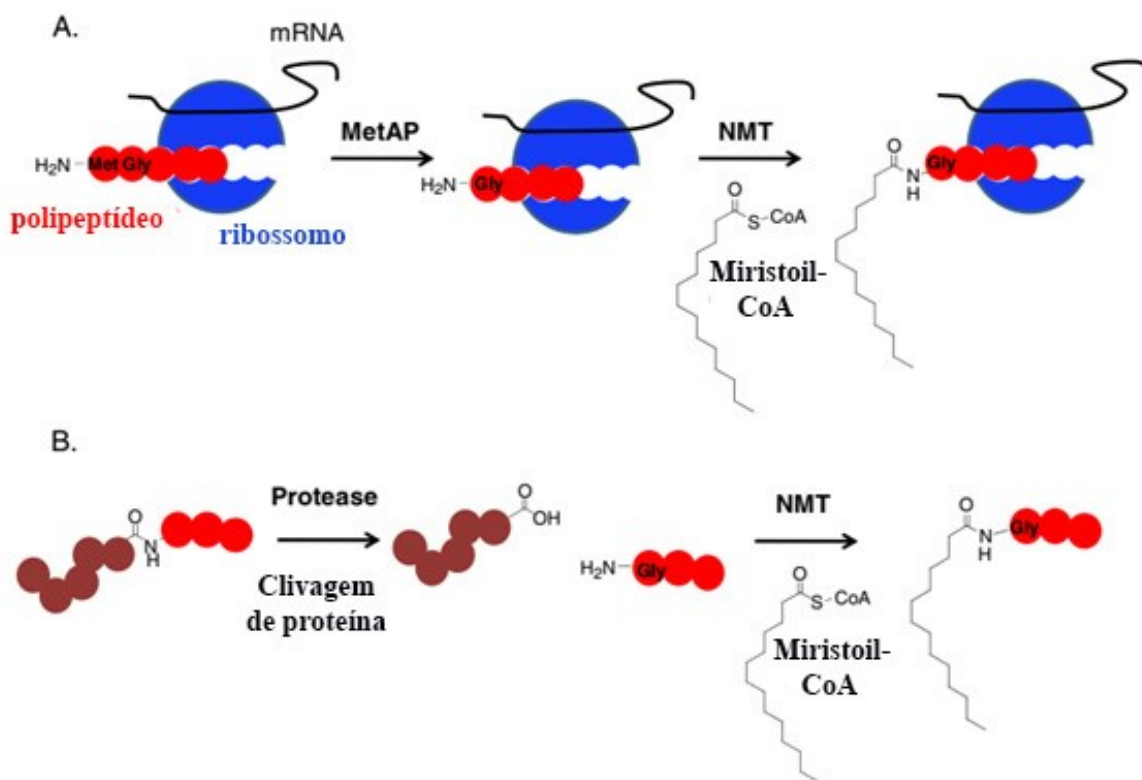


Figura 3 – Miristoilação co-traducional (A) e pós-traducional (B). MetAP, metionina aminopeptidase

5. Métodos computacionais em desenvolvimento de fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo e custoso, que demanda a integração de diversas técnicas e conhecimentos. Neste contexto, o Design de Medicamentos Auxiliado por Computador (CADD) tem se estabelecido como uma ferramenta essencial na descoberta e no desenho de novas moléculas terapêuticas. O CADD abrange uma série de métodos computacionais que auxiliam na identificação e otimização de compostos com potencial farmacológico, reduzindo o tempo e os custos associados ao desenvolvimento de drogas (HASSAN BAIG *et al.*, 2016). Dentre as abordagens utilizadas no CADD, os modelos farmacofóricos representam uma estratégia chave na identificação de características estruturais essenciais para a atividade biológica. Esses modelos são construídos a partir do conhecimento das propriedades físico-químicas e da configuração espacial de moléculas que interagem com alvos biológicos específicos,

permitindo a predição da atividade de novos ligantes baseada em sua similaridade ou dissimilaridade com ligantes conhecidos (SLIWOSKI *et al.*, 2014).

O *docking* molecular é outra técnica fundamental no CADD, que simula a interação entre um ligante e seu receptor proteico. Esta abordagem permite a identificação de compostos candidatos a partir de grandes bibliotecas de pequenas moléculas, através do cálculo de suas conformações e orientações ótimas dentro do sítio de ligação do alvo biológico. O *docking* é frequentemente utilizado em conjunto com simulações de dinâmica molecular para refinar os complexos ligante-receptor e incluir efeitos de solvente e ajuste induzido (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006; MOITESSIER *et al.*, 2004). A dinâmica molecular (MD), por sua vez, oferece uma visão detalhada da flexibilidade do sítio de ligação e da interação ligante-receptor ao longo do tempo. Esta técnica é particularmente útil para a caracterização de sítios de ligação flexíveis e para a avaliação precisa de caminhos de ligação, cinética e termodinâmica. A MD pode ser aplicada durante a preparação do receptor antes do *docking*, para otimizar sua estrutura, ou após o *docking*, para refinar a estrutura do complexo e calcular energias livres de ligação (RODRIGUEZ-BUSSEY; DOSHI; HAMELBERG, 2016; ŚLEDŹ; CAFLISCH, 2018).

O sucesso do CADD depende da integração eficaz dessas e de outras técnicas, como a modelagem por homologia, o uso de bases de dados de alvos/ligantes e a predição de toxicidade e propriedades fisiológicas otimizadas. A combinação de métodos baseados na estrutura do alvo e na estrutura do ligante, juntamente com ferramentas computacionais avançadas, tem permitido avanços significativos na descoberta de novos fármacos (CROSS; CRUCIANI, 2010; HECHT; FOGEL, 2009; TABESHPOUR *et al.*, 2018; YU-CHIAN CHEN, 2013). Em resumo, o CADD é uma abordagem multidisciplinar que integra modelos farmacofóricos, *docking* molecular e dinâmica molecular para acelerar e tornar mais eficiente o processo de descoberta de novos fármacos. Através da simulação e análise computacional, é possível prever a atividade de compostos, otimizar suas propriedades e antecipar desafios farmacocinéticos, contribuindo significativamente para o avanço da farmacologia moderna.

6. Referências Bibliográficas

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K.; TEDESCO, R.; MORTARA, R.; COSTA, S. C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 68 6, p. 661–665, 2003. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.661>

ALEIXO, J.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M. O.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERONIMO, S. M. B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 100 1, p. 79–82, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.025>

ALMEIDA, R. P.; BARRAL, A.; FREITAS, L. A. R. de; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M.; JESUS, A. M. R. de. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 54 2, p. 178–184, 1996. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.178>

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, vol. 26, nº 5, p. 531–568, 1 set. 2006. <https://doi.org/10.1002/med.20067>

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DE BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, vol. 7, nº 5, 31 maio 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

ANVERSA, L. s.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. nia B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, vol. 64, nº 3, p. 281–289, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>

ARIEY, F.; WITKOWSKI, B.; AMARATUNGA, C.; BEGHAIN, J.; LANGLOIS, A. C.; KHIM, N.; KIM, S.; DURU, V.; BOUCHIER, C.; MA, L.; LIM, P.; LEANG, R.; DUONG, S.; SRENG, S.; SUON, S.; CHUOR, C. M.; BOUT, D. M.; MÉNARD, S.; ROGERS, W. O.; MÉNARD, D. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, vol. 505, nº 7481, p. 50–55, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature12876>

AZEREDO-COUTINHO, R. B. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L. P.; MADEIRA, M. F.; PACHECO, R. S.; VALETE-ROSALINO, C. M.; MENDONÇA, S. C. F. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 101, nº 7, p. 735–737, jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.01.005>

BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI, G.; MOMEM, H.; CARVALHO, E. M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 35, no. 4, p. 732–734, 1986. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.732>

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.; JOHNSON, W. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 44 5, p. 536–546, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.536>

BOWYER, P. W.; GUNARATNE, R. S.; GRAINGER, M.; WITHERS-MARTINEZ, C.; WICKRAMSINGHE, S. R.; TATE, E. W.; LEATHERBARROW, R. J.; BROWN, K. A.; HOLDER, A. A.; SMITH, D. F. Molecules incorporating a benzothiazole core scaffold inhibit the N-myristoyltransferase of *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Journal**, vol. 408, nº 2, p. 173–180, 14 nov. 2007. <https://doi.org/10.1042/BJ20070692>

BRANNIGAN, J. A.; SMITH, B. A.; YU, Z.; BRZOZOWSKI, A. M.; HODGKINSON, M. R.; MAROOF, A.; PRICE, H. P.; MEIER, F.; LEATHERBARROW, R. J.; TATE, E. W.; SMITH, D. F.; WILKINSON, A. J. N-Myristoyltransferase from *Leishmania donovani*: Structural and Functional Characterisation of a Potential Drug Target for Visceral Leishmaniasis. **Journal of Molecular Biology**, vol. 396, nº 4, p. 985–999, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.032>

BRANNIGAN, J. A.; WILKINSON, A. J. Drug discovery in leishmaniasis using protein lipidation as a target. **Biophysical Reviews**, vol. 13, nº 6, p. 1139–1146, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00855-0>

BRASIL. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. [S. l.]: MS, 2006.

BRASIL. **Leishmanioses: Ministério da Saúde alerta para prevenção**, Ministério da Saúde. 28 fev. 2024a. Disponível em: www.gov.br. Acessado em: 29 fev. 2024.

BRASIL. **Ministério da saúde Boletim Epidemiológico**. [S. l.: s. n.], 2024b. Disponível em: www.gov.br. Acessado em: 20 jan. 2024.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, vol. 9, 12 mar. 2021. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286>

BRONCEL, M.; DOMINICUS, C.; VIGETTI, L.; NOFAL, S. D.; BARTLETT, E. J.; TOUQUET, B.; HUNT, A.; WALLBANK, B. A.; FEDERICO, S.; MATTHEWS, S.; YOUNG, J. C.; TATE, E. W.; TARDIEUX, I.; TREECK, M. Profiling of myristoylation in *Toxoplasma gondii* reveals an N-myristoylated protein important for host cell penetration. **eLife**, vol. 9, p. 1–38, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.57861>

CDC. **Leishmaniasis**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acessado em: 28 abr. 2024.

CDC. **Treatment of Malaria: Guidelines for Clinicians (United States)**. [S. l.: s. n.], 2023.

