

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**Identificação da família P450 como potenciais alvos
moleculares para o reposicionamento de fármacos para as
leishmanioses.**

RAPHAELA LOPES DA SILVA

Rio de Janeiro

2020

Lopes da Silva, Raphaela.

Identificação da família P450 como potenciais alvos moleculares para o reposicionamento de fármacos para as leishmanioses. / Raphaela Lopes da Silva. - Rio de Janeiro, 2020.

115 f.

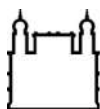
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientador: Eduardo Caio Torres dos Santos.

Bibliografia: f. 74-84

1. Leishmanioses. 2. Reposicionamento de Fármacos. 3. Superfamília P450. 4. Bioinformática. 5. Alvos Farmacológicos. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Raphaela Lopes da Silva

**Identificação da família P450 como potenciais alvos
moleculares para o reposicionamento de fármacos para as
leishmanioses.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Eduardo Caio Torres do Santos

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: RAPHAELA LOPES DA SILVA

**Identificação da família P450 como potenciais alvos
moleculares para o reposicionamento de fármacos para as
leishmanioses.**

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ) -
Presidente e revisor

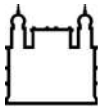
Prof. Dr. Diogo Antonio Tschoeke (Centro de Tecnologia, COPPE, UFRJ, RJ)

Prof. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (Faculdade de Ciências Médicas, UERJ)

Prof. Dra. Veronica Figueiredo do Amaral (Instituto de Biologia, UFF) – suplente

Dr. Thiago Estevam Parente Martins (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ) –
suplente

Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2020



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço de forma incondicional e inexplicável a Deus, pois se hoje esse documento está escrito, a Ele devo toda a força!

Inicialmente devo expressar minha total gratidão aos ilustres professores de biologia do ensino médio, responsáveis por me apresentarem o maravilhoso e extraordinário mundo da biologia, pelo qual sou absolutamente apaixonada.

É também graças a esse sentimento que consegui retirar as forças necessárias para superar as dificuldades físicas e psicológicas que me acometeram durante todo esse período de doutorado.

Agradeço em especial e nem tenho palavras reais para expressar esse agradecimento ao meu orientador Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, que é muito mais que um exímio orientador e profissional, tornou-se um amigo atencioso e querido, no qual teve fundamental e significativo papel quando compreendeu meus problemas e nunca deixou que eu desistisse de chegar até aqui.

Meus sinceros agradecimentos também a Dra Ana Carolina Guimarães e ao Dr. Marcos Catanho, pelos ensinamentos e direcionamentos sobre Bioinformática, assunto do qual nunca tinha estudado anteriormente em minha vida acadêmica, e toda colaboração com os experimentos *in silico* que compõem essa tese, como também suas experiências acerca do mundo acadêmico e da vida, conselhos e força para seguir e não desistir.

Não menos importante, agradeço ao Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral, que foi de suma importância no início da minha jornada rumo ao doutorado, tendo uma participação importantíssima na minha preparação para a defesa da seleção de doutorado. Com suas palavras: “A gente apanha em casa, para não apanhar na rua”.

Ao Dr. Valter Vianna de Andrade Neto e Dr. Edézio Ferreira Cunha-Junior, pelo relevante auxílio desde a confecção desse projeto, aos conhecimentos que me ajudaram na minha vida de doutoranda, a todo auxílio de forma prestativa, sempre dispostos a ajudar, até a finalização deste trabalho.

A Mestre Mayla Abraham pelas compilações e também explicações com relação as interpretações dos experimentos de Bioinformática.

A amiga Dra Viviane dos Santos Faiões, por ter me oferecido fundamental apoio técnico desde o início no laboratório, me passando seus aprendizados, com seus conselhos, conversas motivacionais e ombro amigo.

Ao amigo e Mestre Eduardo Veltri, pelas risadas, incentivos e suportes mútuo.

Aos companheiros de laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos pelo apoio e ajuda em toda a caminhada.

Ao grupo Torres Santos *et al.* pelo companheirismo e aprendizado.

Às agências de fomento que contribuíram de maneira notável para a realização de projeto.

A notável banca avaliadora pela disponibilidade e compromisso em avaliar esse trabalho e suas pontuais e importantes contribuições.

E não menos importante, agradeço à minha família: Maria das Neves, minha mãe, Ralph Moisés, meu pai, que nunca deixaram de incentivar os meus estudos. Minha irmã Daniela Lopes, que foi um apoio muito forte na reta final dessa caminhada. Aos meus avós Neusa Fidelis e João Moisés, que sempre me amaram de maneira incondicional e sempre apoiaram meus sonhos. E não menos importante, minha tia Valéria Moisés, que sempre está disponível para me ajudar a resolver os problemas da vida e ser a pessoa que me faz sorrir.

Agradeço, hoje, ao que considero minha segunda família: Claudio Vianna, Jupiara Costa e Corina Costa, que me acolheram no espaço físico da casa deles para que facilitasse minhas idas e voltas à Fiocruz. Jupiara Costa que nunca me deixou desistir também, sempre me incentivando e empurrando para que eu finalizasse esse belo trabalho.

Agradeço ao meu namorado, Matheus Vianna, que, sem palavras reais e imagináveis, consigo agradecer todo apoio, carinho, atenção, força psicológica, força física que me concedeu e, se hoje eu cheguei até aqui, devo muito e muito a ele.

Às minhas amigas herdadas da Biologia/UFF, que estão sempre dispostas a me ouvir, me ajudar, me aconselhar e me deram apoio total até o final desse trabalho, Nathalia Pelegrino e Kaylanne Montenegro.

Enfim, agradeço a todos que me apoiaram da melhor maneira possível para que eu chegasse até aqui.

“Permaneça Forte...”

Autor Desconhecido

RESUMO

Reposicionamento de fármacos para o tratamento das leishmanioses: identificação de novos alvos moleculares.

Espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* são agentes etiológicos das leishmanioses, um grupo de doenças que possuem grande impacto e distribuição mundial e são consideradas doenças reemergentes e negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde. O arsenal terapêutico disponível para o tratamento dessas doenças é limitado, contando com apenas um fármaco com atividade por via oral, a miltefosina, que não é licenciada no Brasil para o tratamento em humanos. Os fármacos tradicionais, como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e petamidina provocam diversos efeitos colaterais, possuem alta toxicidade, alto custo, além de crescentes casos de resistência. A inovação radical no desenvolvimento de fármacos é um processo que consome muito tempo e requer grande investimento financeiro e de recursos humanos. O reposicionamento de fármacos é uma abordagem que pode ser útil, pois essa estratégia oferece a vantagem de trabalhar com compostos comprovadamente seguros, possuem um perfil farmacológico favorável em humanos e tem determinadas atividades biológicas já descritas. Enzimas do complexo citocromo P450 (P450) são a uma superfamília de proteínas encontradas em todos os seres vivos, com papel importante no metabolismo de xenobióticos, além de participarem em diversas vias metabólicas, como a biossíntese de esteróis e ácidos graxos, entre outras. Diversos trabalhos já vêm sugerindo a inibição da CYP51 (esterol C14-desmetilase) de *Leishmania* spp. como um possível alvo para a quimioterapia das leishmanioses. Desta forma, neste trabalho analisamos o genoma de *L. infantum* em busca de enzimas P450 que ainda não tenham sido descritas e que sejam similares às enzimas P450 humanas. Foi realizada a busca no genoma do parasito por sequências similares a enzimas P450 humanas e foram selecionados 4 *hits* estatisticamente significativos. Análises de busca *in silico* de motivos característicos da superfamília P450 revelaram que os hits selecionados possuem assinaturas específicas de enzimas P450, assim como atividades biológicas ligadas a função de oxidação-redução. A identificação e localização desses motivos e predição de estruturas secundárias dos hits revelaram a co-localização dos motivos dentro das 4 sequências e também a conservação das estruturas secundárias α -hélice e β -folha. Dados *in silico* de expressão de mRNA e expressão proteica desses hits, assim como ensaios experimentais de expressão de mRNA demonstraram que estas sequências podem ser potencialmente expressas em proteínas. Esses resultados mostraram que as sequências P450 putativas de *L. infantum* possuem potencial para serem classificadas na superfamília de enzimas P450 e para serem candidatos a alvos para o reposicionamento para o tratamento das leishmanioses.

ABSTRACT

Drug repurposing for leishmaniasis treatment: identification of new molecular targets.

Species belonging to the genus *Leishmania* are etiological agents of leishmaniasis, a group of diseases that have great impact and worldwide distribution and are considered reemerging diseases and neglected by the World Health Organization (WHO). The therapeutic arsenal available for the treatment of these diseases is limited, with only one drug active by oral route, the miltefosine, which is not certified for human use in Brasil. The traditional drugs such as pentavalent antimonials, amphotericin B and pentamidine cause many side effects, have high toxicity, high cost, and increasing cases of resistance. Radical innovation in drug development is a time-consuming process that requires a large financial and human resource investment. Drug repurposing is a useful approach because this strategy offers the advantage of working with proven safe compounds, has a favorable pharmacological profile in humans, and has certain biological activities already described. Enzymes of the cytochrome P450 complex (P450) are a superfamily of proteins found in all living beings, with an important role in xenobiotic metabolism, and participate in many metabolic pathways, such as sterol and fatty acid biosynthesis, among others. Several works have already suggested inhibiting CYP51 (sterol C14-demethylase) from *Leishmania* spp. as a possible target for leishmaniasis chemotherapy. Thus, in this work we analyze the *L. infantum* genome for search P450 enzymes that have not yet been described and which are homologous to human P450 enzymes. The parasite genome was searched for human P450 enzymes homologous sequences and 4 statistically significant hits were selected. *In silico* search analyzes of motifs characteristic of the P450 superfamily revealed that the selected hits have specific signatures of P450 enzymes, as well as biological activities linked to the oxidation-reduction function. The identification and location of these motifs and prediction of secondary structures of the hits revealed the co-localization of the motifs within the 4 sequences and also the conservation of the secondary structures α -helix and β -leaf. *In silico* data of mRNA expression and protein expression of these hits, as well as experimental mRNA expression assays demonstrated that these sequences can potentially be expressed in proteins. These results showed that the putative P450 sequences of *L. infantum* have the potential to be classified in the superfamily of P450 enzymes and to be candidates for targets for repositioning for the treatment of leishmaniasis.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ANEXOS	XIV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As leishmanioses	1
1.2. Agente etiológico	1
1.3. Classificação taxonômica	3
1.4. Ciclo biológico	3
1.5. Manifestações clínicas	5
1.6. Epidemiologia	7
1.7. Tratamento das leishmanioses	13
1.8. Desenvolvimento de novos fármacos	16
1.9. Reposicionamento direcionado	22
1.10. Reposicionamento de fármacos.....	22
1.11. Superfamília Citocromo P450.....	25
1.12. A escolha das enzimas P450 como alvo farmacológico.....	30
2. Justificativa e Hipótese	32
3. Objetivo geral	33
3.1. Objetivos específicos	33
4. Metodologia	34
4.1. Predição <i>in silico</i> de novas proteínas do complexo enzimático do citocromo P450 (P450) em <i>L. infantum</i>	34
4.2. Mapeamento das sequências humanas identificadas no CYPED como potencialmente homólogas às sequências de <i>L. infantum</i> no Consórcio Uniprot Knowledgebase.....	35
4.3. Predição funcional <i>in silico</i> das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i>	36
4.4. Predição funcional <i>in silico</i> sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i> baseada na ontologia gênica	37
4.5. Alinhamento de múltiplas sequências, predição de estruturas secundárias e identificação de motivos da superfamília P450	37
4.6. Estudo <i>in silico</i> da expressão de mRNA e da expressão proteica em dados proteômicos das sequências P450 putativas em <i>L. infantum</i>	38
4.7. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	38
4.8. Parasitos.....	39
5. Resultados	40
5.1. Identificação no conjunto de proteínas preditas de <i>L. infantum</i> de sequências P450 potencialmente homólogas às sequências humanas depositadas no CYPED.....	40
5.2. Identificação das sequências humanas do CYPED no Consórcio Uniprot Knowledgebase.....	50

5.3. Predição funcional <i>in silico</i> das sequências P450 potencialmente homólogas de <i>L. infantum</i> .	61
5.4. Predição das estruturas secundárias baseada no alinhamento múltiplo de sequências e localização dos motivos conservados da superfamília P450.....	63
5.5. Análise <i>in silico</i> da anotação de mRNA e da expressão proteica em dados proteômicos das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i>	64
5.6. Análise dos níveis de mRNA das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i> .	65
6. Discussão	68
7. Conclusões	73
8. Referências	74
Anexos	85
Anexo 1. Artigos publicados	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfologia das formas de espécies do gênero <i>Leishmania</i>	2
Figura 1.2. Esquema do ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	4
Figura 1.3. Distribuição mundial da leishmaniose cutânea em 2016	8
Figura 1.4. Casos de leishmaniose tegumentar por Unidade Federativa no Brasil em 2015	9
Figura 1.5. Casos de leishmaniose tegumentar por regiões brasileiras de 2010 a 2017	10
Figura 1.6. Distribuição mundial da leishmaniose visceral em 2016	11
Figura 1.7. Casos de leishmaniose visceral por Unidade Federativa no Brasil em 2015	12
Figura 1.8. Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras de 2008 a 2017	13
Figura 1.9. Abordagens sistemáticas utilizadas no processo de reposicionamento de fármacos	21
Figura 4.1. Figura esquemática demonstrando as etapas de seleção de sequências potencialmente homólogas de <i>L. infantum</i> às sequências P450 humanas.....	35
Figura 5.1. Predição de estruturas secundárias através do alinhamento de múltiplas sequências das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i>	64
Figura 5.2. Expressão de mRNA em <i>L. infantum</i> por RT-PCR quantitativa em tempo real – razões da expressão de mRNA	66
Figura 5.3. Expressão de mRNA em <i>L. infantum</i> por RT-PCR quantitativa em tempo real – valores de delta dos valores de CT.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Exemplos de fármacos licenciados em que o reposicionamento foi bem-sucedido para o tratamento de outras doenças e a abordagem utilizada.....	19
Tabela 1.2. Enzimas da superfamília P450 no genoma humano e suas principais funções metabólicas.....	29
Tabela 5.1. Sequências P450 putativas a LinJ.11.1100 e suas sequências potencialmente homólogas humanas e depositadas no banco de dados CYPED ...	42
Tabela 5.2. Sequências P450 putativas a LinJ.27.0090 e suas sequências potencialmente homólogas humanas depositadas no banco de dados CYPED	43
Tabela 5.3. Sequências P450 putativas a LinJ.30.3610 e suas sequências potencialmente homólogas humanas depositadas no banco de dados CYPED	45
Tabela 5.4. Sequências P450 putativas a LinJ.34.3110 e suas sequências potencialmente homólogas humanas depositadas no banco de dados CYPED	49
Tabela 5.5. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.11.1100 identificadas e classificadas no consórcio Uniprot Knowledgebase	51
Tabela 5.6. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.27.0090 identificadas e classificadas no consórcio Uniprot Knowledgebase	52
Tabela 5.7. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.30.3610 identificadas e classificadas no consórcio Uniprot Knowledgebase	54
Tabela 5.8. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.30.3610 identificadas e classificadas no consórcio Uniprot Knowledgebase	59
Tabela 5.9. Predições funcionais encontradas no banco de dados InterPro através da ferramenta Interproscan das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i>	61
Tabela 5.10. Predições funcionais de ontologia gênica mapeadas no consórcio Gene Ontology através do programa Argot2.5 das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i>	62
Tabela 5.11. Anotações de expressão de RNA mensageiro encontradas no conjunto de transcritos obtidos do banco de dados TriTrypDB das sequências P450 putativas de <i>L. infantum</i>	65

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Artigos publicados.....	85
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEUA – Comissão ética no uso de animais
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNDi – Iniciativa de medicamentos para doenças negligenciadas
DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas
FDA – Food and Drug Administration
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HTS – High Throughput Screening
IC₅₀ – Concentração efetiva que inibe 50% da atividade
IF – Índice de infecção
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
LD – Leishmaniose Cutânea Disseminada
LDPC – Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
LM – Leishmaniose Mucosa
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada
OMS – Organização Mundial de Saúde
P&D – Pesquisa e Desenvolvimento
PBS – Salina tamponada com fosfato
RNA – Ácido ribonucleico
SFB – Soro fetal bovino

1. Introdução

1.1. As leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de zoonoses classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), termo que tem sido utilizado para se referir a um conjunto de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários, com prevalência maior em populações de baixa renda, localizadas, sobretudo na África, Ásia e Américas, e que denotam baixo interesse da indústria farmacêutica, pelo seu reduzido potencial de retorno lucrativo, assim como investimentos reduzidos no financiamento para desenvolvimento em pesquisas (Souza, 2010).

Atualmente, são consideradas doenças reemergentes, devido a uma mudança no comportamento epidemiológico, ou seja, que rapidamente aumentou sua incidência nos últimos anos e ampliou sua distribuição geográfica (Boulos, 2001), e, segundo a OMS, são endêmicas em 149 países, acometendo mais de um bilhão de pessoas no mundo.

1.2. Agente etiológico

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à classe Kinetoplastea, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. São organismos eucariotos unicelulares caracterizados por possuírem dois compartimentos distintos de armazenamento das suas informações genéticas: no núcleo, cujo DNA genômico nuclear é responsável pelas informações básicas de manutenção do organismo, e em uma única mitocôndria contendo uma estrutura chamada cinetoplasto, composta por maxicírculos e minicírculos que armazenam o kDNA, responsável por regular parte das informações necessárias para o funcionamento mitocondrial (Floeter-Winter & Cruz, 2011). São parasitos digenéticos, ou seja, só completam o seu ciclo evolutivo passando pelo menos em dois hospedeiros. Assim, possuem duas formas biológicas distintas (Fig. 1.1): a forma promastigota, extracelular, encontrada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, caracterizada pela morfologia alongada, núcleo arredondado ou oval localizado na região mediana, com flagelo aparente emergindo da bolsa flagelar localizada na região anterior do parasito, formada por

uma invaginação da membrana plasmática, que auxilia na sua movimentação e a fixar-se no epitélio intestinal do inseto vetor; e a forma amastigota, intracelular, encontrada dentro das células do sistema fagocitário do hospedeiro vertebrado, com morfologia ovoide ou esférica e flagelo curto e interiorizado na bolsa flagelar, núcleo arredondado, ocupando cerca de um terço do parasito. Nessa forma, cinetoplasto possui forma de bastão e fica localizado entre o núcleo e a base do flagelo (Rey, 2008). Além das organelas e estruturas típicas das células eucariotas como retículo endoplasmático, complexo de golgi, citoesqueleto, mitocôndria e núcleo, as formas promastigotas apresentam organelas que podem ser exclusivas da Família Trypanosomatidae como o glicossomo, organela que possui enzimas glicolíticas e está associada, entre outras funções, ao metabolismo e armazenamento de glicogênio (Parsons *et al.*, 2001), o acidocalcissomo, organela de pH ácido responsável principalmente pelo armazenamento de Ca^{2+} , importante molécula ligada à regulação da sinalização celular, assim como essencial na motilidade e divisão celular do parasito (Ramakrishnan & Docampo, 2018) e os microtúbulos subpericulares, principal componente do citoesqueleto dos tripanossomatídeos e estão distribuídos por todo corpo celular, com exceção da região da bolsa flagelar (Teixeira *et al.*, 2013).

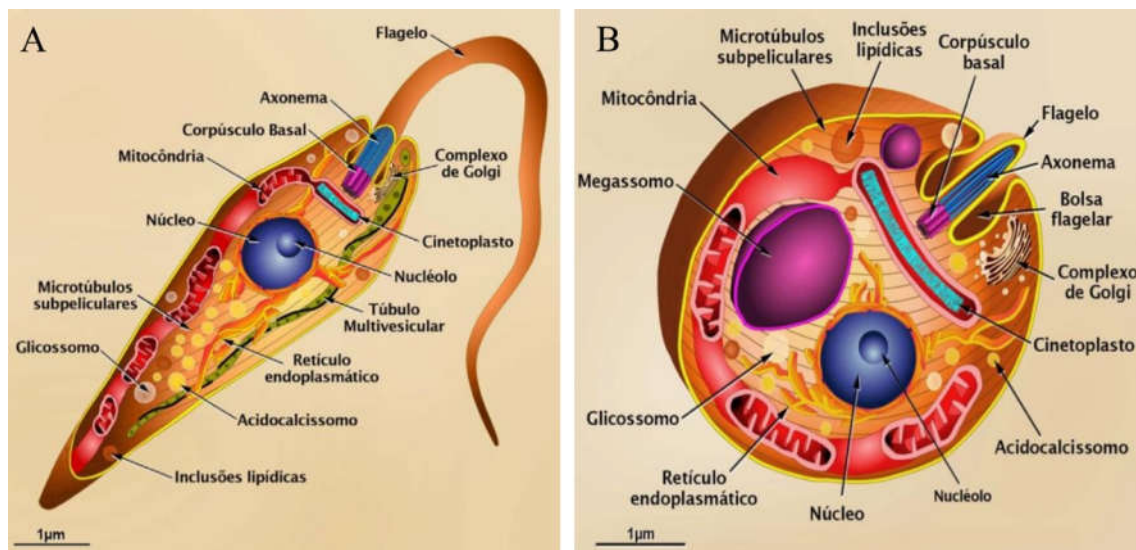


Figura 1.1. Morfologia das formas biológicas de espécies do gênero *Leishmania*. (A) forma promastigota e (B) forma amastigota. (Fonte: Teixeira *et al.*, 2013).

1.3. Classificação taxonômica

A classificação atual para espécies de *Leishmania* é organizada baseada em dados moleculares, dividindo-as em duas linhagens filogenéticas referidas como seções: *Euleishmania* e *Paraleishmania*. A primeira delas é composta por dois subgêneros: subgênero *Leishmania*, que inclui quatro complexos principais de espécies: *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania tropica*; subgênero *Viannia*, compreendendo os complexos de espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*. Esses dois complexos possuem distribuição geográfica bem conhecidas. O subgênero *Viannia* é restrito aos trópicos do Novo Mundo, enquanto o subgênero *Leishmania* ocorre tanto no Novo quanto no Velho Mundo.

A seção *Paraleishmania* inclui as espécies *Leishmania hertigi*, *Leishmania deanei*, *Leishmania herreri*, *Leishmania equatorensis* e *Leishmania colombiensis* bem como o antigo gênero *Endotrypanum*. Deste grupo, apenas *L. colombiensis* foi caracterizado como sendo patogênico para os seres humanos.

Existem 53 espécies descritas (excluindo espécies sinônimas caracterizadas por ensaios moleculares e incluindo todos os subgêneros e complexos), sendo 29 espécies presentes no Velho Mundo, 20 espécies no Novo Mundo, 3 espécies presentes em ambos (*L. siamensis*, *L. martiniquensis* e *L. infantum*) e uma espécie encontrada na Austrália. Entre estas reconhecidas, 20 espécies são conhecidas por serem patogênicas aos seres humanos (Akhoundi *et al.*,2016; Akhoundi *et al.*,2017).

1.4. Ciclo biológico

Os parasitos de *Leishmania* possuem seu ciclo biológico heteroxênico, ou seja, realizam seu ciclo em dois tipos de hospedeiros: um invertebrado e outro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são insetos vetores do gênero *Phlebotomus* Loew (1845), no Velho Mundo e *Lutzomia* França (1924), no Novo Mundo. Ambos os gêneros pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo denominados flebotomíneos. Já os hospedeiros vertebrados podem ser pequenos mamíferos roedores, gambás e cães, que atuam como reservatórios silvestres e domésticos, e o homem.

O ciclo se inicia quando o hospedeiro invertebrado, flebotomíneo fêmea infectada, realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado e assim ocorre a inoculação de promastigotas metacíclicas, forma infecciosa do parasito. Células fagocíticas do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos teciduais e neutrófilos, fagocitam as promastigotas, ocorrendo a diferenciação em amastigotas. Esta forma divide-se intensamente por fissão binária dentro de um vacúolo parasitóforo, podendo ocasionar a lise dessa célula infectada e liberação do parasito, disseminando a infecção quando fagocitados novamente por outras células. Eventualmente, um flebotomíneo não infectado realiza um repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, e dentro do intestino do inseto as amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas e posteriormente nas formas metacíclicas infectantes novamente, fechando o ciclo (Fig. 1.2) (Teixeira *et al.*, 2013).

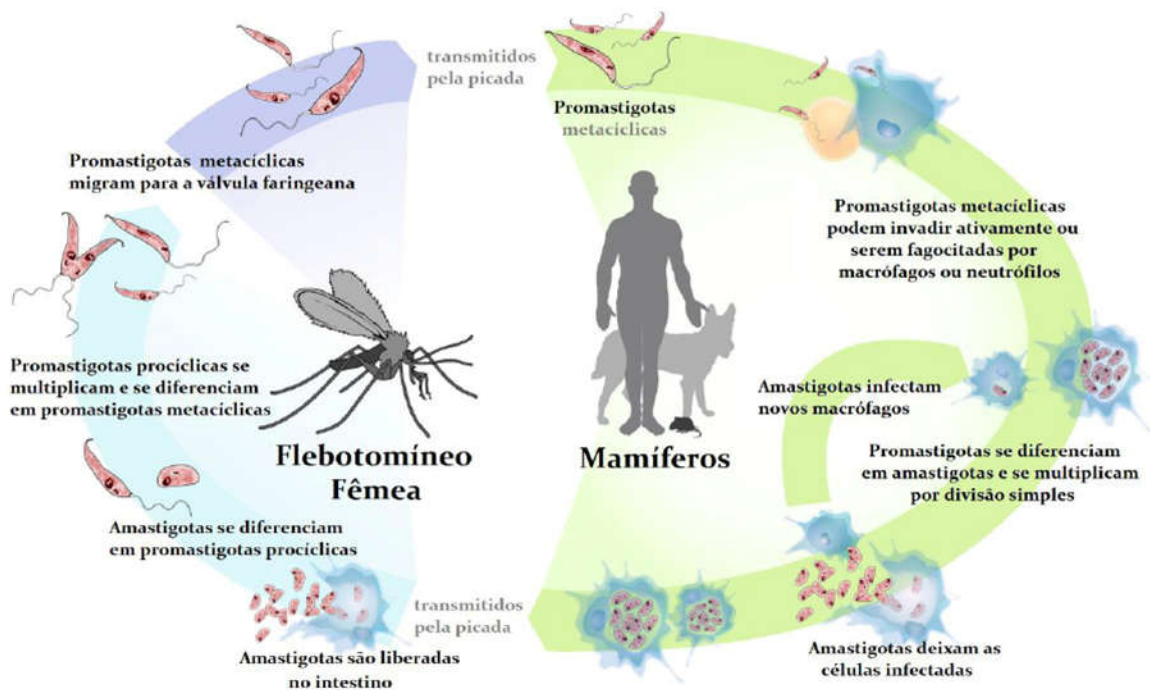


Figura 1.2. Esquema do ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* (Fonte: http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_visce_ral_canina.html).

1.5. Manifestações clínicas

Espécies distintas de *Leishmania* causam diferentes manifestações clínicas da doença. O resultado dessas manifestações varia de acordo com características do parasito, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, com as respostas imunes sendo as mais determinantes como fator do hospedeiro. As infecções por *Leishmania* dividem-se em duas formas clínicas principais: 1) a leishmaniose tegumentar, que se subdivide em: cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LD), cutânea difusa (LCD), mucocutânea ou mucosa (LM) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC); 2) e a leishmaniose visceral (LV) (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; Burza *et al.*, 2018).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a mais prevalente manifestação clínica das leishmanioses. Caracteriza-se um por única lesão ou um pequeno número de lesões ulceradas, com as bordas elevadas, abertas, o que facilita a infecção secundária por bactérias ou fungos. Geralmente são lesões próximas ao sítio de inoculação do flebotomíneo (Barral *et al.*, 1995). As principais espécies causadoras da LCL são *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (V.) panamensis*, e até mesmo espécies consideradas viscerotrópicas, ou seja, que tenham tropismo por órgãos internos, como *L. (L.) infantum* (Oliveira Neto *et al.*, 1986) e *L. (L.) donovani* (Karunaweera *et al.*, 2003) já demonstraram causar esse tipo de manifestação clínica (Grimaldi *et al.*, 1989; Pearson & Souza, 1996).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara da doença e caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas lesões, distantes do sítio de inoculação, porém sem tendência a ulceração, sendo papulosas ou nodulares, ricas em formas amastigotas, localizadas geralmente em áreas expostas, como face, membros superiores e inferiores (Azeredo-Coutinho & Mendonça, 2014). As principais espécies causadoras dessa manifestação são *L. (L.) amazonensis* (Barral *et al.*, 1991), *L. (L.) mexicana* (Velasco *et al.*, 1989), *L. (L.) pifanoi* (Convit *et al.*, 1972), *L. (L.) aethiopica* (Akuffo *et al.*, 1997) e *L. (L.) major* (Develoux *et al.*, 1996).

A leishmaniose cutânea disseminada (LD) é descrita como uma forma emergente de infecção por *L. braziliensis*, identificada por suas características únicas: inicia-se por uma lesão única, geralmente nas extremidades, seguida de

disseminação pelo corpo todo e com alta frequência de envolvimento das mucosas, através da metástase por corrente sanguínea. É a forma clínica que apresenta lesões numerosas, pleomórficas, podendo apresentar-se de forma acneiformes, papulosas, nodulares e/ou ulceradas. As principais espécies que podem causar essa manifestação são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, e *L. (L.) amazonensis* (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002; Couppie *et al.*, 2004; Hashiguchi *et al.*, 2016).

Na maioria das vezes, a leishmaniose mucosa é resultante de uma lesão cutânea curada na ausência de tratamento ou tratada de forma inadequada e se manifesta posteriormente nas mucosas (Goto & Lindoso, 2010). A leishmaniose mucosa é uma das formas mais graves da leishmaniose tegumentar. Acomete principalmente a mucosa das vias aéreas superiores, levando a lesões destrutivas as mucosas de nariz, boca, faringe e laringe (Pearson & Souza, 1996). Pode ocorrer após complicações da LCL causada por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Também pode ocorrer meses a anos após a resolução das lesões cutâneas localizadas primárias, sugerindo persistência latente do parasito no organismo do paciente (Jones *et al.*, 1987; Machado-Coelho *et al.*, 2005). Quando a LM progride sem tratamento adequado, ela pode levar à desfiguração pela extensa destruição do tecido, evoluindo para a morte por complicações como: desnutrição, obstrução das vias aéreas e insuficiência respiratória (Ridley *et al.*, 1989). Pode ser causada principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis* (Costa *et al.*, 1986), *L. (V.) panamanensis* (Osorio *et al.*, 1998), *L. (V.) guyanensis* (Santrich *et al.*, 1990) e, raramente, por *L. (L.) amazonensis* (Costa *et al.*, 1986; Lucas *et al.*, 1998).

Por fim, dentro do grupo das leishmanioses tegumentares está a leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC), e constitui uma forma mais rara da doença. Caracteriza-se por uma complicação da leishmaniose visceral causada pela espécie *L. (L.) donovani*, ocorrendo principalmente no leste da África (Sudão, Etiópia, Quênia) e no subcontinente indiano (Índia, Bangladesh, Nepal) ou seguinte à resolução de uma infecção visceral. As lesões aparecem em qualquer parte do corpo, mas geralmente ocorrem na região do rosto. (Ready, 2014). Essa forma clínica é bastante prevalente em pacientes HIV-positivos. Casos de relatos de LDPC devido a outras espécies de *Leishmania* viscerotrópicas como *L. (L.) infantum* são

escassos. Alguns casos de lesões cutâneas não ulceradas causadas por infecção por *L. (L.) infantum* foram relatados, mas estes foram classificados em um estado da doença diferente de LDPC (Scorza *et al.*, 2017).

A leishmaniose visceral (LV) constitui a forma mais grave da doença, levando muito comumente os pacientes ao óbito se não diagnosticados e tratados, com uma taxa de óbito de 75% a 95% (Ready, 2014). Duas espécies principais causam a leishmaniose visceral: *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, que acometem órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. O início da doença pode ser agudo ou de incidência tardia, com período de incubação entre 2 semanas e 18 meses, mas os sintomas da LV podem levar anos para aparecer (Ready, 2014). Febre irregular persistente e esplenomegalia caracterizam essa forma clínica. Tardiamente, os pacientes apresentam sintomas como pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia, perda de peso e imunossupressão, tornando-os suscetíveis a infecções secundárias. O vírus HIV e parasitos de *Leishmania* partilham um mecanismo comum de imunopatologia envolvendo macrófagos e células dendríticas, resultando na progressão acelerada de ambas doenças devido à maior replicação dos parasitos. (Boaelaert *et al.*, 2018).

1.6. Epidemiologia

As leishmanioses são doença que afetam principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, e está associada principalmente à desnutrição, deslocamento da população, moradia precária, deficiência imunológica e falta de recursos. Dos 200 países e territórios que reportam à Organização Mundial de Saúde, 97 foram reportados endêmicos para leishmaniose em 2017. Isso inclui 65 países que são endêmicos tanto para leishmaniose visceral (LV) como para leishmaniose tegumentar (LT), 10 países que são endêmicos apenas para LV e 22 países que são endêmicos apenas para LT (WHO, 2017).

É uma doença amplamente predominante em países de climas tropical, subtropical e temperado, e cerca de 350 milhões de pessoas estão sob risco de contaminação. Estima-se que 12 milhões pacientes sofram de leishmaniose (Georgiadou *et al.*, 2015). Os últimos dados epidemiológicos demonstrados pela OMS apresentam 22.145 mil novos casos de leishmanioses reportados no mundo

em 2017: 94% deles ocorreram em 7 países – Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

No que se refere a leishmaniose tegumentar, cerca de 95% dos casos autóctones (nativos do local) ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (Fig. 1.3). Mais de 95% dos novos casos de LT ocorreram em seis países em 2017: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600 mil e 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2019). Em 2016, 20 países relataram casos importados de LT, totalizando um número de 1695 casos não autóctones reportados (WHO, 2017).