CORPAS-LOPEZ, V.; MONIZ, S.; THOMAS, M.; WALL, R. J.; TORRIE, L. S.; ZANDER-DINSE, D.; TINTI, M.; BRAND, S.; STOJANOVSKI, L.; MANTHRI, S.; HALLYBURTON, I.; ZUCCOTTO, F.; WYATT, P. G.; DE RYCKER, M.; HORN, D.; FERGUSON, M. A. J.; CLOS, J.; READ, K. D.; FAIRLAMB, A. H.; ... WYLLIE, S. Pharmacological Validation of N-Myristoyltransferase as a Drug Target in *Leishmania donovani*. **ACS Infectious Diseases**, vol. 5, n° 1, p. 111–122, 1 nov. 2019. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00226>

COWELL, A. N.; ISTVAN, E. S.; LUKENS, A. K.; GOMEZ-LORENZO, M. G.; VANAERSCHOT, M.; SAKATA-KATO, T.; FLANNERY, E. L.; MAGISTRADO, P.; OWEN, E.; ABRAHAM, M.; LAMONTE, G.; PAINTER, H. J.; WILLIAMS, R. M.; FRANCO, V.; LINARES, M.; ARRIAGA, I.; BOPP, S.; COREY, V. C.; GNÄDIG, N. F.; WINZELER, E. A. **Mapping the malaria parasite druggable genome by using in vitro evolution and chemogenomics**. [*S. l.: s. n.*], 2018. <https://doi.org/10.1101/139386>

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, vol. 124, n° 4, p. 755–766, 24 fev. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>

CROSS, S.; CRUCIANI, G. Grid-derived structure-based 3D pharmacophores and their performance compared to docking. **Drug Discovery Today: Technologies**, vol. 7, n° 4, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2010.09.002>

DE VLAS, S. J.; STOLK, W. A.; LE RUTTE, E. A.; HONTELEZ, J. A. C.; BAKKER, R.; BLOK, D. J.; CAI, R.; HOUWELING, T. A. J.; KULIK, M. C.; LENK, E. J.; LUYENDIJK, M.; MATTHIJSSE, S. M.; REDEKOP, W. K.; WAGENAAR, I.; JACOBSON, J.; NAGELKERKE, N. J. D.; RICHARDUS, J. H. Concerted Efforts to Control or Eliminate Neglected Tropical Diseases: How Much Health Will Be Gained? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 10, n° 2, 18 fev. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004386>

DOS SANTOS, J. V; MEDINA, J. M.; DIAS TEIXEIRA, K. L.; CHOREV, M.; DIOTALLEVI, A.; AKTAS, B. H.; GALLUZZI, L.; LOPES, U. G. Activity of the Di-

Substituted Urea-Derived Compound I-17 in *Leishmania* Infections. 2023.
<https://doi.org/10.20944/preprints202309.1754.v1>

DURONIO, R. J.; TOWLER, D. A.; HEUCKEROTH, R. O.; GORDON, J. I. Disruption of the Yeast N-Myristoyl Transferase Gene Causes Recessive Lethality. **Science**, vol. 243, nº 4892, p. 796–800, 10 fev. 1989. <https://doi.org/10.1126/science.2644694>

FREARSON, J. A.; BRAND, S.; MCELROY, S. P.; CLEGHORN, L. A. T.; SMID, O.; STOJANOVSKI, L.; PRICE, H. P.; GUTHER, M. L. S.; TORRIE, L. S.; ROBINSON, D. A.; HALLYBURTON, I.; MPAMHANGA, C. P.; BRANNIGAN, J. A.; WILKINSON, A. J.; HODGKINSON, M.; HUI, R.; QIU, W.; RAIMI, O. G.; VAN AALTEN, D. M. F.; ... WYATT, P. G. N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. **Nature**, vol. 464, nº 7289, p. 728–732, 1 abr. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08893>

GAFFAROGULLARI, E. C.; MASTERSON, L. R.; METCALFE, E. E.; TRAASETH, N. J.; BALATRI, E.; MUSA, M. M.; MULLEN, D.; DISTEFANO, M. D.; VEGLIA, G. A Myristoyl/Phosphoserine Switch Controls cAMP-Dependent Protein Kinase Association to Membranes. **Journal of Molecular Biology**, vol. 411, nº 4, p. 823–836, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.034>

GENEVA. **Report of the seventeenth meeting of the Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases**. [S. l.: s. n.], 2023.

HASSAN BAIG, M.; AHMAD, K.; ROY, S.; MOHAMMAD ASHRAF, J.; ADIL, M.; HARIS SIDDIQUI, M.; KHAN, S.; AMJAD KAMAL, M.; PROVAZNÍK, I.; CHOI, I. **Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Computer Aided Drug Design: Success and Limitations**. [S. l.: s. n.], 2016. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151125000550>

HECHT, D.; FOGEL, G. B. **Computational Intelligence Methods for Docking Scores**. [S. l.: s. n.], 2009. <https://doi.org/10.2174/157340909787580863>

HERRERA, L. J.; BRAND, S.; SANTOS, A.; NOHARA, L. L.; HARRISON, J.; NORCROSS, N. R.; THOMPSON, S.; SMITH, V.; LEMA, C.; VARELA-RAMIREZ, A.;

GILBERT, I. H.; ALMEIDA, I. C.; MALDONADO, R. A. Validation of N-myristoyltransferase as Potential Chemotherapeutic Target in Mammal-Dwelling Stages of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 10, n° 4, 29 abr. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004540>

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; EHRLICH SACHS, S.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. **Control of Neglected Tropical Diseases**. [S. l.: s. n.], 2007. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064142>

LEROUX, M.; LUQUAIN-COSTAZ, C.; LAWTON, P.; AZZOUZ-MAACHE, S.; DELTON, I. Fatty Acid Composition and Metabolism in *Leishmania* Parasite Species: Potential Biomarkers or Drug Targets for Leishmaniasis? **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 24, n° 5, 1 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24054702>

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, vol. 51, n° 5, p. 247–253, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000500003>

LODGE, J. K.; JOHNSON, R. L.; WEINBERG, R. A.; GORDON, J. I. Comparison of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferases from three pathogenic fungi: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, and *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, n° 4, p. 2996–3009, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42038-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42038-2)

LUKEŠ, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNAN, G.; DUJARDIN, J.-C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.-P.; KUHL, K.; WILBER QUISPE TINTAYA, K.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁ, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. **Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy**. [S. l.: s. n.], 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>

MACHADO, P. de A.; CARNEIRO, M. P. D.; SOUSA-BATISTA, A. de J.; LOPES, F. J. P.; LIMA, A. P. C. de A.; CHAVES, S. P.; SODERO, A. C. R.; DE MATOS GUEDES, H.

L. Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. **Life Sciences**, vol. 219, p. 163–181, 15 fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.015>

MATO GROSSO. Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso. Sistema Nacional de Notificação de Agravos. 2023. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br>. Acessado em: 4 ago. 2023.

MCKEAN, P. G.; DELAHAY, R.; PIMENTA, P. F. P.; SMITH, D. F. **MOLECULAR BIOCHEMICAL Characterisation of a second protein encoded by the differentially regulated LmcDNA16 gene family of *Leishmania major* 1.** [S. l.: s. n.], 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)02829-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)02829-6)

MOITESSIER, N.; HENRY, C.; MAIGRET, B.; CHAPLEUR, Y. Combining Pharmacophore Search, Automated Docking, and Molecular Dynamics Simulations as a Novel Strategy for Flexible Docking. Proof of Concept: Docking of Arginine–Glycine–Aspartic Acid-like Compounds into the $\alpha\beta 3$ Binding Site. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 47, n° 17, p. 4178–4187, 1 ago. 2004. <https://doi.org/10.1021/jm0311386>

MUMBY, S. M.; HEUKEROTHT, R. 0; GORDONT\$, J. I.; GILMAN, A. G. **G-protein a-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells (protein N-myristoylation/fatty acid analog).** [S. l.: s. n.], 1990. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.2.728>

MURRAY, C. J. L.; ROSENFELD, L. C.; LIM, S. S.; ANDREWS, K. G.; FOREMAN, K. J.; HARING, D.; FULLMAN, N.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; LOPEZ, A. D. Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis. **The Lancet**, vol. 379, n° 9814, p. 413–431, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60034-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60034-8)

MUXEL, S.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R.; FLOETER-WINTER, L. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, vol. 7, p., 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44141>

NASCIMENTO, I. J. dos S.; CAVALCANTI, M. de A. T.; DE MOURA, R. O. Exploring N-myristoyltransferase as a promising drug target against parasitic neglected tropical diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 258, 5 out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115550>

NEVES, D.; LANE DE MELO, A.; MARCOS LINARDI, P.; W. ALMEIDA VITOR, R. **Parasitologia Humana**. [S. l.: s. n.], 2005.