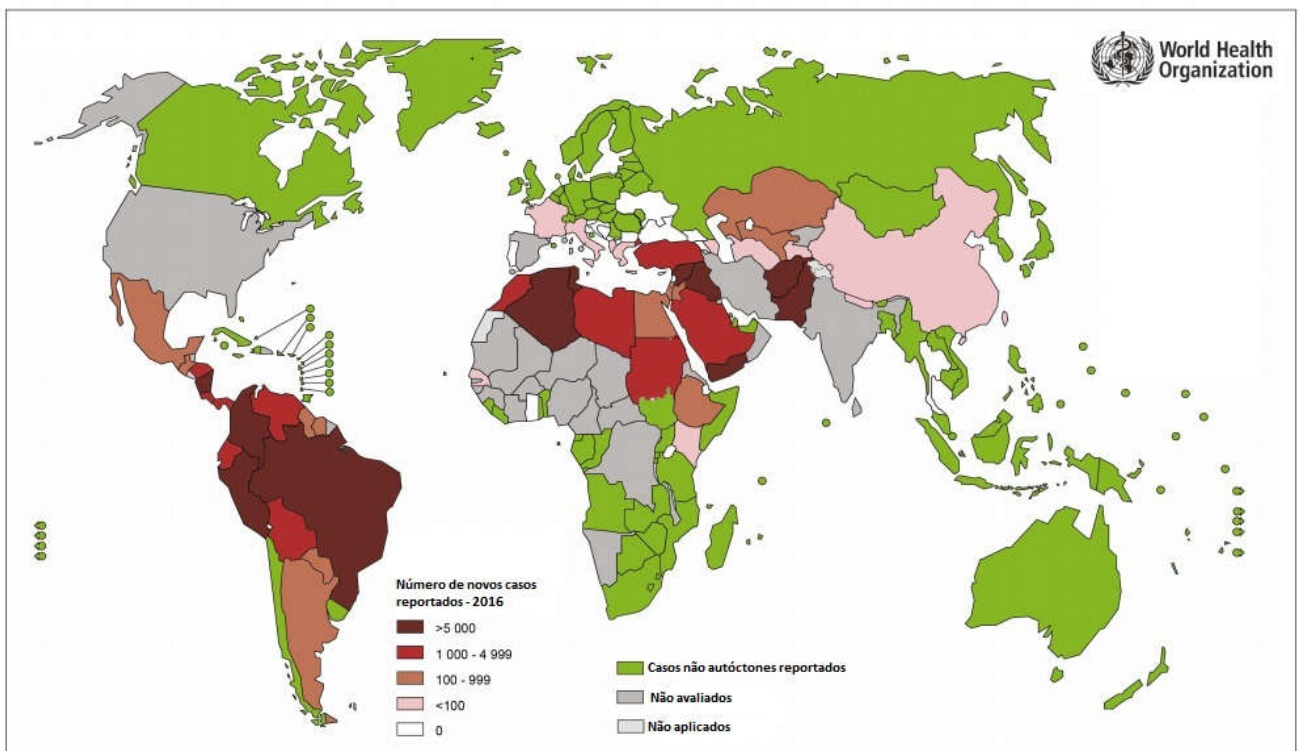


Figura 1.3. Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar em 2016. Adaptado de OMS, 2016. (Fonte: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1)

No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras (Fig. 1.4). Na década de 1980, foram registrados casos de LT em 19 estados do país; em 2003, havia casos autóctones registrados em todas as 27 Unidades Federativas, evidenciando a

expansão da doença pelo país (Brasil, 2017). A Figura 1.4 mostra um mapa da distribuição da leishmaniose tegumentar por estado no Brasil em 2015, com a maioria dos casos ocorrendo na região Norte e nos estados de Mato Grosso, Maranhão, Bahia e Minas Gerais. Em 2017, 17.528 novos casos de LT foram registrados no país, sendo 4,7% sendo da forma clínica mucosa e com um coeficiente de detecção de 8,44 por 100 mil habitantes. A região Norte concentrou o maior percentual de casos: 44,7%. A Figura 1.5 mostra um gráfico dos casos de leishmaniose tegumentar por região brasileira, de 2010 a 2017, confirmando a prevalência dos casos da doença na região Norte (Ministério da Saúde, 2019).

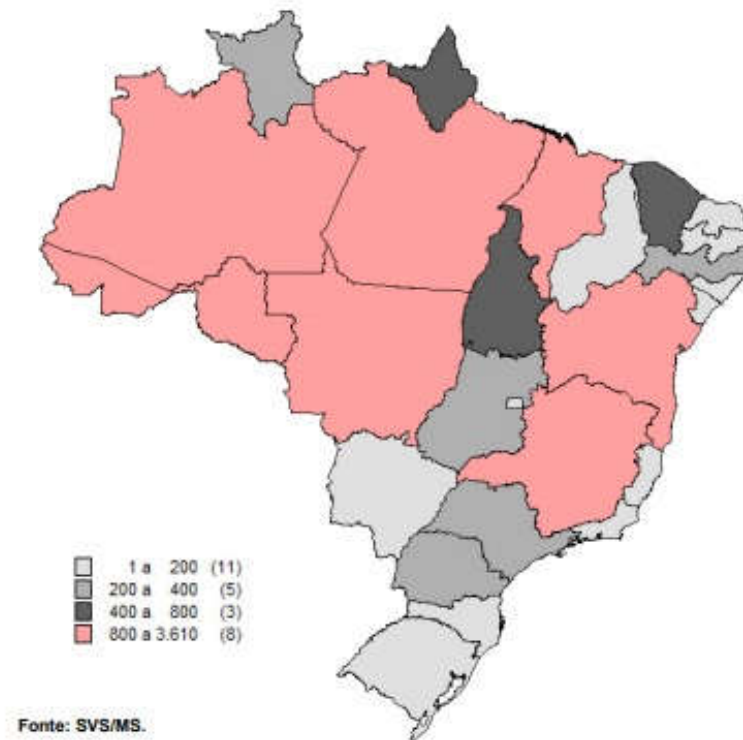


Figura 1.4. Casos de leishmaniose tegumentar por Unidade Federativa no Brasil em 2015. (Fonte: SVS/MS – Ministério da Saúde 2019).

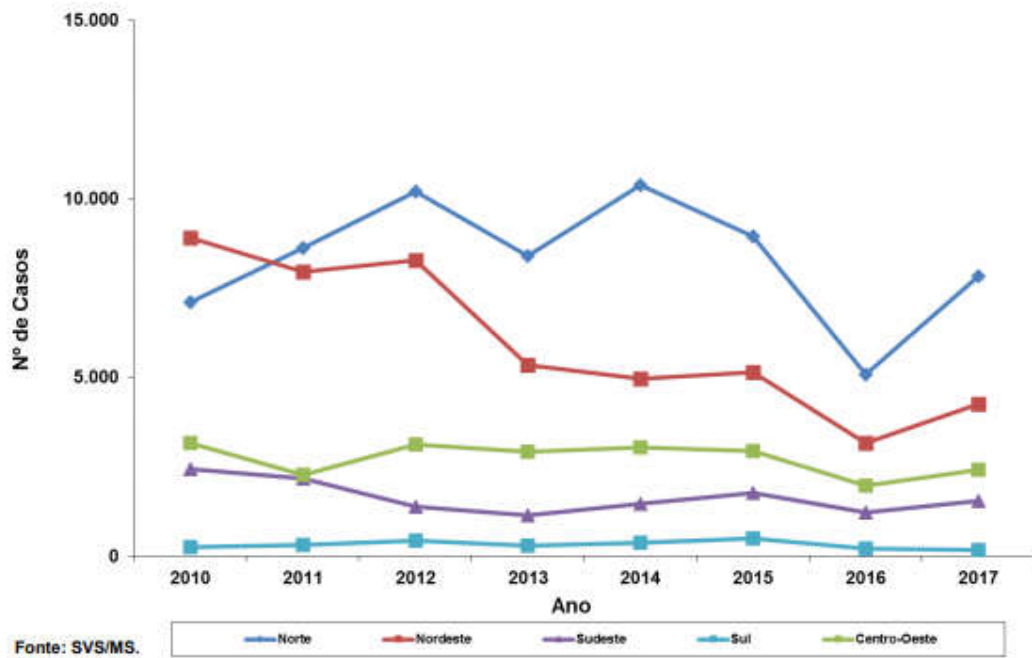


Figura 1.5. Casos de leishmaniose tegumentar por regiões brasileiras de 2010 a 2017. Fonte: SVS/MS – Ministério da Saúde 2019).

Com relação à leishmaniose visceral, a maioria dos casos ocorrem no Brasil, na África Oriental e no Sudeste Asiático (Fig. 1.6). Estima-se que 50 mil a 90 mil novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas cerca de 25-45% são relatados à OMS (WHO, 2016). Em 2017, mais de 95% dos novos casos notificados ocorreram em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019). Em 2016, 10 países relataram casos importados de LV, totalizando um número de 120 casos não autóctones reportados (WHO, 2017).

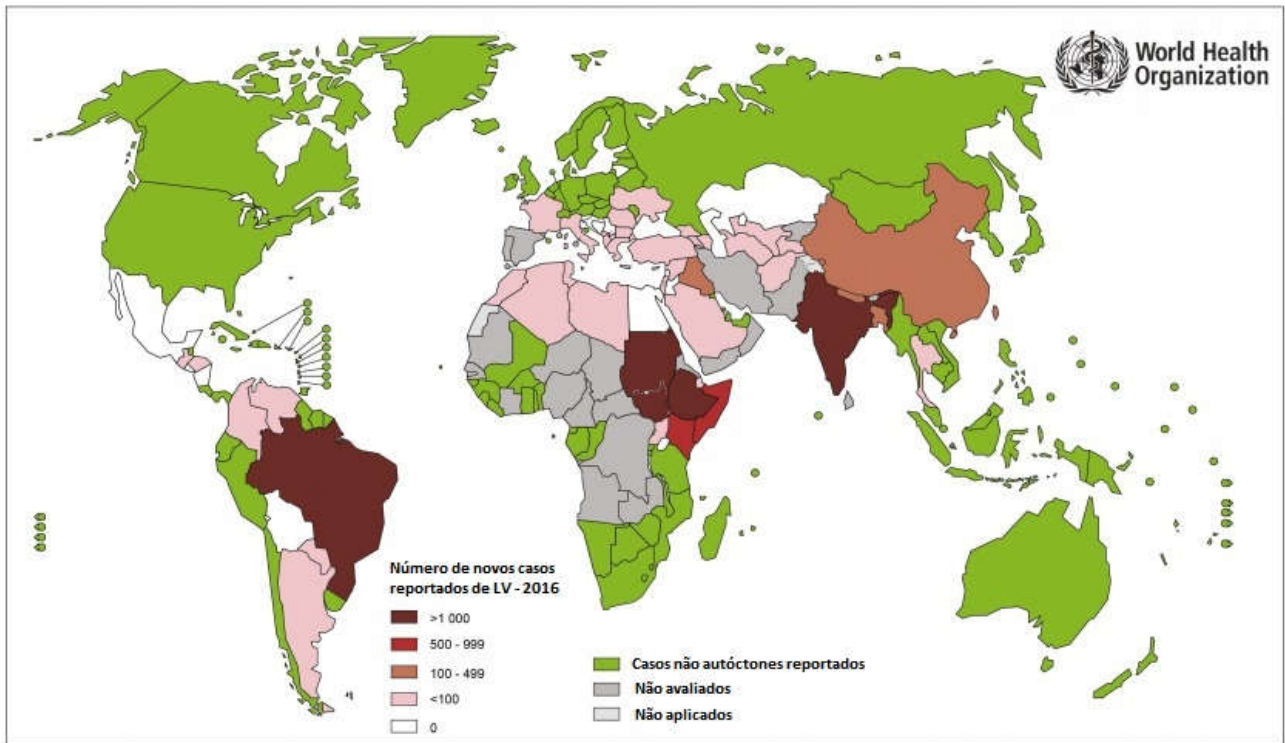


Figura 1.6. Distribuição mundial da leishmaniose visceral em 2016. Adaptado de OMS, 2016.

(Fonte: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2016_with_imported_casxes.pdf?ua=1)

Inicialmente, no Brasil, a leishmaniose visceral (LV) era limitada a áreas rurais e pequenas localidades urbanas. Na década de 1990, 90% dos casos foram registrados na região Nordeste. Atualmente, está distribuída em 23 estados, atingindo as 5 regiões do país (Fig. 1.7) (Brasil, 2016). Os últimos dados epidemiológicos sobre LV do país são de 2017, quando foram registrados 4.103 casos de LV, com 7,8% dos casos de coinfeção *Leishmania*/HIV. O número de incidência de casos de LV no país nesse ano foi de 1,98 casos a cada 100mil habitantes, com índice de letalidade de 8,8%. Diferente da LT, a região Nordeste concentrou o maior número de casos de LV (44,5%). Essa prevalência na região Nordeste é mostrada na Figura 1.8, no gráfico que demonstra os casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras de 2008 a 2017 (Ministério da Saúde, 2017).

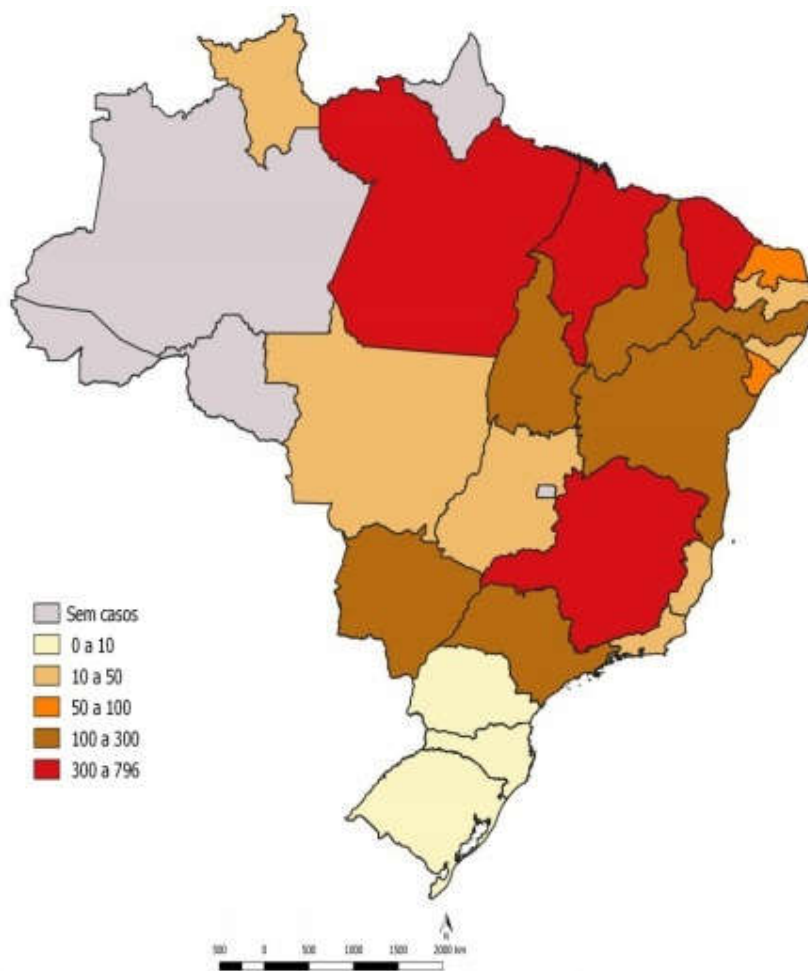


Figura 1.7. Casos de leishmaniose visceral por Unidade Federativa no Brasil em 2015. (Fonte: SVS/MS – Ministério da Saúde 2017).

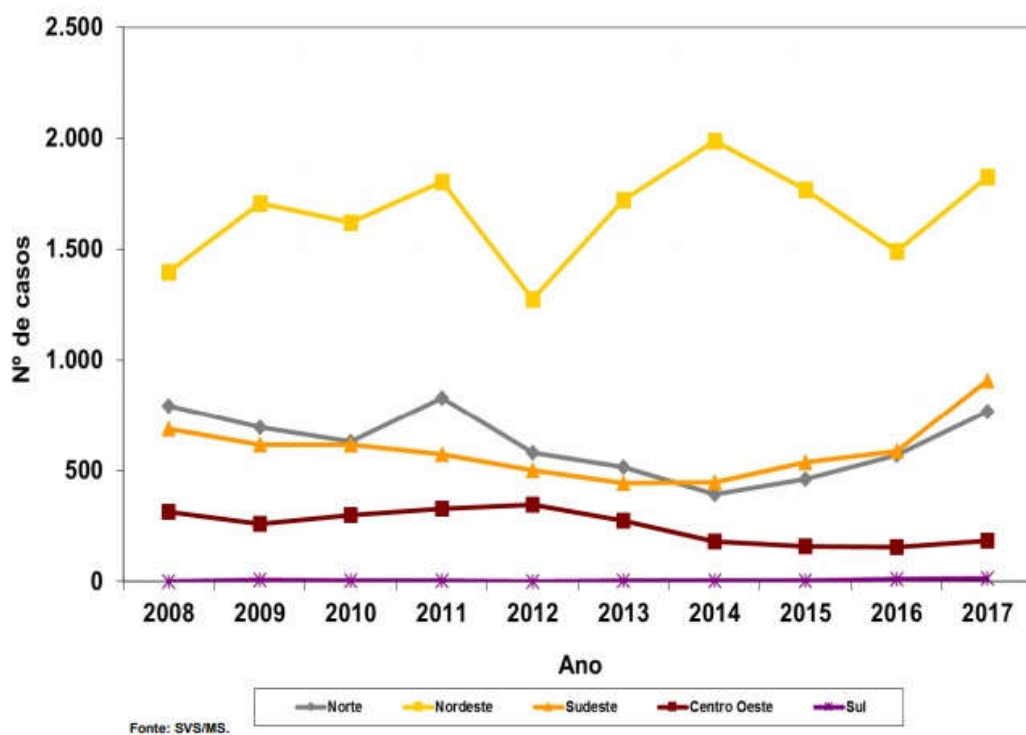


Figura 1.8. Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras de 2008 a 2017. Fonte: SVS/MS – Ministério da Saúde 2017).

1.7. Tratamento das leishmanioses

A quimioterapia atual das leishmanioses é baseada nos antimoniais pentavalentes, fármacos de primeira escolha. Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido utilizados, considerados de segunda escolha, como anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina (Uliana *et al.*, 2018).

Após observar o efeito do antimônio trivalente (tártaro emético) em outros parasitos, Gaspar Vianna em 1912 decidiu testar a eficácia desse composto para o tratamento de casos de leishmaniose cutânea diagnosticados em São Paulo fundando, assim, a base da quimioterapia da leishmaniose utilizada até hoje (Vianna, 1912). Porém, o antimônio trivalente possuía elevada toxicidade. O desenvolvimento, então, dos antimoniais pentavalentes permitiu uma redução na toxicidade do tratamento (Frézard *et al.*, 2009). As formulações atuais dos antimoniais pentavalentes comercialmente disponíveis são o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), e têm sido administrados por mais de 75 anos para o tratamento das leishmanioses (Sundar &

Chakravarty, 2015). Esses fármacos são licenciados no Sudeste da Ásia, América Latina e alguns países do Mediterrâneo e da África (DNDi, 2019).

O aumento do número de falhas terapêuticas dos antimoniais, devido ao surgimento de resistência aos medicamentos, além da alta toxicidade e presença de vários efeitos colaterais, têm dificultado o uso de antimoniais atualmente (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015). Como um dos fármacos de segunda escolha, a anfotericina B, um antifúngico da classe dos polienos, tem sido utilizada como uma alternativa para o tratamento das leishmanioses, registrada para uso em países do sul da Ásia e alguns países da África e América Latina (DNDi, 2019). Porém, devido ao seu alto custo e graves efeitos colaterais, esse fármaco deixou de ser amplamente utilizado. O desenvolvimento de uma formulação lipossomal da anfotericina B tornou-a menos tóxica e mais eficaz, apesar do alto custo, sendo a formulação mais utilizada no tratamento da leishmaniose visceral (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015). Esta formulação está licenciada para uso na Índia, EUA e Europa para tratamento da forma visceral e é utilizada como droga de segunda linha para o tratamento da LV na África Oriental e no Brasil (DNDi, 2019).

A pentamidina é outro fármaco utilizado de forma alternativa para o tratamento da leishmaniose, nos casos de resistência ao antimonial (Kaur & Rajput, 2014). Esse fármaco é uma diamidina sintética e sua atividade antiprotozoária foi descoberta através da busca de fármacos hipoglicemiantes cujo mecanismo de ação era o metabolismo energético (Neves *et al.*, 2011). Entretanto, seus efeitos colaterais, principalmente distúrbios cardiotoxicos e metabólicos (desenvolvimento de diabetes, por exemplo), bem como os casos de baixa eficácia e resistência, ainda não tornaram a pentamidina uma boa opção para o tratamento das leishmanioses (Uliana *et al.*, 2018).

Desenvolvida inicialmente contra o câncer, a miltefosina é o único fármaco atualmente administrado por via oral. Foi usada no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, com taxas de cura de cerca de 94% dos pacientes (Mohapatra, 2014). No entanto, após uma década de uso no país, foram descritos vários casos de recidiva e diminuição da eficácia do tratamento (Sundar *et al.*, 2012). Apesar da vantagem de ser administrada por via oral, o uso de miltefosina também está associado a muitos efeitos colaterais, principalmente relacionados ao trato

gastrintestinal e toxicidade hepática, além do seu potencial teratogênico (Sundar & Chakravarty, 2015).

A paromomicina foi usada pela primeira vez no tratamento da leishmaniose em 2002 como sulfato de paromomicina. Antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, é utilizado no tratamento das duas formas da doença, administradas de forma parenteral para a leishmaniose visceral e parenteral e tópica para a leishmaniose cutânea. Entre as vantagens associadas ao uso da paromomicina estão o baixo custo e a menor ocorrência de efeitos colaterais. No entanto, existe uma probabilidade de a paromomicina desenvolver resistência como monoterapia. Embora não descrito na clínica, há relatos de resistência *in vitro* em *L. donovani* e *L. tropica* (Mohapatra, 2014; Singh *et al.*, 2012).

A combinação de fármacos para o tratamento das leishmanioses é uma estratégia utilizada para combater a resistência do parasito desenvolvida pela monoterapia. Além de diminuir a dose dos medicamentos administrados em monoterapia, umas das principais estratégias para a redução da toxicidade dos tratamentos monoterápicos, há outras vantagens associadas à essa prática como: redução dos efeitos colaterais, a duração do tratamento, o custo e a desistência do tratamento pelos pacientes, visto que o tratamento atual é longo e necessita de hospitalização do paciente. A combinação de dois fármacos também aumenta a atividade através do uso de compostos com atividade sinérgica ou aditiva e diminui o risco de resistência aos medicamentos (Mohapatra, 2014). Estudos de combinação em andamento usam os fármacos já disponíveis na terapia das leishmanioses e enfocam dois esquemas de combinação: o uso dos antimoniais pentavalentes e paromomicina e a combinação da anfotericina B com a miltefosina. Ambas as estratégias são amplamente utilizadas na África e na Índia, onde muitos casos de resistência a antimoniais foram relatados. Embora a combinação de medicamentos seja mais vantajosa em relação à monoterapia, ainda não é uma opção abrangente para o tratamento da doença, visto que pacientes com coinfeção pelo HIV, gestantes, pacientes com insuficiência renal e até pacientes com alto grau de gravidade da doença são excluídos deste esquema terapêutico (Uliana *et al.*, 2018).

Existem poucos medicamentos disponíveis e licenciados para o tratamento da leishmaniose atualmente, frente à enorme quantidade de espécies patogênicas ao

homem existentes e as diversas formas clínicas causadas pela doença. Todos, como apresentados acima, apresentam complicações relacionadas à resistência, efeitos colaterais, falhas terapêuticas, alto custo, dificuldade na administração de medicamentos e longa duração do tratamento. Devido a toda essa problemática, é de suma importância a busca de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose, principalmente a forma visceral, a mais letal.

1.8. Desenvolvimento de novos fármacos

O processo de desenvolvimento de novos fármacos pode ocorrer através de dois caminhos: a inovação farmacêutica radical, que consiste no desenvolvimento de uma molécula inédita como princípio ativo de um novo medicamento a ser patenteado; e as inovações farmacêuticas incrementais, que são pautadas em algumas estratégias, como uma pequena modificação na estrutura química de um princípio ativo já conhecido, uma nova indicação de uso para uma entidade química já conhecida e novas associações de formulações já utilizadas usualmente (Vieira & Ohayon, 2006).

A inovação radical na indústria farmacêutica possui custos elevados, consome muito tempo e depende principalmente de etapas translacionais, que tratam basicamente da transformação dos conhecimentos adquiridos na pesquisa básica em um produto que possa ser administrado ao paciente. O maior desafio dessa transposição é chamado de “vale da morte”, que é descrito como o “momento crítico entre o desenvolvimento precoce e tardio de novas terapias, diagnósticos e dispositivos” (Liebhardt, 2019).

Todo o processo de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) farmacêutico radical envolve diversas etapas – que podem durar de 10 a 17 anos: inicialmente existem as etapas realizadas na pesquisa básica, com a finalidade de identificação de novos compostos biologicamente ativos ou de compostos de origem natural e/ou novos alvos, através do uso de ferramentas de bioinformática para a realização e otimização da pesquisa e triagem virtual. Após a identificação, segue-se com os ensaios testes de natureza pré-clínica em laboratórios de pesquisa básica, com a realização de ensaios *in vitro* e com o uso de animais e ensaios de natureza toxicológica e farmacológica, que podem demorar de 4 a 7 anos para serem

finalizados. Ao final dessa fase, estima-se que a taxa de sucesso, ou seja, a quantidade de moléculas candidatas que passam para o estágio posterior seja menor que 1%. As moléculas seguem então para os testes clínicos com seres humanos, divididos em três fases, com o intuito de testar a segurança e a eficácia do fármaco a ser desenvolvido. A fase I corresponde aos testes de segurança e tolerância de dose utilizando de 20-80 voluntários saudáveis, com taxa de sucesso estimada em 70%; a fase II corresponde aos estudos de segurança, eficácia e tolerância de efeitos colaterais em pequenos grupos de 100-300 voluntários pacientes, com taxa de sucesso de 50%; e a fase III constitui testes mais longos, tipicamente com uma faixa de 500 a 1000 pacientes, com o intuito de monitorar reações adversas ao uso a longo prazo, com taxa de sucesso também de 50%. Essas três fases têm uma duração de cerca de 4 a 7,5 anos. Se os ensaios clínicos forem bem-sucedidos em termos de qualidade, segurança e eficácia, chega a fase de aprovação governamental ou registro, onde um dossiê de todo o estudo é submetido à aprovação das autoridades regulatórias, o que pode levar de 1 a 2 anos de duração. E, por fim, uma fase de testes de fase IV, após o lançamento do produto, envolvendo milhares de pacientes, para identificar efeitos colaterais não previstos (Velloso, 2010).

No que se refere ao desenvolvimento de novos fármacos, o vale da morte é representado principalmente pela dificuldade do desenvolvimento de estudos de farmacocinética e toxicologia em modelos animais durante o desenvolvimento pré-clínico e pelos ensaios clínicos, devido ao alto custo e risco, pois à medida que as moléculas avançam pelas diferentes fases de desenvolvimento, os custos de pesquisa aumentam significativamente. Estima-se que os custos de pesquisas de fase III são, em média, 50% maiores que os da fase I e mais de 20% superiores aos da fase II (Liebhardt, 2019). Outro dado relevante em relação à inovação radical mostra que cerca de apenas 10% dos candidatos a fármaco que entram em ensaios clínicos são aprovados pelas agências reguladoras (Akhondzadeh, 2016). Os demais falham devido à ineficácia ou alta toxicidade, decorrentes do valor preditivo limitado dos estudos pré-clínicos (Plenge *et al.*, 2013).

Frente a toda essa dificuldade de P&D de novos fármacos, as estratégias de inovação incremental têm sido vistas com mais atenção pelas indústrias

farmacêuticas, principalmente a nova indicação de uso para uma entidade química, conhecida também como “reposicionamento de fármacos”. Essa expressão foi descrita pela primeira vez por Ashburn and Thor (2004) em seu artigo intitulado “Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs”. Essa estratégia se utiliza da disponibilidade de fármacos já licenciados na clínica para o tratamento de diversas patologias a fim de encontrar novos usos para esses medicamentos.

Essa tática vem sendo cada vez mais defendida como uma solução para os principais problemas que hoje existem no processo de inovação radical. O medicamento a ser reposicionado possui estudos pré-clínicos – perfil toxicológico, farmacológico e dados de biodisponibilidade – e as fases precoces de ensaios clínicos (fases I e II) já concluídos e determinados, além de sua atividade biológica já descrita, permitindo a redução dos custos e do tempo no desenvolvimento de novos fármacos. (Mehndiratta *et al.*, 2016). Essa estratégia pode ser especialmente útil para atender demandas específicas na saúde pública, como o tratamento de doenças órfãs e negligenciadas (Sardana *et al.*, 2011).

A ideia é inverter a ordem “tradicional” que vem sendo seguida desde então: as pesquisas começam o processo de descoberta já com um fármaco em mãos e passar a olhar para a doença, tentando correlacionar um ao outro (Neuberger, 2018). Suas vantagens em relação à inovação radical fizeram com que as indústrias farmacêuticas empreendessem nessa estratégia e atualmente é responsável por aproximadamente 30% dos medicamentos e vacinas recentemente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA nos últimos anos (Jin & Wong, 2014).

A maioria dos casos de descoberta de novas indicações de uso para uma entidade química já conhecida ocorrem através de processos casuais, ou seja, não envolveram uma abordagem sistemática. O sildenafil, por exemplo, foi desenvolvido em 1989 para o tratamento de angina e, posteriormente passou a ser comercializado como Viagra, para tratar a disfunção erétil. Atualmente, esse fármaco também tem sido investigado para o tratamento de câncer de pulmão (Keats *et al.*, 2018). Outros dois fármacos, o infliximabe e etanercepte, foram desenvolvidos inicialmente para tratamento de sepse, sem sucesso clínico e posteriormente tornaram-se princípios ativos de medicamentos disponíveis para o tratamento de artrite reumatoide, e foram

classificadas entre os cinco melhores fármacos comercializados em 2016 (Neuberger, 2018).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para direcionar a identificação de uma molécula candidata ao processo de reposicionamento. A Tabela 1.1 mostra uma compilação de exemplos bem-sucedidos de fármacos reposicionados, juntamente com as estratégias utilizadas, baseadas principalmente na compreensão da farmacologia do medicamento ou análises retrospectivas do efeito clínico de um medicamento quando prescrito para a sua indicação original. Tais análises impulsionaram o desenvolvimento de abordagens mais sistemáticas para identificar compostos reposicionáveis (Pushpakom *et al.*, 2018).

Tabela 1.1. Exemplos de fármacos licenciados em que o reposicionamento foi bem-sucedido para o tratamento de outras doenças e a abordagem utilizada. Adaptada de Pushpakom *et al.*, 2018.

Nome do Fármaco	Indicação original	Nova Indicação	Data de aprovação	Abordagem de reposicionamento utilizada
Zidovudina (AZT)	Câncer	HIV/AIDS	1987	Triagem <i>in vitro</i> de bibliotecas de compostos
Minoxidil	Hipertensão	Perda de cabelo	1988	Análise clínica retrospectiva (identificação de crescimento do cabelo como um efeito adverso)
Sildenafil	Angina	Disfunção erétil	1998	Análise clínica retrospectiva
Celecoxibe	Dor e inflamação	Polipose adenomatosa familiar (neoplasia)	2000	Análise farmacológica
Atomoxetina	Doença de Parkinson	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade	2002	Análise farmacológica
Duloxetina	Depressão	Incontinência urinária	2004	Análise farmacológica
Rituximabe	Neoplasias	Artrite reumatoide	2006	Análise clínica retrospectiva (remissão de artrite reumatoide coexistente em pacientes com linfoma não-Hodgkin tratado com rituximab)
Raloxifeno	Osteoporose	Câncer de mama	2007	Análise clínica retrospectiva
Fingolimod	Rejeição de transplantes (imunossupressor)	Esclerose múltipla	2010	Análise Farmacológica e estrutural

Dapoxetina	Analgesia e depressão	Ejaculação precoce	2012	Análise farmacológica
Topiramato	Epilepsia	Obesidade	2012	Análise farmacológica
Cetoconazol	Infeções fúngicas	Síndrome de Cushing	2014	Análise farmacológica
Ácido acetil salicílico	Analgesia	Câncer colorretal	2015	Análise clínica retrospectiva clínica e farmacológica

Essas abordagens sistemáticas podem ser divididas em abordagens experimentais e abordagens computacionais (Pushpakom *et al.*, 2018). As abordagens experimentais incluem ensaios de screening fenotípico, com experimentos *in vitro* e *in vivo* e, de maneira mais específica, ensaios de interação molécula-alvo, para identificação de novos alvos, ferramentas tradicionais da área da farmacologia que vêm norteando há anos as pesquisas por novos compostos com ação farmacológica satisfatória.

Com os avanços das pesquisas e conhecimento de bioinformática e o aumento da criação de bancos de dados públicos com depósitos de informações biológicas relevantes, essas análises experimentais começaram a ser complementadas por análises de abordagens *in silico*, com o intuito de descobrir e otimizar moléculas e identificar novas indicações de uso para fármacos já disponíveis (Ekins *et al.*, 2007). Sendo assim, as abordagens computacionais, também denominadas análises *in silico*, são orientadas basicamente por dados disponíveis publicamente, como dados de estrutura química de compostos, estruturas de proteínas, informações de vias metabólicas, alvos ou informação fenotípica, tais como perfis de efeitos colaterais, biodisponibilidade, perfil de metabolização e excreção ou até mesmo dados de notificações eletrônicas de saúde pública, qualquer informação que possa levar à formulação de novas hipóteses de reposicionamento. As abordagens computacionais podem ser usadas individualmente ou em combinação para analisar sistematicamente diferentes tipos de dados a fim de obter interpretações para as hipóteses de reposicionamento. A Figura 1.9 ilustra as abordagens sistemáticas para o reposicionamento e suas estratégias operacionais.