NICOLAU, M. S. P.; RESENDE, M. A.; SERAFIM, P.; LIMA, G. Y. P.; UEIRA-VIEIRA, C.; NICOLAU-JUNIOR, N.; YONEYAMA, K. A. G. Identification of potential inhibitors for N-myristoyltransferase (NMT) protein of *Plasmodium vivax*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, vol. 41, nº 15, p. 7019–7031, 2023. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2114942>

NUNES, D. C. de O. S.; COSTA, M. S.; BISPO-DA-SILVA, L. B.; FERRO, E. A. V.; ZÓIA, M. A. P.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. de M.; YONEYAMA, K. A. G. Mitochondrial dysfunction on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induced by ketoconazole: insights into drug mode of action. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 117, 2022. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210157>

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, vol. 118, nº 2, p. 87–96, maio 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>

ORABI, M. A. A.; ALSHAHRANI, M. M.; SAYED, A. M.; ABOUELELA, M. E.; SHAABAN, K. A.; ABDEL-SATTAR, E. S. Identification of Potential Leishmania N-Myristoyltransferase Inhibitors from *Withania somnifera (L.) Dunal*: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Investigation. **Metabolites**, vol. 13, nº 1, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13010093>

PATINO, L. H.; MUSKUS, C.; MUÑOZ, M.; RAMÍREZ, J. Genomic analyses reveal moderate levels of ploidy, high heterozygosity and structural variations in a Colombian

isolate of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Acta tropica**, p. 105296, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105296>

PRADHAN, S.; SCHWARTZ, R. A.; PATIL, A.; GRABBE, S.; GOLDUST, M. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, vol. 47, n° 3, p. 516–521, 1 mar. 2022. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>

PRICE, H. P.; GÜTHER, M. L. S.; FERGUSON, M. A. J.; SMITH, D. F. Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase depletion in trypanosomes causes avirulence and endocytic defects. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 169, n° 1, p. 55–58, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.09.006>

PRICE, H. P.; MENON, M. R.; PANETHYMITAKI, C.; GOULDING, D.; MCKEAN, P. G.; SMITH, D. F. Myristoyl-CoA:Protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, n° 9, p. 7206–7214, 28 fev. 2003a. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211391200>

RALTON, J. E.; MCCONVILLE, M. J. Delineation of three pathways of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana*. Precursors from different pathways are assembled on distinct pools of phosphatidylinositol and undergo fatty acid remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 273, n° 7, p. 4245–4257, 13 fev. 1998. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.4245>

RAO, V. S.; SRINIVAS, K. Modern drug discovery process: An *in silico* approach. **Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis**, vol. 2, n° 5, p. 89–94, 2011. <https://doi.org/10.5897/JBSA.9000016>

RAVINDAR, L.; HASBULLAH, S. A.; RAKESH, K. P.; HASSAN, N. I. Triazole hybrid compounds: A new frontier in malaria treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 259, 5 nov. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115694>

RITZEFELD, M.; WRIGHT, M. H.; TATE, E. W. New developments in probing and targeting protein acylation in malaria, leishmaniasis and African sleeping sickness.

Parasitology, vol. 145, nº 2 ed. 2017/03/08, p. 157–174, 2018.
<https://doi.org/10.1017/S0031182017000282>

ROBERTS, A. J.; TORRIE, L. S.; WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Biochemical and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* N-myristoyltransferase. **Biochemical Journal**, vol. 459, nº 2, p. 323–332, 15 abr. 2014. <https://doi.org/10.1042/BJ20131033>

RODRIGUEZ-BUSSEY, I. G.; DOSHI, U.; HAMELBERG, D. Enhanced molecular dynamics sampling of drug target conformations. **Biopolymers**, vol. 105, nº 1, p. 35–42, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1002/bip.22740>

SAÚDE, M. DA. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. 1ª. Brasília: [s. n.], 2020. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_.

SAÚDE, O. P.-A. da. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. No 11 (Dezembro de 2022). Epidemiological Report of the Americas, Washington, D.C., 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>.

SCHLOTT, A. C.; HOLDER, A. A.; TATE, E. W. N-Myristoylation as a Drug Target in Malaria: Exploring the Role of N-Myristoyltransferase Substrates in the Inhibitor Mode of Action. **ACS Infectious Diseases**, vol. 4, nº 4, p. 449–457, 13 abr. 2018. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00203>

SCHLOTT, A. C.; KNUEPFER, E.; GREEN, J. L.; HOBSON, P.; BORG, A. J.; MORALES-SANFRUTOS, J.; PERRIN, A. J.; MACLACHLAN, C.; COLLINSON, L. M.; SNIJDERS, A. P.; TATE, E. W.; HOLDER, A. A. Inhibition of protein N-myristoylation blocks *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development, egress and invasion. **PLoS Biology**, vol. 19, nº 10, 1 out. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001408>

SILVA, T. F.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; PASQUALI, A. K. S.; PINTO-FERREIRA, F.; PAVANELLI, W.; CONCHON-COSTA, I.; NAVARRO, I.; CALDART, E. T. Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: a systematic review.

Acta Tropica, p. 106018, 2021. DOI 10.1016/j.actatropica.2021.106018.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106018>

SIRIMA, S. B.; MORDMÜLLER, B.; MILLIGAN, P.; NGOA, U. A.; KIRONDE, F.; ATUGUBA, F.; TIONO, A. B.; ISSIFOU, S.; KADDUMUKASA, M.; BANGRE, O.; FLACH, C.; CHRISTIANSEN, M.; BANG, P.; CHILENGI, R.; JEPSEN, S.; KREMSNER, P. G.; THEISEN, M.; OUE'DRAOGO, A.; KARGOUGOU, D.; ... EJIGU, D. A. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. **Vaccine**, vol. 34, n° 38, p. 4536–4542, 31 ago. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.041>

ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, vol. 48, p. 93–102, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.010>

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, vol. 66, n° 1, p. 334–395, jan. 2014.
<https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>

TABESHPOUR, J.; SAHEBKAR, A.; ZIRAK, M. R.; ZEINALI, M.; HASHEMZAEI, M.; RAKHSHANI, S.; RAKHSHANI, S. Computer-aided Drug Design and Drug Pharmacokinetic Prediction: A Mini-review. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 24, n° 26, p. 3014–3019, 4 set. 2018. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180903123423>

TAKASHIMA, E.; OTSUKI, H.; MORITA, M.; ITO, D.; NAGAOKA, H.; YUGUCHI, T.; HASSAN, I.; TSUBOI, T. The Need for Novel Asexual Blood-Stage Malaria Vaccine Candidates for *Plasmodium falciparum*. **Biomolecules**, vol. 14, n° 1, p. 100, 12 jan. 2024. DOI 10.3390/biom14010100. <https://doi.org/10.3390/biom14010100>

THERA, M. A.; DOUMBO, O. K.; COULIBALY, D.; LAURENS, M. B.; OUATTARA, A.; KONE, A. K.; GUINDO, A. B.; TRAORE, K.; TRAORE, I.; KOURIBA, B.; DIALLO, D. A.; DIARRA, I.; DAOU, M.; DOLO, A.; TOLO, Y.; SISSOKO, M. S.; NIANGALY, A.; SISSOKO, M.; TAKALA-HARRISON, S.; ... BIOLOGICALS, G. A

Field Trial to Assess a Blood-Stage Malaria Vaccine Abstract. [S. l.: s. n.], 2011.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008115>

TOWLER, D. A.; EUBANKS, S. R.; TOWERY, D. S.; ADAMS, S. P.; GLASER, L. Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, n° 3, p. 1030–1036, 1987a. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75745-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75745-7)

TOWLER, D. A.; ADAMS, S. P.; EUBANKS, S. R.; TOWERY, D. S.; JACKSON-MACHELSKI, E.; GLASER, L.; GORDON, J. I. Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 84, no. 9, p. 2708–2712, 1 May 1987b. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2708>

TSE, E. G.; KORSIK, M.; TODD, M. H. The past, present and future of anti-malarial medicines. **Malaria Journal**, vol. 18, n° 1, 22 mar. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>

UDENWOBELE, D. I.; SU, R. C.; GOOD, S. V.; BALL, T. B.; SHRIVASTAV, S. V.; SHRIVASTAV, A. Myristoylation: An important protein modification in the immune response. **Frontiers in Immunology**, vol. 8, n° JUN, 30 jun. 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00751>

VALDIVIA, H.; ALMEIDA, L. V.; ROATT, B. M.; REIS-CUNHA, J.; PEREIRA, A. A. S.; GONTIJO, C.; FUJIWARA, R.; REIS, A. B.; SANDERS, M.; COTTON, J.; BARTHOLOMEU, D. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, vol. 7, p., 2017. <https://doi.org/10.1038/srep40804>

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. **Electron Microscopy in Antiparasitic Chemotherapy: A (Close) View to a Kill.** [S. l.: s. n.], 2009. <https://doi.org/10.2174/138945009787581168>

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 46, n° 2, p. 172–173, 15 jan. 2008. <https://doi.org/10.1086/524889>

WHO. World Health Organization. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em: 29 fev. 2024.

WHO. World malaria report 2020 - 20 years of global progress & challenges. [S. l.: s. n.], 2020. Acessado em: 29 fev. 2024.

WRIGHT, M. H.; CLOUGH, B.; RACKHAM, M. D.; RANGACHARI, K.; BRANNIGAN, J. A.; GRAINGER, M.; MOSS, D. K.; BOTTRILL, A. R.; HEAL, W. P.; BRONCEL, M.; SERWA, R. A.; BRADY, D.; MANN, D. J.; LEATHERBARROW, R. J.; TEWARI, R.; WILKINSON, A. J.; HOLDER, A. A.; TATE, E. W. Validation of N-myristoyltransferase as an antimalarial drug target using an integrated chemical biology approach. **Nature Chemistry**, vol. 6, n° 2, p. 112–121, fev. 2014a. <https://doi.org/10.1038/nchem.1830>

WRIGHT, M. H.; HEAL, W. P.; MANN, D. J.; TATE, E. W. Protein myristoylation in health and disease. **Journal of Chemical Biology**, vol. 3, n° 1, p. 19–35, mar. 2010. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0032-8>

YEPES, A. F.; ROBLEDO, S. M.; QUINTERO-SAUMETH, J.; CARDONA-GALEANO, W. 3-styrylcoumarin scaffold-based derivatives as a new approach for leishmaniasis intervention: biological and molecular modeling studies. **Journal of Parasitic Diseases**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12639-023-01639-x>

YU-CHIAN CHEN, C. A Novel Integrated Framework and Improved Methodology of Computer-Aided Drug Design. **Curr Top Med Chem**, vol 13, n° 9, p. 965-88. <http://doi.org/10.2174/1568026611313090002>

CAPÍTULO II – Artigo I (publicado)

Trata-se do artigo intitulado *Identification of potential inhibitors for N-miristoiltransferase (NMT) protein of Plasmodium vivax*, publicado na revista *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* em 2022. Este artigo foi escrito a partir dos dados obtidos nos estudos *in silico* na busca de potenciais inibidores para a NMT de *Plasmodium vivax* desenvolvidos nesta tese.