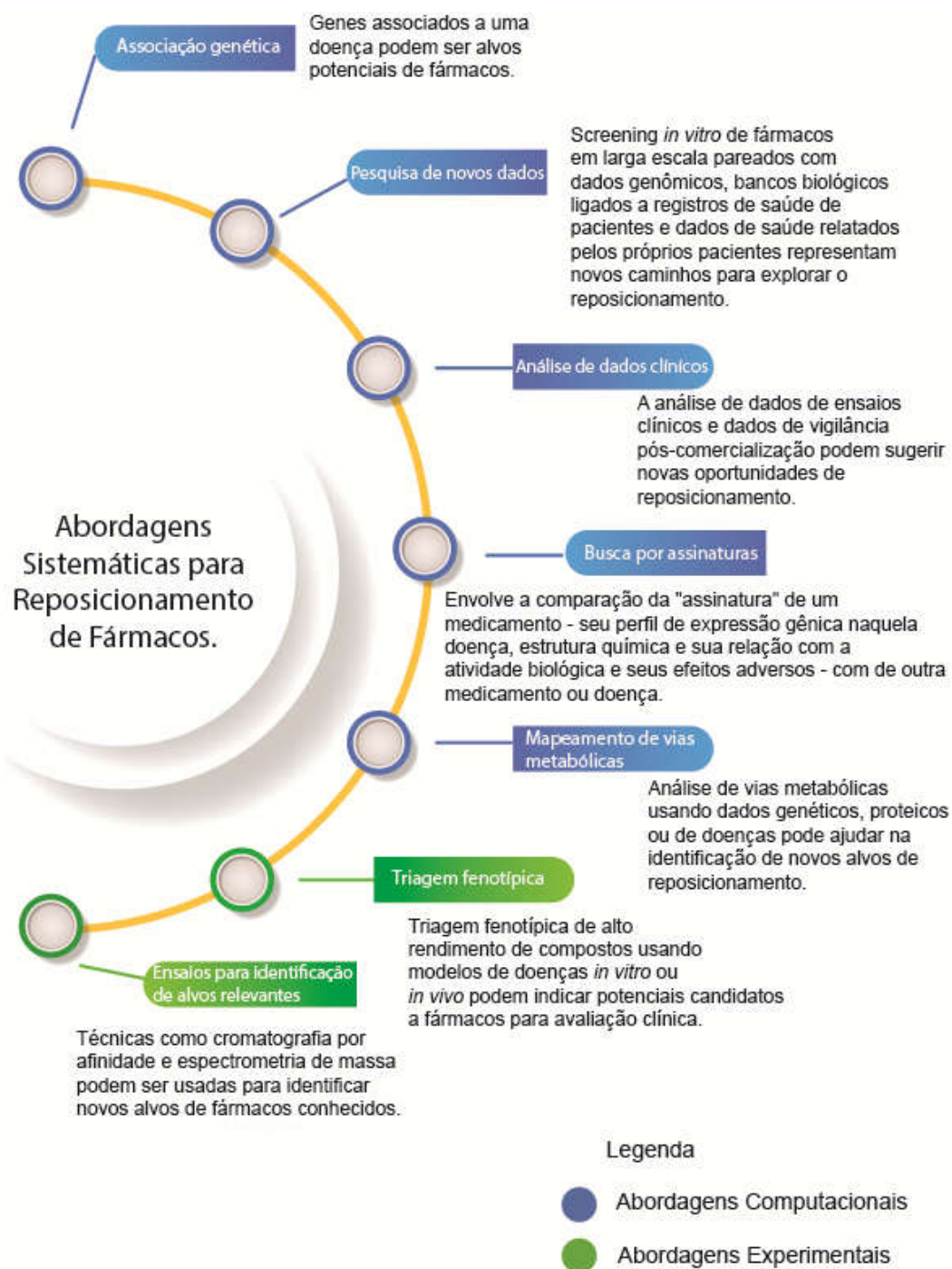


Figura 1.9. Abordagens sistemáticas utilizadas no processo de reposicionamento de fármacos. Adaptado de Pushpakom *et al*, 2018.

1.9. Reposicionamento direcionado

A grande velocidade com a qual novas substâncias são sintetizadas atualmente através de química combinatória e até mesmo o extenso número de bibliotecas virtuais com um grande número de compostos químicos – bibliotecas de compostos licenciados e com grande potencial para serem reposicionados, mobilizou a indústria farmacêutica a desenvolver técnicas robotizadas para assegurar um screening suficientemente rápido (do inglês High Throughput Screening – HTS), feitos de forma aleatória, ou seja, realizados de maneira a detectar apenas se o composto possui atividade biológica satisfatória ou não. Porém, além de excessivamente caros, essa estratégia apresenta grandes chances de falhas potenciais, principalmente no surgimento de falsos negativos, onde compostos ativos podem passar despercebidos pela triagem realizada dessa maneira (Noël *et al.*, 2001).

Finalmente, todo fármaco tem um perfil de efeito adverso relativamente único, caracterizado como uma de suas assinaturas. A combinação de efeitos adversos de dois fármacos levanta a hipótese de que esses dois fármacos que levam a mesmos efeitos adversos podem estar agindo em um alvo compartilhado ou proteína ou na mesma via metabólica (Pushpakom *et al.*, 2018). Um dos efeitos adversos mais comuns provocados por fármacos é a inibição de enzimas do complexo citocromo P450 em humanos, que pode ser considerado uma propriedade farmacocinética indesejável.

1.10. Reposicionamento de fármacos – estado da arte

Muitas classes de fármacos vêm sendo pesquisadas a fim de serem reposicionadas para tratar doenças para as quais não foram desenvolvidos. Um dos maiores campos atualmente para o reposicionamento de fármacos é o de pesquisas para desenvolvimento de novas terapias oncológicas (Pantziarka *et al.*, 2015). Sleire *et al.* (2017) publicou uma extensa revisão com diversas classes de fármacos com potencial para serem reposicionados para a terapia de câncer, destacando alguns dados sobre vias de sinalização e mecanismos celulares envolvidos. Algumas dessas classes são de fármacos direcionados ao tratamento de doenças

cardiovasculares, antipsicóticos e antidepressivos, antimicrobianos, antivirais, anti-inflamatórios não-esteroidais e fármacos imunomoduladores. O trabalho cita inclusive fármacos que poderiam atuar na prevenção do câncer como o anti-inflamatório não esteroidal aspirina, as estatinas, medicamentos que interferem no metabolismo de esteróis, a metformina, principal fármaco hoje utilizado no tratamento de diabetes tipo 2 e fármacos moduladores seletivos do receptor de estrogênio como tamoxifeno e raloxifeno. Pesquisas publicadas em 2019 vem sendo desenvolvidas com fármacos anti-helmínticos (Laudisi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2019), hipoglicemiantes (Thakur *et al.*, 2019), antibacterianos (Bailly 2019) buscando novas alternativas no combate de diversos tipos de neoplasias.

Doenças degenerativas também tem sido alvo de estudos de novos tratamentos através do reposicionamento de fármacos como doença de Alzheimer (Walker *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2017) e doença de Parkinson (Bortolanza *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018).

As doenças infecciosas podem ser categorizadas em quatro classes principais, dependendo do agente etiológico causador da infecção: bactérias, fungos, vírus ou protozoários (Serafin & Hörner, 2018). Estudos recentes têm sido publicados sobre reposicionamento de fármacos para doenças virais (Agarwal *et al.*, 2019; Lane *et al.*, 2019; García-Serradilla *et al.*, 2019; Savarino & Shytaj, 2015), doenças fúngicas (Yousfi *et al.*, 2019; Rana *et al.*, 2019), bacterianas (Thakare *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2018) e protozoárias (Reigada *et al.*, 2019; Bezerra-Souza *et al.*, 2019). Serafin & Hörner (2018) compilaram uma série de classes de fármacos não antibióticos que estão sendo estudados contra diversas espécies de bactérias quanto ao seu efeito antibacteriano. Em 2015, Kaiser *et al* realizaram ensaios de atividade biológica de 100 compostos com potencial reposicionamento para doenças negligenciadas, e analisaram parâmetros como biodisponibilidade favorável, custo moderado e bom perfil de segurança. Também selecionaram fármacos que demonstraram atividade antiprotozoária na literatura. O grupo realizou experimentos contra 4 espécies de protozoários: ensaios *in vitro* com as espécies *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*, ensaios de citotoxicidade

em macrófagos murinos e ensaio *in vivo* de infecção por *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Recentemente, duas revisões foram publicadas com relação ao estado da arte do reposicionamento de fármacos para o tratamento das leishmanioses (Charlton *et al.*, 2018; Andrade-Neto *et al.*, 2018). Nelas, foram citadas diversas classes de fármacos como antifúngicos, antiparasitários, antineoplásicos, antidepressivos e fármacos com atividade no sistema nervoso central, anti-hipertensivos, antibióticos, anti-histamínicos, e outros fármacos como dissulfiran, usado para auxiliar no tratamento de alcoolismo crônico, ciclosporina, um agente imunossupressor e a ezetimiba, um agente antihipercolesterolêmico, todos demonstrando atividade leishmanicida bastante promissores.

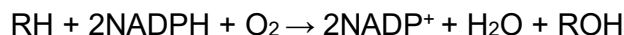
Alguns fármacos já estão em fase de ensaios clínicos, tanto em cães infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, como alopurinol (inibidor da biossíntese de ácido úrico) e domperidona (utilizado para o tratamento de situações de vômitos e náuseas), quanto em humanos, onde vários fármacos estão sendo testados. Por exemplo, Rifampicina (antibiótico) e omeprazol (inibidor da bomba H⁺/K⁺/ATPase) estão em estudo clínico para o tratamento de pacientes de leishmaniose cutânea causada pela espécie *L. tropica*. A azitromicina está sendo utilizada para o tratamento de pacientes de duas regiões do Brasil (Minas Gerais e Manaus) com leishmaniose cutânea mucosa. Fármacos inibidores da biossíntese do ergosterol, como itraconazol, cetoconazol, fluconazol e terbinafina estão sendo testados em pacientes infectados com diversas espécies de *Leishmania*, inclusive em regime de combinação com fármacos utilizados no tratamento atual das leishmanioses. Por fim, o fexinidazol é um fármaco que já demonstra atividade *in vitro* e *in vivo* contra os agentes etiológicos da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, e da tripanossomíase humana africana, *Trypanosoma brucei*, e está em desenvolvimento clínico para o tratamento da doença do sono humana, com a fase I completa. Quanto a *Leishmania*, este fármaco foi incluído em um ensaio clínico como um fármaco de administração oral para o tratamento da leishmaniose visceral no Sudão. Porém, seus resultados ainda não foram publicados (Andrade-Neto *et al.*, 2018).

1.11. Superfamília Citocromo P450

As enzimas da superfamília citocromo P450, ou simplesmente enzimas P450, compõem uma superfamília de proteínas encontradas em quase todos os seres vivos, conhecidas como os mais versáteis catalizadores biológicos da natureza, devido à diversidade de reações que podem mediar (Coon, 2005). A maioria das reações mediadas pelas enzimas P450 são processos de oxidação-redução, com papel importante na biotransformação e bioativação de fármacos. As enzimas P450 estão envolvidas na maior parte do metabolismo de fase I, realizando hidroxilações, epoxidações, desalquilações, oxidações e desalogenações (Isin & Guengerich, 2007). Outras principais funções biológicas dessas enzimas são a participação no metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados, no metabolismo do ácido araquidônico, no metabolismo de esteróis (El-Sherbeni & El-Kadi, 2017) e na síntese de metabólitos secundários de plantas e insetos (Bathe & Tissier, 2019). A conservação evolutiva e abundância de enzimas P450 na natureza e as individualidades de natureza química entre e dentro das espécies (variações mutacionais e polimorfismos) destacam a importância das funções biológicas mediadas por essas enzimas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Nelson, 1999).

As enzimas P450 foram descobertas na década de 1950. O pesquisador Bernard B. Brodie e seu grupo em 1958 foram os primeiros a mostrar que um sistema enzimático dependente de NADPH, associado à fração microsomal de fígado, mediava a oxidação de muitos medicamentos. Mais tarde, descobriram que essa enzima possuía um pigmento de ligação com função de heme proteína que, complexado com o monóxido de carbono, apresentava um pico máximo de absorção de comprimento de ondas de 450nm, atribuindo pela primeira vez o termo “citocromo P450” para a forma ativa da heme proteína (El-Sherbeni & El-Kadi, 2017).

A reação global de oxidação-redução é representada pelo esquema a seguir:



onde RH representa um fármaco ou algum outro substrato típico e ROH é o produto. Essa reação utiliza o NADPH em sua forma reduzida como cofator, onde seus elétrons são transferidos através do ciclo de redutase das enzimas P450 e um

átomo de oxigênio molecular é inserido no substrato e o outro reduzido a água, levando à formação do NADP⁺ oxidado (Coon, 2005).

Estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático, onde funcionam como complexos catalíticos que metabolizam xenobióticos e alguns substratos endógenos. No entanto, em humanos, também foram encontrados em outras organelas como lisossomos, peroxissomos, complexo de Golgi e na membrana plasmática, compondo sistemas microsossomais (Neve & Ingelman-Sundberg, 2008). As enzimas P450 também podem ser encontradas nas mitocôndrias, compondo sistemas que diferem das enzimas microsossomais por utilizarem duas flavoproteínas (adrenodoxina redutase e adrenodoxina mitocondrial) como intermediárias na transferência de elétrons a partir do NADPH. Sua participação biológica é predominantemente no metabolismo de substâncias endógenas, como na síntese de ácidos biliares a partir do colesterol, ativação da vitamina D3 no fígado e rim, sendo a sua participação no metabolismo de xenobióticos muito controverso. Porém os sistemas mitocondriais foram encontrados apenas em animais, sendo ausentes até agora em plantas e fungos (Omura & Gotoh, 2017; Omura 2006).

Essas enzimas estão ancoradas na membrana dessas organelas por uma α -hélice presente na porção terminal NH₂ da proteína, formada por aminoácidos hidrofóbicos, o que permite a maior exposição da proteína, incluindo o sítio catalítico, exposto ao citoplasma, embora algumas enzimas ancoradas na superfície celular tenham a maior parte da sua estrutura expostas para o espaço extracelular.

A nomenclatura dessa classe de enzimas foi proposta inicialmente por Nebert *et al* em 1987, e era baseada na recomendação das famílias de genes sendo designadas por números romanos, subfamílias por letras maiúsculas e genes individuais por números arábicos (como por exemplo IA2), e as enzimas eram classificadas por semelhança entre as sequências de proteínas a fim de serem classificadas em famílias e subfamílias. Posteriormente, outra nomenclatura foi proposta por Nelson (2004), dependente das relações evolutivas baseadas em árvores filogenéticas e baseada na similaridade de sequências de aminoácidos: membros de uma família compartilham 40% de similaridade de sequência de aminoácidos e membros da mesma subfamília compartilham 55% de similaridade de sequência. O sistema de nomenclatura original foi baseado em menos de 100

famílias de enzimas P450 de eucariotos e um número aberto em bactérias. Assim, as primeiras 100 famílias foram divididas da seguinte maneira: animais (CYP1–49), eucariotos inferiores (CYP51–69) e plantas (CYP71–99). Bactérias começavam com CYP101 e poderiam seguir daí em diante. Apesar dessa classificação numérica separar as enzimas dentro dos grupos de seres vivos, há uma particularidade quanto à família CYP51: esta é a única encontrada em todos os reinos biológicos, presentes em mais de 80 organismos entre bactérias, eucariotos inferiores, plantas, fungos e mamíferos. A enzima CYP51A1 é classificada como única entre os reinos devido à manutenção de sua função, que envolve a reação específica de remoção da metila do carbono na posição 14 dos precursores 14 α -metil-esteroidais. A família CYP51 possui cerca de 30% de similaridade de sequência de aminoácidos, variando de 23% a 34% entre os reinos, conforme a proximidade evolutiva entre as espécies (Lepesheva & Waterman, 2013).

Com o descobrimento de novas enzimas de novos organismos e, conseqüentemente, novas famílias, a solução foi adotar um sistema de nomenclatura de 3 dígitos. Logo, seguiu-se o seguinte esquema: as bactérias mantiveram o intervalo de CYP101-299, animais no intervalo de CYP301-499, eucariotos inferiores com o intervalo de CYP501-699 e plantas, CYP701-999. Bactérias, animais e plantas ainda se encaixam nesses limites impostos. Porém, eucariotos inferiores já ultrapassaram o limite de CYP699. Um sistema de 4 dígitos foi implementado desde então, com a configuração semelhante à anterior em termos de intervalos. A nomeação de novos genes de que codificam enzimas P450 devem ser submetidos a um Comitê de Nomenclatura Padronizada do Citocromo P450, a fim de evitar nomes imprecisos e/ou duplicados (Nelson, 2004). A semelhança de identidade entre as proteínas de diferentes famílias é extremamente baixa. Estudos mostram que pode ser inferior à 20% (Graham & Peterson, 1999). Apesar dessa baixa porcentagem de similaridade entre os membros das famílias P450, essas enzimas são constituídas de regiões estruturais conservadas, que são essenciais para estrutura e função, e de regiões variáveis, que medeiam as propriedades bioquímicas individuais. Syed & Mashele (2014) demonstraram pela primeira vez a identificação de padrões de aminoácidos baseados em dois motivos principais: EXXR e FXXGXRXCXG, representando os principais motivos que caracterizam a

superfamília P450, embora em fungos o motivo EXXR mostrou-se mais variável dentro do grupo.

Somente 3 aminoácidos são totalmente conservados em toda a superfamília, e estão presentes dentro do motivo EXXR, localizado na hélice k da proteína e próximo a um núcleo de ligação ao heme, sendo responsável pela sua estabilização. Os aminoácidos são o ácido glutâmico, representado pela letra E, a arginina, representada pela letra R e a cisteína, que é o quinto ligante próximo ao motivo heme e razão da característica absorvância de 450nm das proteínas quando complexadas ao monóxido de carbono. O núcleo estrutural conservado entre todas a superfamília é composto por um conjunto de 4 hélices denominadas D, E, I e L e as hélices J, além da hélice K. Dentro do primeiro conjunto de hélices, duas se destacam com funções importantes: a hélice I possui o resíduo treonina, altamente conservado, com um resíduo ácido apenas na porção N-terminal, posicionado sobre o anel pirrol B no sítio ativo; e a hélice L faz parte da região de ligação ao heme, e é composta por dois conjuntos de folhas- β estruturalmente conservadas: folhas- β 1, contendo 5 folhas; e folhas- β 2, compostas por 2 folhas. Este conjunto de folhas auxilia na formação do canal hidrofóbico de acesso ao substrato (Hasemann *et al.*, 1995; Graham & Peterson, 1999).

A superfamília P450 em humanos é composto por 57 genes e mais de 59 pseudogenes, divididos em 18 famílias e 43 subfamílias (Tabela 1.2) (Nelson, 2013). As famílias CYP1 à CYP4 abrigam a maioria das subfamílias. As famílias CYP1, CYP2 e CYP3 estão associadas primariamente à fase I do metabolismo de xenobióticos, enquanto as outras famílias exibem papéis de metabolismo de substratos endógenos. Com relação ao metabolismo de fármacos, a subfamília 3A4 é responsável pela biotransformação da maioria dos fármacos atualmente, apesar das enzimas da subfamília CYP2C serem também importantes a desempenharem esse papel, além da subfamília CYP2D6 (Lewis, 2004).

Tabela 1.2. Enzimas da superfamília P450 no genoma humano e suas principais funções metabólicas. Adaptado de Nelson, D. (2013).

Família	Função	Membros	Genes
CYP1	Metabolismo de fármacos e esteroides (especialmente estrogênio)	3 subfamílias, 3 genes, 1 pseudogene	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	Metabolismo de fármacos e esteroides	13 subfamílias, 16 genes, 16 pseudogenes	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1
CYP3	Metabolismo de fármacos e esteroides (incluindo testosterona)	1 subfamília, 4 genes, 2 pseudogenes	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP4	Metabolismo de ácidos graxos e ácido araquidônico	6 subfamílias, 12 genes, 10 pseudogenes	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP5	Tromboxano A ₂ sintase	1 subfamília, 1 gene	CYP5A1
CYP7	Biossíntese de ácidos biliares	2 subfamílias, 2 genes	CYP7A1, CYP7B1
CYP8	Funções variadas	2 subfamílias, 2 genes	CYP8A1 (Prostaciclina sintase), CYP8B1 (Biossíntese de ácidos biliares)
CYP11	Biossíntese de esteroides	2 subfamílias, 3 genes	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP17	Biossíntese de esteróides – 17-alfa-hidroxilase	1 subfamília, 1 gene	CYP17A1
CYP19	Biossíntese de esteróides (principalmente estrogênio) - Aromatase	1 subfamília, 1 gene	CYP19A1
CYP20	Função desconhecida	1 subfamília, 1 gene	CYP20A1
CYP21	Biossíntese de esteróides	2 subfamílias, 1 gene, 1 pseudogene	CYP21A2
CYP24	Degradação da vitamina D – Vitamina D ₃ 24 - hidroxilase	1 subfamília, 1 gene	CYP24A1
CYP26	Hidroxilase do ácido retinóico	3 subfamílias, 3 genes	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1
CYP27	Funções Variadas	3 subfamílias, 3 genes	CYP27A1 (biossíntese de ácidos biliares), CYP27B1 (vitamina D ₃ 1-alfa hidroxilase, ativa a vitamina D ₃), CYP27C1 (função desconhecida)

CYP39	Hidroxilação 7-alfa do 24-hidroxicolesterol	1 subfamília, 1 gene	CYP39A1
CYP46	Colesterol 24-hidroxilase	1 subfamília, 1 gene	CYP46A1
CYP51	Biossíntese de colesterol	1 subfamília, 1 gene, 3 pseudogenes	CYP51A1 (Lanosterol 14-alfa desmetilase)

1.12. A escolha das enzimas P450 como alvo farmacológico

A escolha da família P450 como potenciais alvos moleculares para o reposicionamento de fármacos para as leishmanioses baseou-se na existência de vários fármacos em uso clínico que possuem atividade inibitória específica ou promíscua sobre enzimas P450, independente da sua atividade terapêutica, além de suas atividades biológicas já conhecidas e seu perfil farmacológico determinado.

Essas enzimas já foram descritas em uma grande diversidade de organismos, como em insetos (Chan *et al.*, 2014), plantas (Zin *et al.*, 2019), fungos (Ohk *et al.*, 2015) e bactérias (Maroutsos *et al.*, 2019). Agosin *et al.*, em 1976, descreveu pela primeira vez essa superfamília de enzimas em tripanossomatídeos, onde demonstrou a capacidade de uma fração semipurificada de *T. cruzi* metabolizar substratos típicos de enzimas P450, e trabalhos posteriores confirmaram bioquimicamente a presença dessas enzimas em outros tripanossomatídeos, inclusive *Leishmania* (Berger & Fairlamb, 1993).

Por outro lado, trabalhos têm sugerido a inibição de enzimas do complexo P450 como alvos terapêuticos para um quadro diverso de patologias, como enfermidades dermatológicas (Ahmad & Mukhtar, 2004), câncer (Bruno & Njar, 2007), doenças infecciosas como tuberculose (Ortiz de Montellano, 2018), doenças neurodegenerativas (Navarro-Mabarak *et al.*, 2018). Em tripanossomatídeos apenas a CYP51 tem sido estudada mais profundamente, principalmente pelo seu papel chave na biossíntese do ergosterol e sua reconhecida validação como alvo terapêutico (Lepesheva *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2011). Além disso, outros trabalhos vêm discutindo as perspectivas das enzimas do Complexo P450 como possíveis e viáveis alvos farmacológicos para o reposicionamento de fármacos (El-Sherbeni & El-Kadi, 2017; Behrendorff & Gillam, 2017).

Diversos fármacos com atividade inibitória dessas enzimas vêm sendo estudados quanto à sua atividade leishmanicida. Os fármacos antifúngicos são os mais estudados atualmente em ensaios biológicos de espécies de *Leishmania*, devido à sua reconhecida ação inibitória da CYP51 do parasito e conseqüentemente inibição da via de biossíntese do ergosterol, levando à morte do parasito (Emani *et al.*, 2017). Por exemplo, já foi demonstrado que o cetoconazol exerce atividade em *L. amazonensis* através desse mecanismo de ação. (Andrade-Neto *et al.*, 2012). Itraconazol e posaconazol, outros fármacos antifúngicos, também já demonstraram atividade contra *L. amazonensis*, provocando desregulação do potencial de membrana mitocondrial e alterações morfológicas na mitocôndria e no cinetoplasto (de Macedo-Silva *et al.*, 2013).

Outra classe de fármacos, os inibidores de enzimas aspártico protease do HIV, como o ritonavir e lopinavir, também são inibidores de enzimas P450 humanas e já foram descritos com atividade leishmanicida (Alves *et al.*, 2015). Lopinavir demonstrou alterações no metabolismo de lipídeos em promastigotas de *L. amazonensis* e também apresentou eficácia terapêutica em combinação com a miltefosina em ensaios *in vitro* e *in vivo* contra *L. infantum* (Rebello *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2019). Estudos com nelfinavir, outro inibidor de proteases de HIV, demonstrou atividade contra *L. amazonensis* através da indução de estresse oxidativo e apoptose. Quando em combinação com miltefosina e anfotericina B no tratamento *in vitro* e *in vivo* de *L. infantum*, também demonstrou potente atividade leishmanicida, com diminuição da carga parasitária de fígado e baço no tratamento de modelo murino de leishmaniose visceral (Kumar *et al.*, 2010; Valdivieso *et al.*, 2018).

2. Justificativa e Hipótese

Devido aos aspectos listados, a busca por novas substâncias que possam ser usadas no tratamento das leishmanioses é de grande importância para a saúde pública, assim como uma nova abordagem no processo de pesquisa e desenvolvimento, lançando mão, por exemplo, de inovação farmacêutica incremental como o reposicionamento de fármacos,

Sendo assim, a hipótese do presente trabalho defende que fármacos inibidores de enzimas P450 humanas possuem atividade leishmanicida atuando na inibição de enzimas P450 de *Leishmania infantum* conhecidas ou ainda não descritas. Assim, fármacos já disponíveis comercialmente e seguramente utilizados em humanos poderiam ser reposicionados para o tratamento das leishmanioses, utilizando o complexo enzimático P450 como alvo farmacológico.

Nossa hipótese baseia-se no conceito de ortologia, que mostra a relação entre genes homólogos, ou seja, presentes em um ancestral comum, que são compartilhados em duas espécies resultante de um processo de especiação. Sendo assim, nós iremos buscar por novos genes P450 em *L. infantum* que sejam homólogos a genes P450 de humanos.

3. Objetivo Geral

Avaliar a potencialidade da estratégia de reposicionamento de fármacos inibidores de enzimas da superfamília P450 para o tratamento da leishmaniose.

3.1. Objetivos específicos

- Pesquisar proteínas homólogas às enzimas P450 humanas no conjunto de proteínas preditas de *L. infantum*;
- Caracterizar as sequências P450 potencialmente homólogas de *L. infantum in silico*, baseando-se na predição funcional, identificação dos motivos característicos da superfamília, predição de estrutura secundária e expressão gênica;
- Analisar a transcrição *in vitro* dos genes das sequências selecionadas pelas análises *in silico*;

4. Metodologia

4.1. Predição *in silico* de novas proteínas do complexo enzimático do citocromo P450 (P450) em *L. infantum*.

Foi realizada no conjunto de proteínas preditas de *L. infantum* uma busca *in silico* de novas proteínas do complexo enzimático citocromo P450 (P450) que fossem homólogas às enzimas P450 humanas.

Para tal, o conjunto de proteínas preditas codificadas no genoma de *L. infantum* (cepa JPCM5) obtido do banco de dados TritypDB versão 38 (total de 8378 proteínas) foi comparado ao conjunto de enzimas P450 humanas depositadas no banco de dados CYPED.V6 (total de 449 enzimas), que integra informações sobre sequências, estrutura e funções de enzimas P450 de diversos seres vivos. A comparação foi realizada utilizando a ferramenta blastp, utilizando cada uma das sequências humanas do CYPED.V6 como entrada. Os parâmetros utilizados no blastp foram: wordsize: 3; penalidade por abertura e extensão de espaços nas sequências alinhadas: -11 e -1, respectivamente; matriz de substituição: BLOSUM 62.

Foram consideradas sequências potencialmente homólogas às enzimas P450 humanas as sequências de *L. infantum* apresentando as seguintes características: porcentagem de identidade entre as sequências de *L. infantum* e a sequência humana do CYPED acima de 20%; um valor *E-value* (é um valor estatístico que indica se o alinhamento é real ou foi obtido meramente pelo acaso. É o número esperado de falsos positivos, logo, quanto menor o *E-value*, menores as chances do resultado ser consequência do acaso) inferior a 10^{-3} , uma porcentagem de área de cobertura de similaridade de sequência no par alinhado de pelo menos 70%. O resultado do blastp também foi analisado quanto ao seu número de score, cujo valor é positivamente correlacionado com a qualidade do alinhamento, ou seja, quanto maior o valor total de score melhor o alinhamento. Assim, houve a seleção de 4 sequências em *L. infantum* potencialmente homólogas a algumas famílias humanas do banco de dados CYPED.

Foi realizada nessas 4 sequências selecionadas a busca por uma assinatura característica presente em todas as famílias P450: EXXR, um domínio presente na

porção C-terminal da hélice K da proteína. A presença desse motivo foi confirmada usando a linguagem PERL e busca por expressões regulares (figura 4.1).

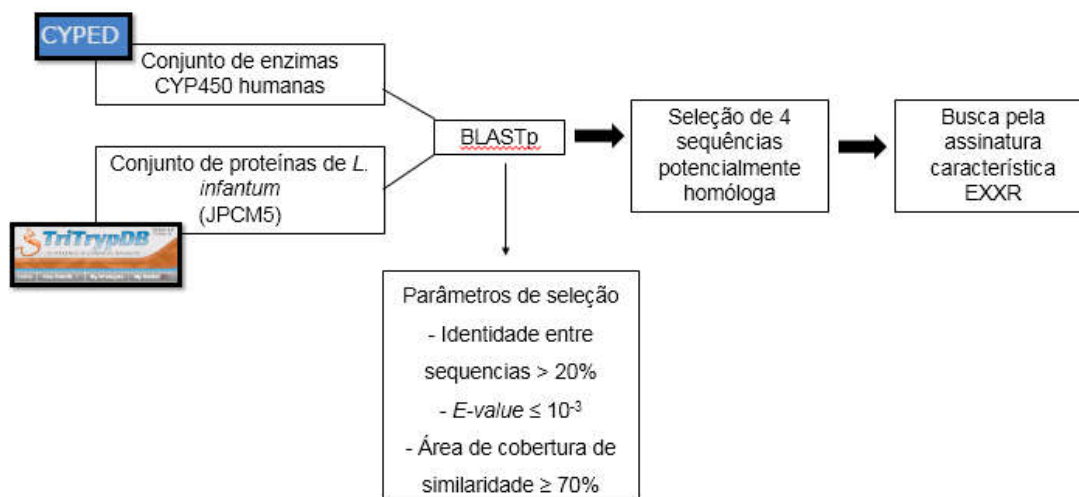


Figura 4.1. Figura esquemática demonstrando as etapas de seleção de sequências potencialmente homólogas de *L. infantum* às sequências P450 humanas.

4.2. Mapeamento das sequências humanas identificadas no CYPED como potencialmente homólogas às sequências de *L. infantum* no Consórcio Uniprot Knowledgebase

Foi realizado, a fim de correspondência, um mapeamento no Consórcio Uniprot Knowledgebase de cada uma das enzimas humanas identificadas no banco de dados CYPED mais similares às sequências de *L. infantum*. O Uniprot Knowledgebase é um banco de dados de livre acesso de sequências de proteínas e suas informações funcionais. Além da inserção de dados obrigatórios principais como a sequência de aminoácidos, nome ou descrição da proteína, dados taxonômicos e informações de citações, são adicionadas também informações de possíveis anotações. O Uniprot consiste em duas seções: o SwissProt, onde os registros são manualmente anotados e provem de informações extraídas da literatura e análises computacionais avaliadas por um curador; e o TrEMBL, cujos registros são analisados computacionalmente e aguardam uma anotação manual completa.

Esse mapeamento foi realizado através do número identificador do NCBI (do português Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia) que cada uma das sequências humanas do CYPED possuem. O NCBI reúne uma série de bancos de dados relevantes para a biotecnologia e a biomedicina e é um recurso importante para ferramentas e serviços de bioinformática. Os principais bancos de dados incluem o GenBank e o RefSeq para sequências de DNA e RNA e o PubMed, um banco de dados bibliográfico para a literatura biomédica.

4.3. Predição funcional *in silico* das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

As sequências P450 putativas de *L. infantum* selecionadas foram analisadas *in silico* quanto a predição funcional utilizando a ferramenta InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>), que fornece uma análise funcional *in silico* de sequências de proteínas, classificando-as em famílias pela presença de domínios e sítios característicos. A ferramenta usa modelos preditivos, conhecidos como assinaturas, fornecidos por vários bancos de dados diferentes que compõem o consórcio InterPro. O InterProScan é o *software* que permite que as sequências sejam verificadas em relação às assinaturas da InterPro. A ferramenta reúne vários bancos de dados, os quais cada um contribui com um nicho diferente:

- Superfamily: base de dados de anotação estrutural e funcional de proteínas. Classifica a sequência de aminoácidos em domínios estruturais conhecidos. Esses domínios são classificados em superfamílias baseados em uma relação evolutiva de ancestralidade.
- Pfam: base de dados de famílias de proteínas que incluem anotações, alinhamentos múltiplos de sequências, domínios de proteínas e famílias.
- Prints: Conjunto de impressões digitais, que proporciona uma anotação detalhada para famílias de proteínas. Uma impressão digital é um grupo de motivos conservados tomados a partir de um alinhamento múltiplo de sequências que, em conjunto, formam uma assinatura característica para uma família de proteínas alinhadas.
- Prosite: banco de dados de domínios de proteínas para caracterização funcional e anotação. Descrevem as famílias de proteínas, domínios, sítios funcionais e

padrões e perfis de aminoácidos. Consiste em sítios biologicamente significativos, padrões e perfis que ajudam a identificar com segurança a que família de proteínas conhecida uma nova sequência pertence.

4.4. Predição funcional *in silico* das sequências P450 putativas de *L. infantum* baseada na ontologia gênica

As sequências identificadas como P450 putativas em *L. infantum* foram comparadas par a par com as proteínas depositadas no banco de dados Swiss-Prot, usando o programa BLAST e com as famílias de proteínas depositadas no banco de dados Pfam, com uso do programa HMMER (versão: 3.1b1). Os resultados obtidos nestas comparações foram utilizados como entrada para o programa Argot2.5 (versão: 2.5). Com base no sistema de classificação proposto pelo consórcio Gene Ontology (GO), nas anotações de termos GO atribuídas às proteínas depositadas no Swiss-Prot, no significado estatístico dos alinhamentos obtidos em ambas as comparações, respectivamente, e na similaridade semântica dos termos GO associados aos hits estatisticamente significativos, o programa Argot2.5 realizou a predição funcional *in silico* das sequências P450 putativas de *L. infantum*. Dessa forma, as sequências foram classificadas com base em um vocabulário controlado de ontologia gênica e de acordo com critérios de transferência funcional definidos pelo consórcio GO, distribuindo-se em três categorias fundamentais: processo biológico função molecular e componente celular.

4.5. Alinhamento de múltiplas sequências, predição de estruturas secundárias e identificação de motivos da superfamília P450.