Este artigo pode ser encontrado no seguinte link:

<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2114942>

RESUMO

A malária é uma infecção parasitária negligenciada de importância global. Ela está presente principalmente em países tropicais e é causada por um protozoário que pertence ao gênero *Plasmodium*. Os vetores da doença são mosquitos *Anopheles* fêmeas infectados com o *Plasmodium* spp. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 241 milhões de casos de malária em todo o mundo em 2020 e aproximadamente 627 mil mortes por malária no mesmo ano. A crescente resistência ao tratamento tem sido um grande problema desde o início do século XXI. Novos estudos têm sido realizados para encontrar possíveis medicamentos que possam ser usados para a erradicação da doença. Nesse cenário, uma proteína chamada N-miristoiltransferase (NMT) tem sido estudada como um possível alvo de medicamentos. A NMT tem um papel importante na miristoilação de proteínas e se liga à membrana plasmática, contribuindo para a estabilização das interações proteína-proteína. Assim, a inibição da NMT pode levar à morte da célula do parasita. Portanto, para prever e detectar possíveis inibidores da NMT do *Plasmodium*, foram usadas nessa pesquisa técnicas de projeto de medicamentos auxiliadas por computador que envolvem triagem virtual, acoplamento molecular e dinâmica molecular. Três compostos em potencial semelhantes a um inibidor de benzofurano foram identificados como ligantes estáveis de PvNMT. Esses compostos (EXP90, ZBC205 e ZDD968) são originários de três fontes diferentes, respectivamente: uma biblioteca comercial, uma biblioteca de produtos naturais e o de um banco de dados

de medicamentos aprovados pela FDA. Esses compostos poderam ser testados posteriormente em testes de inibição *in vitro* e *in vivo* contra a NMT do *Plasmodium vivax*.

PALAVRAS-CHAVE: Malária; NMT; *Plasmodium vivax*; triagem virtual; dinâmica molecular.

CAPÍTULO III – Artigo II (não publicado)

Trata-se do artigo intitulado Investigation of Potential Inhibitors of N-myristoyltransferase in *Leishmania amazonensis*: A Computational and Experimental Study submetido a revista *Chemical Biology and Drug Design*. Este artigo foi escrito a partir dos dados obtidos nos estudos *in silico e in vitro* na busca de potenciais inibidores para a NMT de *Leishmania amazonensis* desenvolvidos nesta tese.

Investigation of Potential Inhibitors of N-myristoyltransferase in *Leishmania amazonensis*: A Computational and Experimental Study

Mariana Sant'Anna Pereira Nicolau^a, Millena Almeida Resende^b, Cintia de Campos Chaves^a, Renata Santos Rodrigues^a, Veridiana de Melo Rodrigues^a, Nilson Nicolau-Junior^b and Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama^a

^aLaboratory of Biochemistry and Animal Toxins, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil;

^bLaboratory of Molecular Modeling, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

RESUMO

A leishmaniose, uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania*, representa uma ameaça significativa à saúde global, particularmente na América Latina e no Brasil. A doença, transmitida através da picada de flebotomíneos, apresenta várias formas clínicas, sendo a *Leishmania amazonensis* uma espécie de importância por estar associada tanto com a leishmaniose cutânea quanto a uma forma visceral atípica. Os tratamentos atuais para leishmaniose são prejudicados pela toxicidade, resistência e custo elevado, evidenciando a necessidade de novos alvos terapêuticos e medicamentos. A N-miristoiltransferase (NMT) é um importante alvo em parasitos *Leishmania*, uma vez que desempenha um papel crucial no processo de miristoilação, uma modificação lipídica que envolve a ligação de miristato, um ácido graxo saturado de 14 carbonos, ao N-terminal de proteínas específicas. Esta modificação é vital para a função dessas proteínas e sua associação com membranas celulares. Esta pesquisa é a primeira a explorar potenciais inibidores para a NMT de *Leishmania amazonensis*, usando métodos computacionais e experimentais. Assim, um modelo baseado em forma, de um potente inibidor de NMT de *Trypanosoma brucei*, foi usado para realizar uma triagem virtual contra uma biblioteca de aproximadamente 1 milhão de ligantes, seguida por *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular de complexos proteína-ligante. Além disso, ensaios de citotoxicidade foram realizados para avaliar a viabilidade de formas promastigota de *Leishmania*

amazonensis após o tratamento com inibidores selecionados na triagem virtual. Os resultados mostram três compostos, CL 54016012, CL 74995016 e EXP 668965, que apresentam potencial para futuros estudos *in vitro* e *in vivo* para validar sua capacidade de ligação à NMT e sua eficácia no tratamento da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose; *Leishmania amazonensis*; N-miristoiltransferase (NMT); descoberta de medicamentos; inibição de enzima; *design* de medicamentos auxiliado por computador.

ABSTRACT

Leishmaniasis, a disease caused by *Leishmania* parasites, poses a significant health threat globally, particularly in Latin America and Brazil. The disease, transmitted through the bite of sandflies, presents several clinical forms, with *Leishmania amazonensis* being an important species because it is associated with both cutaneous leishmaniasis and an atypical visceral form. Current treatments are hindered by toxicity, resistance, and high cost, driving the need for new therapeutic targets and drugs. N-myristoyltransferase (NMT) is an important anti-leishmanial target. N-myristoyltransferase (NMT) is an important target in *Leishmania* parasites, as it plays a crucial role in the process of myristoylation, a lipid modification that involves the attachment of myristate, a 14-carbon saturated fatty acid, to the N-terminus of specific proteins. This modification is vital for the function of these proteins and their association with cellular membranes. This research is the first exploration into potential inhibitors for *Leishmania amazonensis* NMT using both computational and experimental methods. Thus, a shape-based model, built upon a potent NMT inhibitor from *Trypanosoma brucei*, was used to conduct a virtual screening against 1 million ligand library, followed by molecular docking and protein-ligand molecular dynamics simulations. Besides, cytotoxicity assays were performed to evaluate the viability of the *Leishmania amazonensis* promastigotes cells after treatment with inhibitors selected during virtual screening. The results show three chemical compounds, CL 54016012, CL 74995016, and EXP 668965, which exhibit potential for future *in vitro* and *in vivo* studies to validate their binding capacity to NMT and their efficacy in disease treatment.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; N-myristoyltransferase (NMT); drug discovery; enzyme inhibition; computer-aided drug design.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasites of the genus *Leishmania*, leading to significant morbidity and mortality worldwide. It is transmitted to humans by the bite of infected female sandflies. In Latin America, particularly in Brazil, leishmaniasis presents a significant public health challenge, with diverse clinical manifestations ranging from cutaneous to visceral forms (SAÚDE, 2024). Among the species responsible for leishmaniasis in this region, *Leishmania amazonensis* is noteworthy due to its ability to both the anergic diffuse cutaneous form and the cutaneous forms characterized by disseminated lesions (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Moreover, *L. amazonensis* has been identified as a causative agent of atypical American visceral leishmaniasis, presenting with symptoms such as hepatitis and adenopathy, which further complicates the clinical diagnosis and management of this disease (ALEIXO et al., 2006; BARRAL et al., 1986, 1991). The current leishmaniasis treatment options are limited by toxicity, resistance, and high cost, showing the urgent need for the discovery of new therapeutic targets and drugs with novel modes of action (MENDES ROATT et al., 2020).

Recent studies have highlighted the antiparasitic activity of natural terpenes from *Salvia cuspidata*, such as HABTO and ICTX, which exhibit promising *in vitro* and *in vivo* efficacy against *L. amazonensis* by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the parasite (TRONCOSO et al., 2023). Immunotherapy, combining immunogenic mimotopes selected by phage display with the antifungal drug amphotericin B, has also shown a therapeutic response in mice infected with *L. amazonensis*, suggesting a potential for immunotherapeutics in managing the disease (SOYER et al., 2023). To date several drug targets for leishmaniasis has been identified such as P2X7 purinergic receptor (EL-DIRANY et al., 2022), eIF4A-like protein (LieIF4A) (ABDELKRIM et al., 2022), UDPase and PCNA (CARTER et al., 2023), DNA topoisomerase (ROY, 2022), bisubunit topoisomerase 1B (LdTop1) (CHOWDHURI et al., 2023), and calcium-transporting ATPases (GUPTA et al., 2022) and others. One of such promising targets is the enzyme N-myristoyltransferase (NMT), which catalyzes the attachment of myristate, a 14-carbon saturated fatty acid, to the N-terminus of specific proteins, a modification crucial for their

function and association with cellular membranes (BRANNIGAN et al., 2010). Frearson et al., (2010) identified a high affinity inhibitor (DDD85646) for *Trypanosoma brucei* that was indicated as an excellent chemical tool for investigation of the biology of protein N-myristoylation across a range of organisms. In this regard, recent research has focused on the inhibition of NMT as a strategy for the treatment of leishmaniasis. Structural studies have provided insights into the binding modes of inhibitors, aiding in the design of potent and selective NMT inhibitors (BRANNIGAN et al., 2014). Besides, pharmacological validation of NMT as a drug target in *Leishmania donovani* has been achieved, with several potent inhibitors identified that demonstrate efficacy in reducing parasite burden *in vivo* (CORPAS-LOPEZ et al., 2019). The challenge remains to address the drop-off in activity between enzyme inhibition and *in vitro* activity while maintaining selectivity over the human enzyme. Recently, novel thienopyrimidine inhibitors have shown on-target activity in intracellular amastigotes of *Leishmania*, with excellent selectivity over human NMTs (BELL et al., 2020). Furthermore, natural products from *Withania somnifera* have been investigated as potential inhibitors of *Leishmania* NMT through molecular docking and dynamics studies, highlighting the role of natural compounds in drug discovery (ORABI et al., 2023).

The challenge in NMT-inhibitor structural analysis lies in understanding the mechanisms by which the enzyme is inhibited. NMT can adopt open or closed conformations during its catalytic process. To address this, *in silico* methods have gained prominence. Rather than relying solely on free binding energy calculations, researchers now focus on modeling the conformational changes of the protein upon ligand binding. Molecular dynamics simulations play a crucial role in predicting inhibitor potency by assessing the conformational stability and dynamics of the protein in its closed form (SPASSOV; ATANASOVA; DOYTCHINOVA, 2023). Our work was based on the structure of the NMT-inhibitor complex of *L. major*, which served as a model in the search for inhibitors by Frearson et al. (2010). This model was utilized to construct a ligand shape-based model, subsequently employed for the search and identification of novel inhibitors using *in silico* tools and cytotoxicity assays. Leishmaniasis is an endemic and tropical disease that predominantly impacts low-income regions (including parts of Africa, Asia and Latin America) as well as middle-income countries like Brazil. This study was

conducted with the objective of advancing the quest for efficacious drug treatments against this disease.