Um alinhamento de múltiplas sequências baseado nas estruturas primárias das sequências CY450 putativas de *L. infantum* foi realizado com a ferramenta *online* MAFFT (versão 7). A predição das estruturas secundárias baseada no alinhamento das estruturas primárias foi realizada usando a ferramenta *online* Promals 3D, identificando estruturas de α -hélice e folha- β . Foi realizada então a busca por assinaturas características da família P450: AGXXT (domínio de ligação ao oxigênio na hélice I), EXXR (domínio C-terminal da hélice K), e DXXXF (na hélice K), FXXGXRXCXG (no domínio de ligação ao heme). A presença desses motivos foi

confirmada usando a linguagem PERL e busca por expressões regulares.

4.6. Estudo *in silico* da expressão de mRNA e da expressão proteica em dados proteômicos das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

A pesquisa de dados de transcriptoma foi realizada utilizando o conjunto de transcritos anotados da espécie *L. infantum* obtidos no banco de dados TriTrypDB. A busca por dados proteômicos foi realizada utilizando o banco de dados público PRIDE Archive, que pertence ao consórcio EMBL-EBI, sendo uma ferramenta on-line que contém dados centralizados e padronizados de dados proteômicos, incluindo identificação de proteínas e peptídeos, modificações pós-traducionais e suporte de evidências espectrais.

4.7. PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) no RNA total extraído de culturas de *L. infantum* em fase de crescimento logarítmico (3º dia de cultura). O RNA total foi extraído de 10⁸ promastigotas utilizando o Kit de Sistemas de Isolamento de RNA SV Total (Promega, Madison, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA de fita simples foi sintetizado pelo Kit de Transcriptase Reversa GoScript™ (Promega, Madison, EUA), utilizando 3,2µg de cada amostra de RNA, de acordo com o protocolo do fabricante. O PCR foi realizado em 25 µL de volume final de reação contendo SYBER™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA), 400 nM dos primers forward e reverse e 10 ng de cDNA. As reações foram realizadas utilizando o termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems™), onde houve incubação à 95°C por 10 minutos e então 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados obtidos são a média de três experimentos independentes realizados com três preparações biológicas de RNA. As sequências de primers de LinJ.11.1100 (CYP51) são forward 5'- GCT GAA GGC GAA GAA GAA GTA -3' e reverse 5'- ACT TGC TGT GCT GGT GAA -3'; para LinJ.27.0090 são forward 5'- CCG AGA TTG CCA ACG ATA CA -3' e reverse 5'- GGC CGT TGA TGA AGG GAA TA -3'; para LinJ.30.3610 são forward 5'- CAA CAA CAT TGC CTT CCA GAG -3' e reverse 5'- ATC GGC AGG TAC AAG GAA AG -3'; para LinJ.34.3110 são

forward 5'- GGA CTT GAT GCC CTC CAT TT -3' e reverse 5'- CAT CCG CAG AAC CTC CTT TAC -3', e foram desenhados utilizando o programa PrimerQuest® (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

4.8. Parasitos

A cepa MHOM/MA/67/ITMAP263 de *L. infantum* foi utilizada nos estudos *in vitro*. Os parasitos foram isolados de baço ou fígado de camundongos BALB/c infectados (Licença CEUA/IOC – L026/2015) e mantidos como promastigotas a 26°C em meio Schneider, acrescido de 10% de SFB, 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

Resultados

5.1. Identificação no conjunto de proteínas preditas de *L. infantum* de sequências P450 potencialmente homólogas às sequências humanas depositadas no CYPED

A identificação foi realizada através da comparação pela ferramenta blastp entre as proteínas preditas no genoma de *L. infantum* e as sequências humanas depositadas no banco de dados CYPED. Assim, foram identificadas 4 sequências proteicas de *L. infantum*: LinJ.11.1100, LinJ.27.0090, LinJ.30.3610 e LinJ.34.3110. A sequência LinJ.11.1100 é anotada no banco de dados TritypDB como CYP51A1 de *L. infantum*. As outras sequências possuem anotação como “cytochrome p450-like protein”.

Utilizando os critérios de seleção de sequências humanas estatisticamente significativas, cada uma das sequências de *L. infantum* obteve uma vasta lista de sequências potencialmente homólogas putativas humanas, que foram organizados em ordem de melhor significância estatística, ou seja, melhor *e-value* e detalhados a seguir.

Na Tabela 5.1, observamos as sequências potencialmente similares humanas do CYPED para a sequência LinJ.11.1100. A sequência humana CYPED que obteve melhor resultado estatisticamente significativo, ou seja, melhor *e-value*, pertence à família CYP51. Além dessa sequência, a pesquisa por hits humanos depositados no CYPED homólogos à LinJ.11.1100 resultou em mais 1 sequência pertencente à família CYP51 (agrupadas em verde claro na tabela), e outras 5 sequências pertencentes à família CYP39 (agrupadas em laranja na tabela), todas elas dentro dos parâmetros aplicados de significância estatística.

Na Tabela 5.2, observamos as sequências humanas potencialmente similares para a sequência LinJ.27.0090. Foram encontradas 20 sequências no banco de dados CYPED homólogas putativas à LinJ.27.0090. O melhor resultado de *e-value* foi uma sequência da família CYP4. Ainda dentro da família CYP4, foram encontradas outras 3 sequências homólogas putativas (agrupadas em azul claro na tabela). Além dessa família humana, também foram encontradas outras 3 famílias humanas potencialmente similares à LinJ.27.0090: CYP5, com 12 sequências

identificadas do CYPED (agrupadas em cinza na tabela); CYP46, com 3 sequências identificadas no CYPED (agrupadas em rosa na tabela escuro); e CYP2, com apenas 1 sequência identificada no CYPED (agrupada em marrom na tabela).

Na Tabela 5.3, foram identificadas as sequências humanas potencialmente similares do CYPED para a sequência LinJ.30.3610, que obteve a maior quantidade de sequências homólogas putativas humanas, totalizando 49 sequências. O melhor resultado estatisticamente significativo foi uma sequência pertencente à família CYP26, porém outras 10 sequências dessa mesma família também foram identificadas como potencialmente similares (agrupadas em lilás na tabela). A próxima família humana com representantes potencialmente similares para LinJ.30.3610 foi CYP3, a qual foram identificadas 25 sequências humanas potencialmente similares (agrupadas em amarelo na tabela). Outras duas famílias humanas também foram identificadas como potencialmente similares para essa sequência de *L. infantum*: CYP51 (agrupadas em azul claro na tabela) e CYP19 (agrupadas em verde escuro na tabela), com 6 sequências humanas identificadas do CYPED cada uma.

A última sequência de *L. infantum* identificada, LinJ.34.3110, obteve 13 sequências humanas potencialmente similares identificadas no CYPED (Tabela 5.4). A sequência com maior significância estatística pertence à família CYP4. Porém, outras 11 sequências dessa mesma família também foram identificadas como potencialmente similares (agrupadas em azul claro na tabela). As outras duas sequências potencialmente similares pertencem à família CYP46 (agrupadas em rosa na tabela).

Tabela 5.1. Sequências P450 putativas a LinJ.11.1100 e suas sequências potencialmente homólogas humanas e depositadas no banco de dados CYPED (verde – família CYP51; laranja – família CYP39).

Identificador TrityDB	Identificador CYPED	% identidade entre as sequências	Score	<i>E-value</i>	Área de cobertura na sequência CYPED	Área de cobertura na sequência TritypDB
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 35370 pid 25507 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	34,4	661	8,53E-82	0,975501114	0,914583333
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 35361 pid 25499 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	34,4	660	1,97E-81	0,95010846	0,914583333
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 11813 pid 8536 hfid 360 sfid 39 Homosapiens	23,8	298	1,36E-29	0,929637527	0,916666667
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 11812 pid 8536 hfid 360 sfid 39 gb Homosapiens	24,0	294	6,04E-29	0,929637527	0,916666667
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 11814 pid 8536 hfid 360 sfid 39 Homosapiens	24,0	293	7,75E-29	0,929637527	0,916666667
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 11757 pid 8495 hfid 360 sfid 39 Homosapiens	23,8	289	2,15E-28	0,926503341	0,916666667
LinJ.11.1100:mRNA-p1	sid 11756 pid 8495 hfid 360 sfid 39 gi Homosapiens	23,6	285	6,46E-28	0,926503341	0,916666667

Tabela 5.2. Sequências P450 putativas a LinJ.27.0090 e suas sequências potencialmente homólogas humanas depositadas no banco de dados CYPED (azul – família CYP4; cinza – família CYP5; rosa – família CYP46; marrom – família CYP2).

Identificador TritypDB	Identificador CYPED	% identidade entre as sequências	Score	E-value	Área de cobertura na sequência CYPED	Área de cobertura na sequência TritypDB
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 13296 pid 9674 hfid 162 sfid 4 Homosapiens	26,185	314	5,32E-31	0,769230769	0,70777027
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 13297 pid 9674 hfid 162 sfid 4 Homosapiens	25,959	301	2,25E-29	0,769230769	0,70777027
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 13957 pid 10216 hfid 154 sfid 4 Homosapiens	24,056	260	4,56E-24	0,834285714	0,797297297
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 13960 pid 10216 hfid 154 sfid 4 Homosapiens	24,056	259	5,76E-24	0,834285714	0,797297297
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56985 pid 40377 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,429	221	2,96E-19	0,793621013	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56928 pid 40330 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	20,296	213	3,05E-18	0,821011673	0,709459459
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56983 pid 40377 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,218	213	3,09E-18	0,793621013	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56897 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,218	211	4,75E-18	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56893 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,008	210	7,66E-18	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56889 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	20,842	208	1,14E-17	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56887 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,008	208	1,22E-17	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56888 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens	21,008	208	1,28E-17	0,792134831	0,711148649

LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56891 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,008	207	1,51E-17	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56892 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	21,008	204	3,52E-17	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56896 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	20,798	203	4,63E-17	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 56890 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	20,798	202	5,88E-17	0,792134831	0,711148649
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 12455 pid 9002 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	22,299	193	5,54E-16	0,850877193	0,717905405
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 12455 pid 9002 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	22,299	193	5,54E-16	0,850877193	0,717905405
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 12479 pid 9012 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	22,299	191	1,44E-15	0,776	0,717905405
LinJ.27.0090:mRNA-p1	sid 9632 pid 6756 hfid 18 sfid 2 Homosapiens	23,23	179	3,90E-14	0,753061224	0,738175676

Tabela 5.3. Sequências P450 putativas a LinJ.30.3610 e suas sequências potencialmente homólogas humanas depositadas no banco de dados CYPED (lilás – família CYP26; amarelo – família CYP3; verde claro - família CYP51; verde escuro – família CYP19).

Identificador TritypDB	Identificador CYPED	% identidade entre as sequências	Score	e-value	Área de cobertura na sequência CYPED	Área de cobertura na sequência TritypDB
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7704 pid 5312 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	24,837	296	5,24E-29	0,877263581	0,868110236
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7700 pid 5312 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	24,837	291	2,02E-28	0,877263581	0,868110236
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7742 pid 5343 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	25,515	286	5,08E-28	0,862149533	0,732283465
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 11921 pid 8606 hfid 65 sfid 3 Homosapiens syntheticconstruct	23,554	255	1,18E-23	0,906560636	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 11917 pid 8606 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	23,554	248	8,95E-23	0,908366534	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 11923 pid 8606 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	23,347	248	9,03E-23	0,908366534	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 11984 pid 8650 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	23,909	244	2,74E-22	0,908536585	0,887795276
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 11985 pid 8650 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	23,909	243	3,03E-22	0,908536585	0,887795276
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7819 pid 5395 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	23,877	240	8,50E-22	0,77734375	0,801181102
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7833 pid 5395 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	24,35	239	1,24E-21	0,77734375	0,801181102
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7901 pid 5427 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	24,093	233	2,19E-21	0,930769231	0,730314961

LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7900 pid 5427 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	24,292	236	2,27E-21	0,804040404	0,801181102
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12160 pid 8775 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,246	231	1,58E-20	0,854205607	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12158 pid 8775 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,246	229	2,08E-20	0,908548708	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12111 pid 8745 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	21,166	227	3,59E-20	0,888888889	0,874015748
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12159 pid 8775 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,034	223	1,21E-19	0,908548708	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12032 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,669	222	1,39E-19	0,908548708	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12034 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	21,992	222	1,56E-19	0,912524851	0,897637795
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12260 pid 8846 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,292	222	1,68E-19	0,908548708	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12031 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,669	221	2,04E-19	0,908548708	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12028 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,292	221	2,32E-19	0,908548708	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12112 pid 8745 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	21,166	220	3,09E-19	0,888667992	0,874015748
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12075 pid 8719 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	21,83	220	3,16E-19	0,908730159	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12075 pid 8719 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	21,83	220	3,16E-19	0,908730159	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12033 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	22,453	219	3,77E-19	0,908366534	0,893700787

LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12035 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	22,876	213	1,64E-18	0,911704312	0,868110236
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12238 pid 8832 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	21,868	213	2,00E-18	0,908366534	0,893700787
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 110300 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	23,094	212	2,44E-18	0,890495868	0,842519685
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12030 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	23,094	212	2,49E-18	0,886831276	0,842519685
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12029 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	23,094	212	2,68E-18	0,888659794	0,842519685
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12029 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	23,094	212	2,68E-18	0,888659794	0,842519685
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 8020 pid 5523 hfid 330 sfid 26 Homo sapiens	23,702	212	3,12E-18	0,798850575	0,803149606
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7756 pid 5352 hfid 330 sfid 26 Homo sapiens	23,656	210	3,57E-18	0,796338673	0,702755906
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 7755 pid 5352 hfid 330 sfid 26 Homo sapiens	24,194	208	5,03E-18	0,796338673	0,702755906
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 8018 pid 5523 hfid 330 sfid 26 Homo sapiens	23,476	207	1,09E-17	0,798850575	0,803149606
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 35284 pid 25457 hfid 375 sfid 51 synthetic construct	20,79	170	4,75E-13	0,878431373	0,887795276
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 12113 pid 8745 hfid 65 sfid 3 Homo sapiens	20,892	167	5,46E-13	0,978571429	0,801181102
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 35283 pid 25457 hfid 375 sfid 51 Homo sapiens	20,79	169	5,64E-13	0,880157171	0,887795276
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 35361 pid 25499 hfid 375 sfid 51 Homo sapiens	21,327	168	5,66E-13	0,845986985	0,793307087

LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 35370 pid 25507 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	21,327	167	6,69E-13	0,868596882	0,793307087
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 35291 pid 25457 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	20,954	167	9,01E-13	0,890656064	0,887795276
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 35290 pid 25457 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	20,79	167	1,08E-12	0,880157171	0,887795276
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 6091 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	21,9	129	4,20E-08	0,703777336	0,718503937
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 6104 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	21,636	125	1,16E-07	0,703777336	0,718503937
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 6098 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	21,636	124	1,49E-07	0,703777336	0,718503937
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 6095 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	21,636	123	2,42E-07	0,703777336	0,718503937
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 6093 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	21,636	122	2,53E-07	0,703777336	0,718503937
LinJ.30.3610:mRNA-p1	sid 6119 pid 4156 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	21,636	121	3,24E-07	0,748414376	0,718503937

Tabela 5.4. Sequências P450 putativas a LinJ.34.3110 e suas sequências potencialmente homólogas humanas depositadas no banco de dados CYPED (azul – família CYP4; rosa – família CYP46).

Identificador TritypDB	Identificador CYPED	% identidade entre as sequências	Score	E-value	Área de sobreposição na sequência CYPED	Área de sobreposição na sequência TritypDB
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 14108 pid 10336 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	26,437	242	5,41E-22	0,81980198	0,734432234
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12761 pid 9227 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	26,144	240	1,75E-21	0,732656514	0,783882784
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12623 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	25,917	238	1,90E-21	0,797687861	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12626 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	25,917	234	5,79E-21	0,797687861	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12625 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	25,688	231	1,65E-20	0,797687861	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12624 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	24,711	227	4,43E-20	0,788867562	0,734432234
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12455 pid 9002 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	24,356	219	3,10E-19	0,88377193	0,743589744
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12479 pid 9012 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	24,466	218	5,50E-19	0,798	0,732600733
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12995 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	24,153	211	4,40E-18	0,812133072	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12997 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	24,153	210	5,39E-18	0,812133072	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12998 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	24,153	210	5,84E-18	0,812133072	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12996 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	24,153	210	6,39E-18	0,812133072	0,741758242
LinJ.34.3110:mRNA-p1	sid 12993 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	23,874	207	1,17E-17	0,8125	0,741758242

5.2. Identificação das sequências humanas do CYPED no Consórcio Uniprot Knowledgebase

Quando realizamos o mapeamento das sequências humanas identificadas no CYPED a fim de encontrar sequências correspondentes no banco de dados Uniprot, ocorreu o esperado: em cada uma das sequências de *L. infantum*, pelo menos uma sequência humana obteve apenas uma sequência correspondente no banco de dados Uniprot. Porém, ocorreu outra situação: duas ou mais sequências humanas identificadas no CYPED obtiveram a mesma sequência correspondente no banco de dados Uniprot. Tomemos como exemplo a sequência LinJ.11.1100: a sequência **sid|35361|pid|25499|hfid|375|sfid|51|Homosapiens** (segunda sequência da segunda coluna da tabela 5.5) identificada no CYPED teve correspondência com o identificador Uniprot Q16850, depositada no banco de dados Swiss-Prot e anotada como *Lanosterol 14-alpha demethylase*, ou CYP51A1 de humanos. Isso também ocorreu com a sequência **sid|35370|pid|25507|hfid|375|sfid|51|Homosapiens**, (primeira sequência da segunda coluna da tabela 5.5) que obteve correspondência com o identificador B3KRC6 do banco de dados TrEMBL, que está anotada como um produto denominado *cDNA FLJ34004 fis, clone FCBBF1000232, highly similar to Cytochrome P450 51A1*. Ainda dentro das análises da sequência LinJ.11.1100, três sequências identificadas no CYPED obtiveram correspondência com a sequência do Uniprot Q9NYL5, anotada no banco de dados Swiss-Prot como a *24-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase*, ou CYP39A1 de humanos; e outras duas sequências do CYPED obtiveram correspondência com o identificador Uniprot B7Z786, anotada no banco de dados TrEMBL como *cDNA FLJ53106, highly similar to Cytochrome P450 39A1* (Tabela 5.5). Esse padrão de mapeamento ocorreu para todas as outras sequências de *L. infantum*: ora apenas uma sequência do CYPED obteve correspondência com apenas uma sequência do banco de dados Uniprot; ora duas ou mais sequências do CYPED obtiveram correspondência com a mesma sequência depositada no Uniprot (vide Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8)

Tabela 5.5. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.11.1100 identificadas e classificadas no consórcio *Uniprot Knowledgebase*. A sequência em negrito representa a sequência de melhor significado estatístico (potencialmente similares) dentre as sequências identificadas no CYPED.