METHODS

Shape-Based Modeling and Validation

To conduct a virtual screening against ligand libraries, we employed a shape-based model. This model was constructed using color (pharmacophore features) and shape (inhibitor shape in the NMT pocket) based on the potent inhibitor, a pyrazole sulphonamide (DDD85646) complexed with *L. major* NMT (PDBid: 2WSA) available in the Protein Data Bank (PDB). The shape-based model was created using ROCS 3.2.0.4 program, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007). To validate the shape-based model, we employed the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and calculated the Area Under the Curve (AUC) using ROCS 3.2.0.4 program. These metrics assess the performance of our models in distinguishing between active compounds (those binding to the target protein) and decoys (non-target ligands or potentially inactive compounds). The active compounds were obtained from known ligands against the NMT protein, sourced from literature (BELL et al., 2012) and the inactives (decoys) were generated using the DUD-E online platform (MYSINGER et al., 2012).

Database Preparation

The shape-based models generated through the ROCS program were employed in virtual screening of compound libraries sourced from two databases: DIVERSet CL (core library) and DIVERSet EXP (express-pick) from Chembridge Corporation, San Diego, California. CL contains approximately 870,000 diverse lead-like compounds and EXP about 500,00 drug-like structures carefully selected to cover a wide range of pharmacophoric space. The compound libraries were submitted to a two-step processing: first, they were subjected to the FILTER program within OMEGA 2.5.1.4 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM) to eliminate undesirable compounds, including those with toxic properties. Next, the

filtered databases were processed using the QUACPAC 1.6.3.1 program (OpenEye Scientific Software) to determine precise protonation states at pH 7.4 and generate tautomers for each molecule. Finally, the compounds were used to generate bioactive conformers through the OMEGA program.

Virtual screening and molecular docking

The validate shape-based model, was employed for screening the DIVERSet subsets. Each screened library yielded 500 hits, representing the molecules with the highest overlap scores (referred to as TanimotoCombo). These top-scoring 500 molecules, identified through shape-based modeling, were subsequently subjected to molecular docking using PmNMT (PDBid: 2WSA) as the receptor. To accomplish this, we utilized the GOLD 2020.3.0 program (JONES et al., 1997). GOLD employs a genetic algorithm to optimize the ligand pose and orientation relative to the protein pocket. Gold ranks the best poses using the ChemPLP scoring function as default. 2D diagrams were generated using LigPlot+ to analyze the protein-ligand interactions obtained from docking analyses (Wallace, Laskowski, & Thornton, 1995).

Molecular Dynamics

The three best scored ligands of each library from the molecular docking results were submitted to receptor-ligand molecular dynamics (MD) simulations using the GROMACS software (ABRAHAM et al., 2015). The topology parameters for each ligand were generated using SwissParam (ZOETE et al., 2011) and the CHARMM force field. The MD simulations of the protein-ligand complex were conducted in GROMACS, employing the CHARMM27 force field and the TIP3P water model. The simulation cell was defined as triclinic in shape. Water molecules and ions were added, and energy minimization was performed using the steepest descent algorithm. Both NVT (constant volume and temperature) and NPT (constant pressure and temperature) equilibrium phases were carried out over 100 ps, followed by a 100 ns production phase under NTP conditions. Particle mesh Ewald (PME) was employed to calculate long-range electrostatic interactions during MD (ESSMANN et al., 1995). The temperature was maintained at a constant 300 K using

a modified Berendsen thermostat (BERENDSEN et al., 1984), and the pressure was set to 1 atm using the Parrinello-Rahman method (PARRINELLO; RAHMAN, 1980). Short-range van der Waals and electrostatic forces were set to 1.2. The MD results were evaluated using tools provided by the GROMACS program, including root-mean-square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF) and hydrogen bond analysis.

Binding free energy calculation

The binding free energy between the protein and the ligands was determined using the molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area method (MM-PBSA) with energy decomposition, as proposed by (MASSOVA; KOLLMAN, 2000). Specifically, we employed the gmx_MMPBSA tool for high-throughput MM-PBSA calculations (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021). This approach allowed us to evaluate three key energy terms: vacuum potential energy, polar solvation energy, and non-polar solvation energy. By conducting these analyses, we aimed to discern variations arising from different docked ligands.

Promastigote culture

L. (L.) amazonensis (IFLA/BR/67/PH8) were cultured in Schneider medium supplemented with 10% FBS, penicillin (100 UI. mL⁻¹) and streptomycin (100 µg. mL⁻¹) at 23 ± 0.5°C. Promastigotes used in all assays were isolated from the stationary growth phase.

Cytotoxicity assays

Promastigotes (5×10^5 cells/well) were placed on 96-well culture plates and incubated at 23°C with different concentrations of the selected ligands (2-fold serial dilution from 200 µM) for 48 h. The cell viabilities were evaluated by MTT assay according to Nunes et al. (2013) and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of ligands on cell viability were then determined by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). The experiments were performed in quadruplicate being conducted at least two independent experiments.

Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out by using the statistical GraphPad Prism 5.0. One-way ANOVA (analysis of variance) was followed by Bonferroni posttest and results were evaluated at a statistical significance level of $p < 0.05$.

RESULTS

Shape-Based Model Validation and Screening for NMT potential ligands

A shape-based model approach was employed to select and screen potential inhibitors targeting NMT. The potent inhibitor DDD85646 complexed with *Leishmania major* NMT (*Lm*NMT), from the protein database (PDBid: 2WSA), served as basis to construct a five pharmacophoric features shape-based model (Figure 1A and B). Besides a validation was conducted to identify the accuracy of the model in capture potential active molecules (Figure 1C). The ascending curve denotes that the model exhibits a bias toward active molecules relative to inactive ones. Besides the area under the curve (AUC) obtained for this model was 0.82, a good result, as indicated by ROCs manual a highly selective query typically falls within the range of 0.8 to 1.0. The validated model was used to performed virtual screening using two subsets of molecules from DIVERSet library (CL and EXP) and the outcome identified the top 500 ranked molecules from each subset, determined by the TanimotoCombo score.

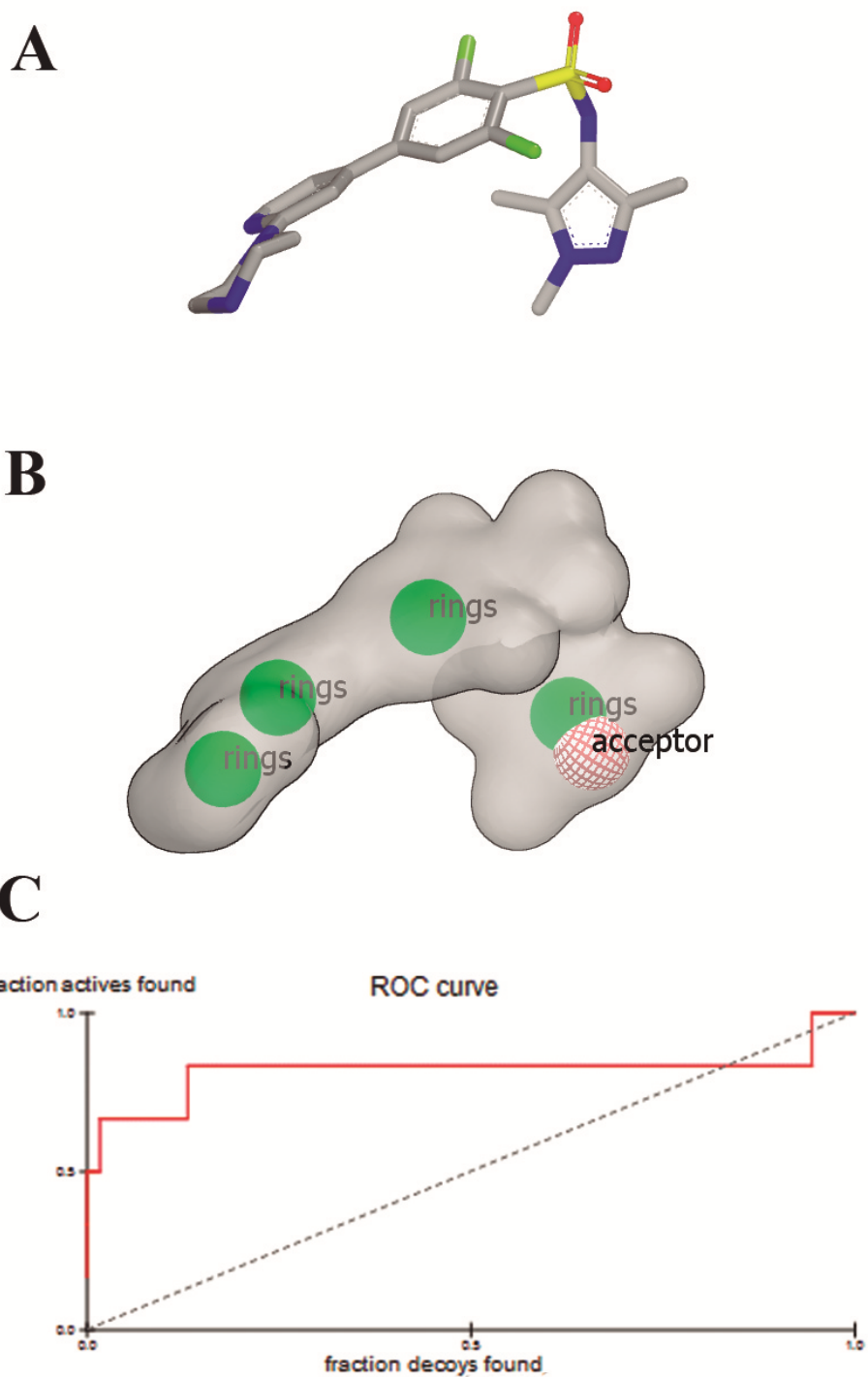


Figure 1. (A) DDD85646 inhibitor extracted from the complex with *L. major* NMT (PDBid: 2WSA). (B) Shape-based model generated from DDD85646 pharmacophore features and shape. (C) Shape-based model validation using ROC curve and AUC.

Docking and binding mode analysis

GOLD docking program was used to investigate the poses and the binding interaction between the *Leishmania major* NMT enzyme (LmNMT) and the top 500 ligands from each subset (CL and EXP), as determined by the Tanimoto Combo score. Additionally, the three best compounds were selected from each library based on the highest ChemPLP score (Table 1) and on converging to the same pose in the first three results from the 10 docking iterations of each molecule. It is important to note that despite very similar docking scores, ligands CL 54016012, EXP 6689657 and 9226834 showed the highest values, 86.48, 85.10 and 85.25 respectively. Subsequently, the selected ligands were evaluated for their interactions with LmNMT (Figure 2). DDD85646 performed 15 hydrophobic interactions and 3 hydrogen bonds (Ser330, Tyr345 and Leu421) with *LmNMT* (FREARSON et al., 2010) (Figure 2A). CL ligands 19044540, 54016012, 74995016 (Figure 2B, C and D) performed 12, 9 and 11 hydrophobic interactions and 1 (Tyr345), 3 (Tyr80, Tyr217 and Tyr345) and 3 (Tyr80, Phe168 and Ser330) hydrogen bonds respectively. EXP ligands 6643498, 6689657 and 9226834 (Figure 2E, F and G) performed 12, 10 and 12 hydrophobic interactions and 3 (Tyr80, Gly205 and Tyr217), 2 (Tyr80 and Tyr217) and 2 (Tyr80 and Asn376) hydrogen bonds respectively.

Table. 1 Virtual screening, docking, dynamics and cytotoxicity results of the best docked ligands, apoenzyme and DDD85646 inhibitor.

ID	TANIMOTO COMBO (score)	CHEMPLP (score)	RMSD (nm)	RMSF* (nm)	BINDING ENERGY (kcal/mol)	H-BOND (number)	IC 50 (μ M)
APOENZYME	-	-	0.18 ± 0.02	0.082 ± 0.031	-	-	
DDD85646	-	-	0.16 ± 0.02	0.076 ± 0.026	13.26 ± 8.48	1.77 ± 1.19	0.002**
CL							
19044540	1.23	82.60	0.15 ± 0.02	0.084 ± 0.030	-18.95 ± 5.02	0.36 ± 0.62	ND***
54016012	1.21	86.48	0.14 ± 0.01	0.084 ± 0.028	2.52 ± 6.53	2.31 ± 1.18	19.81
74995016	1.20	81.47	0.22 ± 0.03	0.085 ± 0.029	25.64 ± 15.80	0.69 ± 0.70	29.3
EXP							
6643498	1.29	82.34	0.16 ± 0.02	0.083 ± 0.028	-23.56 ± 4.02	0.06 ± 0.24	ND***
6689657	1.20	85.10	0.15 ± 0.01	0.083 ± 0.029	-19.93 ± 5.10	1.14 ± 0.72	101.9
9226834	1.20	85.25	0.19 ± 0.03	0.088 ± 0.036	13.75 ± 6.41	0.01 ± 0.12	ND***

* Mean and Standard deviation from the *Lm*NMT residues 343-421 (active site), ** Extracted from (FREARSON et al., 2010a)) *in vitro* studies with *Trypanosoma brucei* NMT, *** not detected.

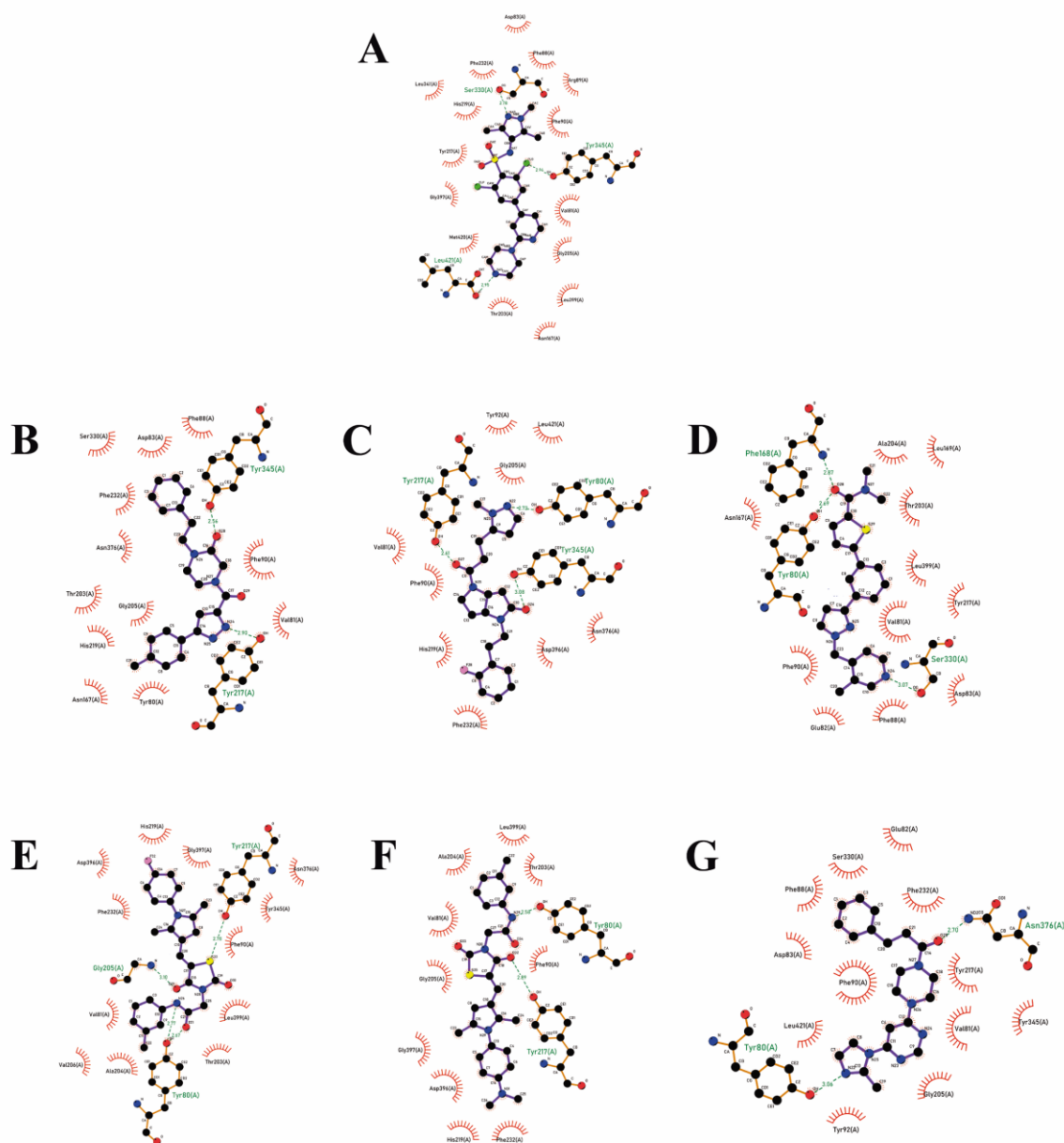


Figure 2. 2D depiction of the DDD85646 inhibitor (A) and the best three ligands selected after docking, CL 19044540 (B), 54016012 (C), 74995016 (D) and EXP 6643498 (E), 6689657 (F), 9226834 (G). Spoked red arcs represent protein residues making hydrophobic contacts with the ligand and green dashed lines represents hydrogen bonds.

NMT-ligand complexes stability analysis

The RMSD and RMSF results, from the 100 ns molecular dynamics of the NMT-ligand complexes and the NMT apoenzyme, were compared (Figure 3). All the CL (Figure 3A) and EXP (Figure 3C) NMT-ligand RMSDs showed similar plateaus and means with the NMT-DDD85646 and NMT apoenzyme over the 100 ns simulation except by the CL 74995016 and EXP 9226834, which showed slightly higher mean values (Table 1). Furthermore, it is worth noting that NMT complexed CL 54016012 had the lowest RMSD mean and standard deviation.

The RMSF showed similar results among the complexes (Figure 3B and D) and apoenzyme. However, when the residues relative to the enzyme active site (residues 343 to 421) was analyzed (Table 1), we noticed that NMT-DDD85646 complex showed the lowest average fluctuation, probably by the stabilization of the inhibitor interactions in the enzyme active site. Nevertheless, the NMT complex with EXP 9226834 showed the highest fluctuation (mean and standard deviation) of the residues in the enzyme active site (Table 1).

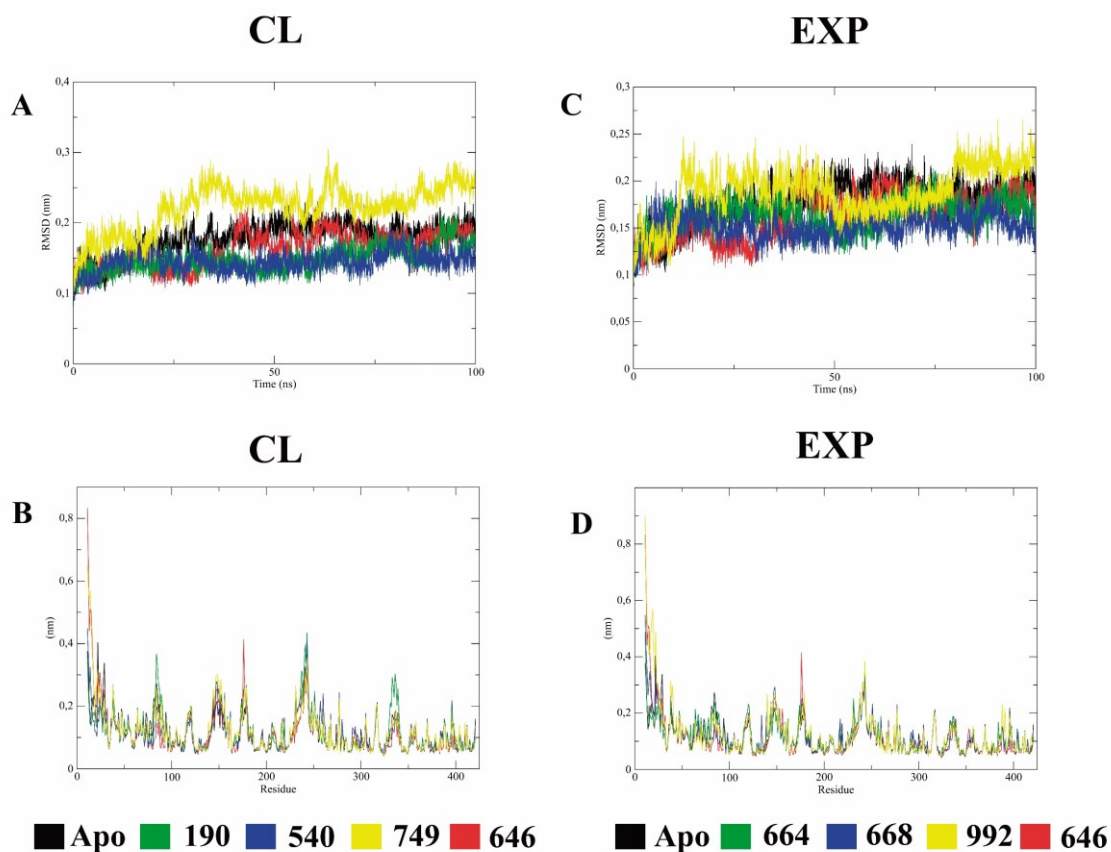


Figure 3. NMT-ligand complexes and apoenzyme RMSD (A and C) and RMSF (B and D) analyses. NMT-DDD85646 (646) and NMT apoenzyme (Apo) results are showed in all results. RMSD and RMSF results from NMT-CL 19044540 (190), 54016012 (540) and 74995016 (749) complexes are showed in A and B. RMSD and RMSF results from NMT-EXP 6643498 (664), 6689657 (668) and 9226834 (992) complexes are showed in C and D.

NMT-ligand complexes interaction analysis

The investigation of the binding energy and hydrogen bond interactions during MD simulations provides valuable insights into ligand interaction stability within protein binding sites. Analysis over the 100 ns simulation period showed that the binding energy (kcal/mol) of the ligands in the site showed markedly different values along MD (Figure 4A and C). Notably, NMT-DDD85646, CL 54016012, EXP 74995016 and 9226834 showed odd positive binding energy mean values, whereas

NMT-CL 19044540, EXP 6643498 and 6689657 showed similar negative mean values (Table 1). Regarding hydrogen bonds (Figure 4B and D) the complex NMT-CL 54016012 showed the higher mean value, 2.31, quite similar to the 3 hydrogen bonds found in the initial complex generated by docking, despite having one of the worst binding energy mean values (2.52 kcal/mol) (Table 1). However, it is important to note that the hydrogen bonds of the complex fall off after 80 ns of simulation, which leads to a high standard deviation (1.18). Another interesting result is presented for the NMT-EXP6643498 complex, which presented the lowest hydrogen bond mean (0.06) among the complexes studied. despite having the best binding energy mean value (-23.56 kcal/mol) (Table 1).

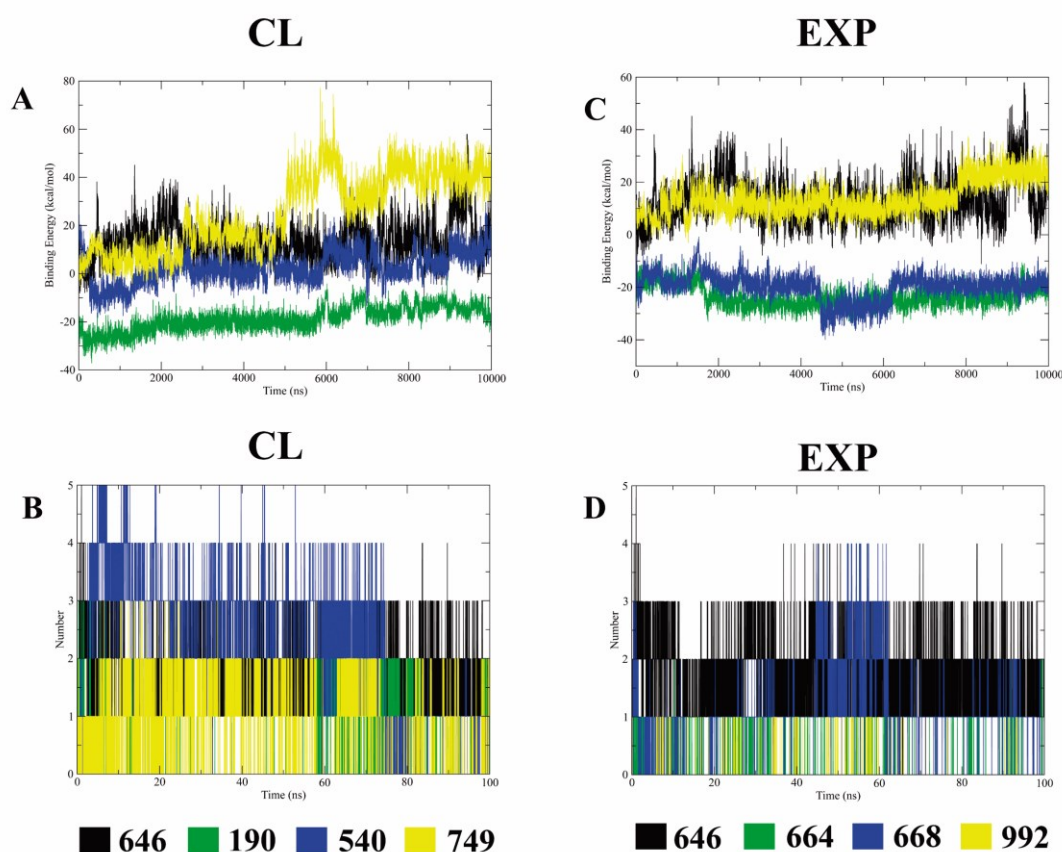


Figure 4. NMT-ligand complexes binding energy (A and C) and hydrogen bond (B and D) analyses. NMT-DDD85646 (646) are showed in all results. Binding energy and hydrogen bond results from NMT-CL 19044540 (190), 54016012 (540) and 74995016

(749) complexes are showed in A and B. Binding energy and hydrogen bond results from NMT-EXP 6643498 (664), 6689657 (668) and 9226834 (992) complexes are showed in C and D.

Potential inhibitors cytotoxicity

The six compounds (selected from the CL and EXP subsets) were aquired from ChemBridge Corporation, located in San Diego, California. These compounds were used in subsequent *in vitro* citotoxicity assays against *L. amazonensis*. The results show that three compounds exhibited significant reductions in cell viability. The concentrations of compounds required to inhibit viability by 50% (IC₅₀) were 19.81, 29.3 and 101.9 μ M for CL 54016012, CL 74995016 and EXP 668965, respectively (Table 1). The graphs (Figure 5) depict the percentages of cell viability relative to control parasites (absence of compounds) versus compound concentrations. The dose-response profile analysis indicates concentration-dependent viability inhibitions. However, the compounds CL 19044540, EXP 6643498 and 9226834 showed no detectable inhibition of viability in the cytotoxicity assays (Table 1).

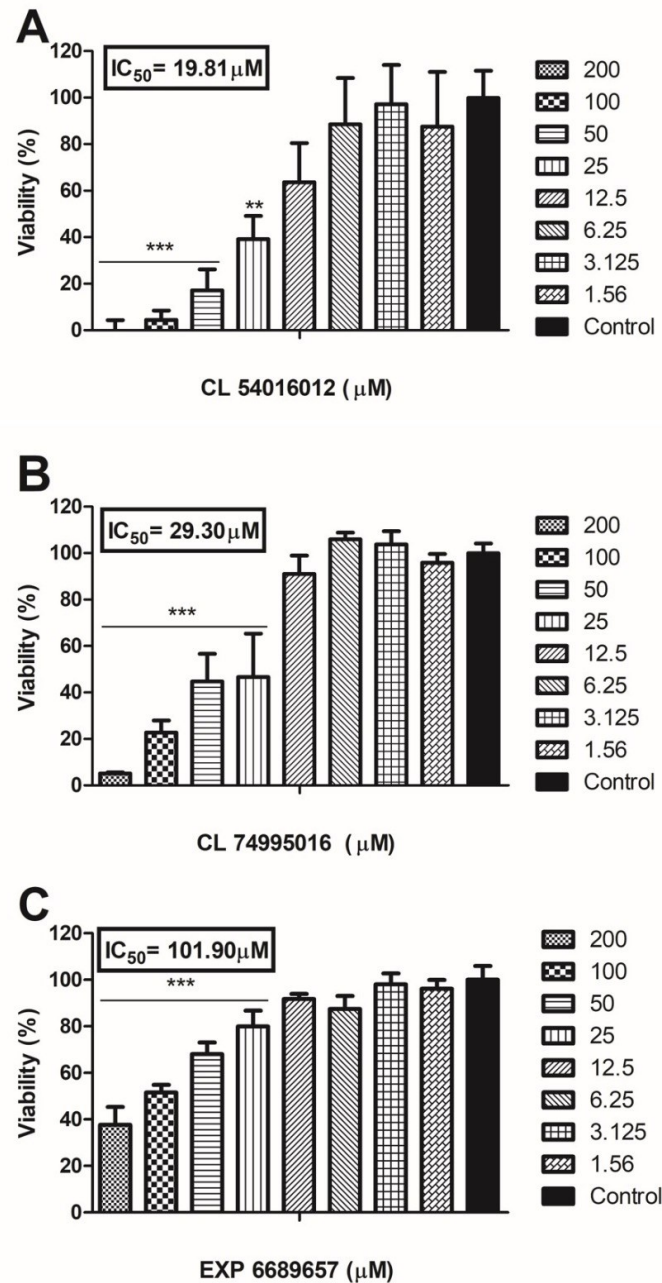


Figure 5. *Leishmania amazonensis* viability versus compounds CL 54016012 (A), CL 74995016 (B) and EXP 668965 (C). The viabilities of parasites were determined after 48h in the presence of increasing doses of compounds. The graphs display cell viability percentages of parasites cultured with compounds relative to control parasites (100% of viability). Asterisks indicate statistically significant differences compared to the control (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

DISCUSSION

The pyrazole sulphonamide ligand (DDD85646) was used as a reference molecule in this work due to its prior findings on *L. major* binding site interaction and its potent effect in inhibiting *T. brucei* (FREARSON et al., 2010). The shape-based model constructed using DDD85646 was highly effective in selecting active compounds during validation. Thus, virtual screening was conducted to select from approximately 1 million molecules those that fit the ROCS shape-based model better. The effectiveness of shape-based models, particularly from ROCS, has been a topic of interest in the field of virtual screening and three-dimensional shape retrieval. ROCS is a widely used tool for calculating 3D shape and chemical ("color") similarity, which are crucial for identifying potential compounds in drug discovery (KEARNES; PANDE, 2016). The best 500 compounds from each subset (CL and EXP) were successfully docked to reveal the highest-scoring poses in the *Lm*NMT binding site, guiding the subsequent steps in protein-ligand MD. The importance of protein-ligand MD simulations is widely acknowledged in the fields of computational biology and drug discovery. These simulations provide valuable insights into the dynamic nature of protein-ligand interactions, which are crucial for understanding biological processes and designing new drugs. MD simulations offer a detailed view of how proteins interact with ligands in real time, allowing researchers to observe the conformational changes and dynamic behavior of proteins upon ligand binding (KARPLUS; PETSKO, 1990). This is particularly important because protein flexibility and conformational changes are often key factors in ligand affinity and specificity (SEO et al., 2014). The MD results from NMT-ligand complexes showed similar behavior in protein stability when RMSD and RMSF were analyzed, indicating that ligand interaction presented a small impact on the behavior of NMT atoms (Figure 3 and Table 1). However, the results of the binding energy and the number of hydrogen bonds showed quite different results among the complexes (Figure 4 and Table 1). The average binding energy results presented conflicting outcomes since some complexes displayed unexpectedly positive average values for the binding energy. This discrepancy may stem from the limitations of the MMPBSA technique used for these specific complexes as the results are not consistent

with the stability tests (RMSD and RMSF), the number of hydrogen bonds and the *in vitro* findings. Regarding hydrogen bonding, NMT-CL 54016012 exhibited the highest mean when analyzing the 100 ns of simulation. Additionally, this complex demonstrated the best RMSD stability, the highest docking score and the lowest IC₅₀ concentration in the toxicity tests (Table 1). It is important to note that hydrogen bonds play a pivotal role in molecular recognition and the binding affinity between proteins and ligands. These interactions are not static but dynamic, contributing to the flexibility and adaptability of protein-ligand complexes (BULUSU; DESIRAJU, 2020).

Recent advancements in the development of N-myristoyltransferase (NMT) inhibitors have shown promising results in the fight against *Leishmania*. A study has demonstrated the structure-based design of potent and selective inhibitors of *Leishmania* NMT, which were derived from a high-throughput screening. These inhibitors showed a 40-fold increase in enzyme inhibition through the hybridization of two distinct binding modes, resulting in novel compounds with significant potency against *Leishmania donovani* NMT and selectivity over the human enzyme (HUTTON et al., 2014). Another research effort focused on a thienopyrimidine series, which was identified in a high-throughput screen against *Leishmania* NMT. A comprehensive structure–activity relationship (SAR) study across 68 compounds led to the identification of the first inhibitor with on-target NMT activity in *Leishmania* parasites. Crystal structure analyses of derivatives complexed with *Leishmania major* NMT revealed key factors for future optimization, resulting in a compound with modest activity against *L. donovani* intracellular amastigotes and excellent selectivity for *Leishmania* NMT over human NMTs (BELL et al., 2020a). Pharmacological validation of NMT as a drug target in *L. donovani* was achieved by screening a focused set of pyrazolyl sulfonamide compounds. The most potent inhibitor showed modest activity against *L. donovani* intracellular amastigotes and a moderate therapeutic window over the human enzyme. This study confirmed the on-target action of the inhibitor within parasites and demonstrated a significant reduction in parasite burden in animal model of visceral leishmaniasis (CORPAS-LÓPEZ et al., 2018). Natural products have also been explored as potential NMT inhibitors. Compounds from *Withania somnifera* were subjected to molecular docking and dynamics against *L. major* NMT, identifying

molecules with high affinity and binding stability, suggesting their potential use as antileishmanial drugs or as scaffolds for designing new inhibitors (ORABI et al., 2023a).

To date, this is the first study to investigate potential inhibitors for the NMT of *Leishmania amazonensis* both *in silico* and *in vitro*. Our results are promising, highlighting three molecules, CL 54016012, CL 74995016 and EXP 668965, which could be used in future *in vitro* and *in vivo* studies to confirm their binding to NMT and their effectiveness in treating the disease. Furthermore, they could be further modified and refined to achieve better outcomes in future experiments.

CONCLUSION

The recent discovery of selective NMT inhibitors offers a promising avenue for the development of new antileishmanial therapies. This study screened 1 million compounds to identify prominent compounds against NMT from *Leishmania amazonensis*. Our results pointed to three potential NMT ligands that showed promising results in cytotoxicity assays, with CL 54016012 showing the lowest IC₅₀ value. However, more tests need to be carried out to better understand their relationship with the NMT of *Leishmania* spp and its human counterpart, enabling their potential use in *in vivo* tests and as a treatment alternative for this important and neglected disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank OpenEye Scientific Software for kindly providing us with its software Free Academic Licensing used in this work.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

FUNDING

This work was supported by FAPEMIG (Minas Gerais Research Foundation), under Grant APQ-01307-17, APQ-01758-21; and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), under Grant number 88887.664097/ 2022-00.

REFERENCES

ABDELKRIM, Y. Z. et al. Enzymatic and Molecular Characterization of Anti-*Leishmania* Molecules That Differently Target *Leishmania* and Mammalian eIF4A Proteins, LieIF4A and eIF4AMus. **Molecules**, v. 27, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27185890>

ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>

ALEIXO, J. A. et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 79–82, jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.025>

BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI, G.; MOMEM, H.; CARVALHO, E. M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 35, no. 4, p. 732–734, 1986. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.732>

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.; JOHNSON, W. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 44 5, p. 536–546, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.536>

BELL, A. et al. Novel Thienopyrimidine Inhibitors of *Leishmania* N-Myristoyltransferase with On-Target Activity in Intracellular Amastigotes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 7740–7765, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00570>

BELL, A. S. et al. Selective inhibitors of protozoan protein N-myristoyltransferases as starting points for tropical disease medicinal chemistry programs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001625>

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 15 out. 1984. <https://doi.org/10.1063/1.448118>

BRANNIGAN, J. A. et al. N-myristoyltransferase from *Leishmania donovani*: structural and functional characterisation of a potential drug target for visceral leishmaniasis. **Journal of molecular biology**, v. 396, n. 4, p. 985–999, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.032>

BRANNIGAN, J. A. et al. Diverse modes of binding in structures of *Leishmania major* N-myristoyltransferase with selective inhibitors. **IUCrJ**, v. 1, p. 250–260, 2014. <https://doi.org/10.1107/S2052252514013001>

BULUSU, G.; DESIRAJU, G. R. Strong and Weak Hydrogen Bonds in Protein–Ligand Recognition. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 100, n. 1, p. 31–41, 2020. <https://doi.org/10.1007/s41745-019-00141-9>

CARTER, K. et al. Comparative Proteomics and Genome-Wide Druggability Analyses Prioritized Promising Therapeutic Targets against Drug-Resistant *Leishmania tropica*. **Microorganisms**, v. 11, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010228>

CHOWDHURI, S. P. et al. Novel Pyrido[2',1':2,3]imidazo[4,5-c]quinoline Derivative Selectively Poisons *Leishmania donovani* Bisubunit Topoisomerase 1 to Inhibit the Antimony-Resistant *Leishmania* Infection in Vivo. **Journal of medicinal chemistry**, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01932>

- CORPAS-LÓPEZ, V. et al. Pharmacological Validation of N-Myristoyltransferase as a Drug Target in *Leishmania donovani*. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, p. 111–122, 2018. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00226>
- EL-DIRANY, R. et al. Repurposing the Antibacterial Agents Peptide 19-4LF and Peptide 19-2.5 for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 14, 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112528>
- ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 15 nov. 1995. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- FREARSON, J. A. et al. N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 728–732, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08893>
- GUPTA, Y. et al. Repurposing Lansoprazole and Posaconazole to treat leishmaniasis: Integration of *in vitro* testing, pharmacological corroboration, and mechanisms of action. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 30, p. 128–149, 2022. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3394>
- HAWKINS, P.; SKILLMAN, A.; NICHOLLS, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. **Jornal of Medicial Chemistry**, v. 50, p. 74–82, 2007. <https://doi.org/10.1021/jm0603365>
- HUTTON, J. et al. Structure-Based Design of Potent and Selective *Leishmania* N-Myristoyltransferase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 8664–8670, 2014. <https://doi.org/10.1021/jm5011397>
- JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–48, 4 abr. 1997. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- KARPLUS, M.; PETSKE, G. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, v. 347, p. 631–639, 1990. <https://doi.org/10.1038/347631a0>

- KEARNES, S.; PANDE, V. ROCS-derived features for virtual screening. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 30, p. 609–617, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9959-3>
- MASSOVA, I.; KOLLMAN, P. A. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 18, n. 1, p. 113–135, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008763014207>
- MENDES ROATT, B. et al. MINI-REVIEW Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965–8977, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>
- MYSINGER, M. M. et al. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 26 jul. 2012. <https://doi.org/10.1021/jm300687e>
- NUNES, D. C. O. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, n. 7, p. 844–854, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000012>
- ORABI, M. et al. Identification of Potential *Leishmania* N-Myristoyltransferase Inhibitors from *Withania somnifera* (L.) Dunal: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Investigation. **Metabolites**, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13010093>
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. **Physical Review Letters**, v. 45, n. 14, p. 1196–1199, 6 out. 1980. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196>
- ROY, A. DNA Topoisomerase as Drug Target in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. **INDIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND ALLIED SCIENCES**, 2022. <https://doi.org/10.55184/ijpas.v74i02.55>

SAÚDE, O. P. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Núm. 12 (Dezembro de 2023). p. 14 p., 2024.

SEO, M. et al. Protein conformational dynamics dictate the binding affinity for a ligand. **Nature Communications**, v. 5, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms4724>

SOYER, T. G. et al. Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected with *Leishmania amazonensis*. **Pathogens**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020314>

SPASSOV, D. S.; ATANASOVA, M.; DOYTCHINOVA, I. **Inhibitor Trapping in N-Myristoyltransferases as a Mechanism for Drug Potency. International Journal of Molecular Sciences**, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241411610>

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

TRONCOSO, M. et al. Antiparasitic Activity of Two Natural Terpenes from *Salvia cuspidata* against *Leishmania amazonensis*. **Journal of natural products**, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00976>

VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 12 out. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>

ZOETE, V. et al. SwissParam: A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. **Wiley Online Library**, 2011. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>