Identificador TritryDB	Identificador CYPED	Identificador Uniprot	Nome de entrada	Base de Dados	Nome da Proteína	Tamanho
LinJ.11.1100: mRNA-p1	sid 35370 pid 25507 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	B3KRC6	B3KRC6_HUMAN	TrEMBL	cDNA FLJ34004 fis, clone FCBBF1000232, highly similar to Cytochrome P450 51A1	449
	sid 35361 pid 25499 hfid 375 sfid 51 Homosapiens	Q16850	CP51A_HUMAN	Swiss-Prot	Lanosterol 14-alpha demethylase (EC 1.14.14.154)	503
	sid 11813 pid 8536 hfid 360 sfid 39 Homosapiens	Q9NYL5	CP39A_HUMAN	Swiss-Prot	24-hydroxycholesterol 7- alpha-hydroxylase (EC 1.14.14.26)	469
	sid 11812 pid 8536 hfid 360 sfid 39 gb Homosapiens					
	sid 11814 pid 8536 hfid 360 sfid 39 Homosapiens					
	sid 11757 pid 8495 hfid 360 sfid 39 Homosapiens	B7Z786	B7Z786_HUMAN	TrEMBL	cDNA FLJ53106, highly similar to Cytochrome P450 39A1	449
	sid 11756 pid 8495 hfid 360 sfid 39 gi Homosapiens					

Tabela 5.6. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.27.0090 identificadas e classificadas no consórcio *Uniprot Knowledgebase*. A sequência em negrito representa a sequência de melhor significado estatístico (potencialmente similares) dentre as sequências identificadas no CYPED.

Identificador TrityDB	Identificador CYPED	Identificador Uniprot	Nome de entrada	Base de Dados	Nome da Proteína	Tamanho
LinJ.27.0090:m RNA-p1	sid 13296 pid 9674 hfid 162 sfid 4 Homosapiens	P98187	CP4F8_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 4F8 (EC 1.14.14.1) (CYP1VF8)	520
	sid 9632 pid 6756 hfi 18 sfid 2 Homosapiens	Q53EX9	Q53EX9_HUMAN	TrEMBL	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18 variant (Fragment)	490
	sid 56928 pid 40330 hfid 187 sfid 5 Homosapiens	B4DVP1	B4DVP1_HUMAN	TrEMBL	cDNA FLJ59444, highly similar to Thromboxane-A synthase	514
	sid 12455 pid 9002 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	Q16743	Q16743_HUMAN	TrEMBL	Cytochrome P-450 II C (Fragment)	356
	sid 13297 pid 9674 hfid 162 sfid 4 Homosapiens	B2RBJ0	B2RBJ0_HUMAN	TrEMBL	cDNA, FLJ95537, highly similar to Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8 (CYP4F8), mRNA	520
	sid 13957 pid 10216 hfid 154 sfid 4 Homosapiens	Q6ZWL3	CP4V2_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 4V2 (EC 1.14.14.-) (Docosahexaenoic acid omega- hydroxylase CYP4V2) (EC 1.14.14.79)	525
	sid 13960 pid 10216 hfid 154 sfid 4 Homosapiens					

LinJ.27.0090: mRNA-p1	sid 56985 pid 40377 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens	P24557	THAS_HUMAN	Swiss-Prot	Thromboxane-A synthase (TXA synthase) (EC 5.3.99.5) Cytochrome P450 5A1	533
	sid 56983 pid 40377 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56897 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56893 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56889 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56887 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56888 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56891 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56892 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56896 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 56890 pid 40302 hfid 187 sfid 5 Homo sapiens					
	sid 12455 pid 9002 hfid 365 sfid 46 Homo sapiens					
	sid 12479 pid 9012 hfid 365 sfid 46 Homo sapiens					

Tabela 5.7. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.30.3610 identificadas e classificadas no consórcio *Uniprot Knowledgebase*. A sequência em negrito representa a sequência de melhor significado estatístico (potencialmente similares) dentre as sequências identificadas no CYPED.

Identificador TrityDB	Identificador CYPED	Identificador Uniprot	Nome de entrada	Base de Dados	Nome da Proteína	Tamanho
LinJ.30.3610: mRNA-p1	sid 7704 pid 5312 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	O43174	CP26A_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 26A1 (Retinoic acid 4-hydroxylase) (EC 1.14.13.-)	497
	sid 7700 pid 5312 hfid 330 sfid 26 Homosapiens					
	sid 7742 pid 5343 hfid 330 sfid 26 Homosapiens					
	sid 7819 pid 5395 hfid 330 sfid 26 Homosapiens	Q9NR63	CP26B_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 26B1 (Cytochrome P450 26A2) (EC 1.14.13.-)	512
	sid 7833 pid 5395 hfid 330 sfid 26 Homosapiens					
	sid 7901 pid 5427 hfid 330 sfid 26 Homosapiens					
	sid 7900 pid 5427 hfid 330 sfid 26 Homosapiens					

LinJ.30.3610: mRNA-p1	sid 11921 pid 8606 hfid 65 sfid 3 Homosapiens syntheticconstruct	P20815	CP3A5_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 3A5 (EC 1.14.14.1)	502
	sid 12029 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	B4DPQ5	B4DPQ5_HUMA N	TrEMBL	cDNA FLJ51521, highly similar to Cytochrome P450 3A4	323
	sid 11917 pid 8606 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	B2R9K2	B2R9K2_HUMA N	TrEMBL	cDNA, FLJ94431, highly similar to Homo sapiens cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 (CYP3A5), mRNA	502
	sid 12075 pid 8719 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	Q16743	Q16743_HUMAN	TrEMBL	Cytochrome P-450 II C (Fragment)	356
	sid 11923 pid 8606 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	Q53GC3	Q53GC3_HUMA N	TrEMBL	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 variant (Fragment)	502
	sid 11984 pid 8650 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	B7Z3P6	B7Z3P6_HUMA N	TrEMBL	cDNA FLJ56918, highly similar to Cytochrome P450 3A5	492
	sid 11985 pid 8650 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12160 pid 8775 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	P24462	CP3A7_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 3A7 (EC 1.14.14.1)	503
	sid 12158 pid 8775 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12159 pid 8775 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					

LinJ.30.3610: mRNA-p1	sid 12034 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	Q7Z448	Q7Z448_HUMA N	TrEMBL	Cytochrome P450 (Fragment)	430
	sid 12112 pid 8745 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	Q9HB55	CP343_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 3A43 (EC 1.14.14.1)	503
	sid 12111 pid 8745 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12032 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens	P08684	CP3A4_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 3A4 (EC 1.14.14.-)	503
	sid 12260 pid 8846 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12031 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12028 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12075 pid 8719 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12033 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12035 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12238 pid 8832 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 110300 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12030 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					
	sid 12029 pid 8684 hfid 65 sfid 3 Homosapiens					

LinJ.30.3610: mRNA-p1	sid 35284 pid 25457 hfid 375 sfid 51 syntheticconstruct	Q16850	CP51A_HUMAN	Swiss-Prot	Lanosterol 14-alpha demethylase (EC 1.14.14.154) (Cytochrome P450 51A1)	503
	sid 35283 pid 25457 hfid 375 sfid 51 HomoSapiens					
	sid 35361 pid 25499 hfid 375 sfid 51 HomoSapiens					
	sid 35291 pid 25457 hfid 375 sfid 51 HomoSapiens					
	sid 35290 pid 25457 hfid 375 sfid 51 HomoSapiens					
	sid 6093 pid 4145 hfid 316 sfid 19 HomoSapiens	A0A024R5S8	A0A024R5S8_HUMAN	TrEMBL	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1, isoform CRA_a	503
	sid 6104 pid 4145 hfid 316 sfid 19 HomoSapiens	Q8IYG4	Q8IYG4_HUMAN	TrEMBL	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	503
	sid 6091 pid 4145 hfid 316 sfid 19 HomoSapiens	A8K6W3	A8K6W3_HUMAN	TrEMBL	cDNA FLJ75846, highly similar to Homo sapiens cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1), transcript variant 1, mRNA	503

LinJ.30.3610: mRNA-p1	sid 6098 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens	P11511	CP19A_HUMAN	Swiss-Prot	Aromatase (Cytochrome P450 19A1) (Estrogen synthase) (EC 1.14.14.14)	503
	sid 6095 pid 4145 hfid 316 sfid 19 Homosapiens					
	sid 6119 pid 4156 hfid 316 sfid 19 Homosapiens					

Tabela 5.8. Sequências humanas homólogas putativas de LinJ.34.3110 identificadas e classificadas no consórcio Uniprot Knowledgebase. A sequência em negrito representa a sequência de melhor significado estatístico (potencialmente similares) dentre as sequências identificadas no CYPED.

Identificador TrityDB	Identificador CYPED	Identificador Uniprot	Nome de entrada	Base de Dados	Nome da Proteína	Tamanho
LinJ.34.3110: mRNA-p1	sid 14108 pid 10336 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	Q86W10	CP4Z1_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 4Z1 (EC 1.14.14.1)	505
	sid 12993 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	Q8IZB0	Q8IZB0_HUMAN	TrEMBL	Cytochrome P450 4B1	497
	sid 12626 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	A0A0C4DFV7	A0A0C4DFV7_ HUMAN		Cytochrome P450 4A11	455
	sid 12624 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	Q16802	Q16802_HUMAN	Fatty acid omega- hydroxylase	521	
	sid 12761 pid 9227 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	Q02928	CP4AB_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 4A11 (20- hydroxyeicosatetraenoic acid synthase) (EC 1.14.14.80)	519
	sid 12623 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens					
	sid 12625 pid 9125 hfid 120 sfid 4 Homosapiens					

LinJ.34.3110: mRNA-p1	sid 12455 pid 9002 hfid 365 sfid 46 Homosapiens	Q9Y6A2	CP46A_HUMAN	Swiss-Prot	Cholesterol 24-hydroxylase (Cytochrome P450 46A1) (EC 1.14.14.25)	500
	sid 12479 pid 9012 hfid 365 sfid 46 Homosapiens					
	sid 12995 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens	P13584	CP4B1_HUMAN	Swiss-Prot	Cytochrome P450 4B1 (EC 1.14.14.1)	511
	sid 12996 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens					
	sid 12997 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens					
	sid 12998 pid 9425 hfid 120 sfid 4 Homosapiens					

5.3. Predição funcional *in silico* das sequências P450 potencialmente homólogas de *L. infantum*.

As análises de predição funcional *in silico* nos bancos de dados do consórcio InterPro das sequências P450 putativas demonstraram que todas as 4 sequências de *L. infantum*, obtidas das análises por similaridade local com as enzimas humanas depositadas no CYPED, possuem assinaturas características da superfamília das enzimas Citocromo P450, como podemos observar na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Predições funcionais encontradas no banco de dados InterPro através da ferramenta Interproscan das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

	InterPro	Pfam	Prosit	Prints	Superfamily
Sequência putativa de <i>Leishmania</i>	Família Associada	Assinatura	Assinatura	Assinatura	Assinatura
LinJ.11.1100	Cytochrome P450	Cytochrome P450	Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature	E-class P450 group IV signature	Cytochrome P450
LinJ.27.0090	Cytochrome P450	Cytochrome P450	Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature	E-class P450 group IV signature P450 superfamily signature	Cytochrome P450
LinJ.30.3610	Cytochrome P450	Cytochrome P450	Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature	E-class P450 group IV signature	Cytochrome P450
LinJ.34.3110	Cytochrome P450	Cytochrome P450	Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature	E-class P450 group IV signature P450 superfamily signature	Cytochrome P450

A Tabela 5.10 demonstra a classificação das 4 sequências baseadas na ontologia gênica definida pelo consórcio Gene Ontology. Todas as sequências são associadas ao processo biológico principal de oxidação-redução. Porém, a sequência LinJ.11.1100 ainda possui como processo biológico associado metilação e desmetilação. Todas as sequências possuem como função molecular associada a ligação ao heme e também ao íon ferro, assim como atividade de monooxigenase e

oxirredutase (na sequência LinJ.11.1100 essa atividade é caracterizada como “*sterol 14-demethylase activity*” – dado não mostrado na tabela). A sequência LinJ.27.0090 tem também como função molecular associada a atividade hidroxilase do anel beta-caroteno. Já na categoria componente celular, as sequências possuem classificação de componente integral de membrana (dado não mostrado na tabela), mas cada uma das sequências possui suas particularidades nessa categoria. A sequência LinJ.11.1100 é componente do retículo endoplasmático, da membrana plasmática e do complexo de Golgi. A sequência LinJ.27.0090 figura como componente da membrana do cloroplasto. As sequências LinJ.30.3610 e LinJ.34.3110 aparecem também como componentes do retículo endoplasmático, sendo a segunda também classificada como componente de partículas lipídicas.

Tabela 5.10. Predições funcionais de ontologia gênica mapeadas no consórcio Gene Ontology através do programa Argot2.5 das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

Sequência de <i>L. infantum</i> potencialmente homólogo	Componente Celular	Processo Biológico	Função Molecular
LinJ.11.1100	Retículo endoplasmático, membrana plasmática e complexo de Golgi.	Oxidação-redução Desmetilação/metilação	Ligadora de heme Ligadora do íon ferro Atividade monooxigenase Atividade oxidoreductase
LinJ. 34.3110	Retículo endoplasmático e componente de partículas lipídicas	Oxidação-redução	Ligadora de heme Ligadora do íon ferro Atividade monooxigenase Atividade oxidoreductase Atividade hidroxilase do anel beta-caroteno
LinJ.30.3610	Retículo endoplasmático		
LinJ.27.0090	Membrana do cloroplasto		

5.4. Predição das estruturas secundárias baseada no alinhamento múltiplo de sequências e localização dos motivos conservados da superfamília P450.

Uma vez que as estruturas secundárias são mais conservadas que a sequência primária de aminoácidos, é possível observar o grau de conservação entre as sequências realizando a predição das estruturas secundárias. Realizamos o alinhamento de múltiplas sequências das 4 sequências P450 putativas de *L. infantum*. Podemos observar uma conservação entre a sequência anotada como “*putative lanosterol 14-alpha-demethylase*” (LinJ.11.1100), ou seja, a CYP51A1 de *L. infantum*, e as sequências anotadas como “*cytochrome p450-like protein*” (LinJ.34.3110, LinJ.27.0090, LinJ.30.3610), com a colocação *in silico* das estruturas α -hélice e β -folha entre as 4 sequências. As regiões destacadas correspondem aos típicos motivos de assinatura da superfamília P450: AGXXT (domínio de ligação ao oxigênio na hélice I – em verde), EXXR (domínio C-terminal da hélice K – em cinza), e DXXXF ((na hélice K – em amarelo), FXXGXRXCXG (no domínio de ligação ao heme – em rosa) (Figura 5.1).

Algumas modificações de aminoácidos foram observadas dentro dos motivos identificados em cada sequência de *L. infantum*. Houve uma troca do aminoácido glicina (G) para metionina (M) no motivo AGXXT (em verde) na sequência LinJ.30.3610, formando o motivo AMXXT. Ambos os aminoácidos glicina e metionina pertencem à classe de aminoácidos apolares alifáticos. Também houve uma troca de aminoácidos no motivo DXXXF (em amarelo): na sequência LinJ.30.3610, o aminoácido fenilalanina (F) foi modificado por uma metionina (M), formando o motivo DXXXM. Ambos os aminoácidos também pertencem à classe de aminoácidos apolares, porém, a fenilalanina pertence ao grupo de aminoácidos aromáticos. Além disso, a localização dentro de cada uma das 4 sequências de *L. infantum* também apresentou diferenças. Ambos os motivos de ligação ao heme – FXXGXRXCXG – (em rosa) e o motivo da hélice K – EXXR – (em azul) estavam em posição colocalizada dentro das 4 sequências de *L. infantum*. O motivo AMXXT da sequência LinJ.30.3610 apareceu 6 aminoácidos antes da colocação nas outras 3 sequências. Já o motivo DXXXF das sequências LinJ11.1100, LinJ.27.0090 LinJ.34.3110 e DXXXM da sequência LinJ.30.3610 apareceu em posições diferentes

nas 4 sequências (Figura 5.1). Importante ressaltar que essas mudanças de aminoácidos não impediram o reconhecimento do domínio.

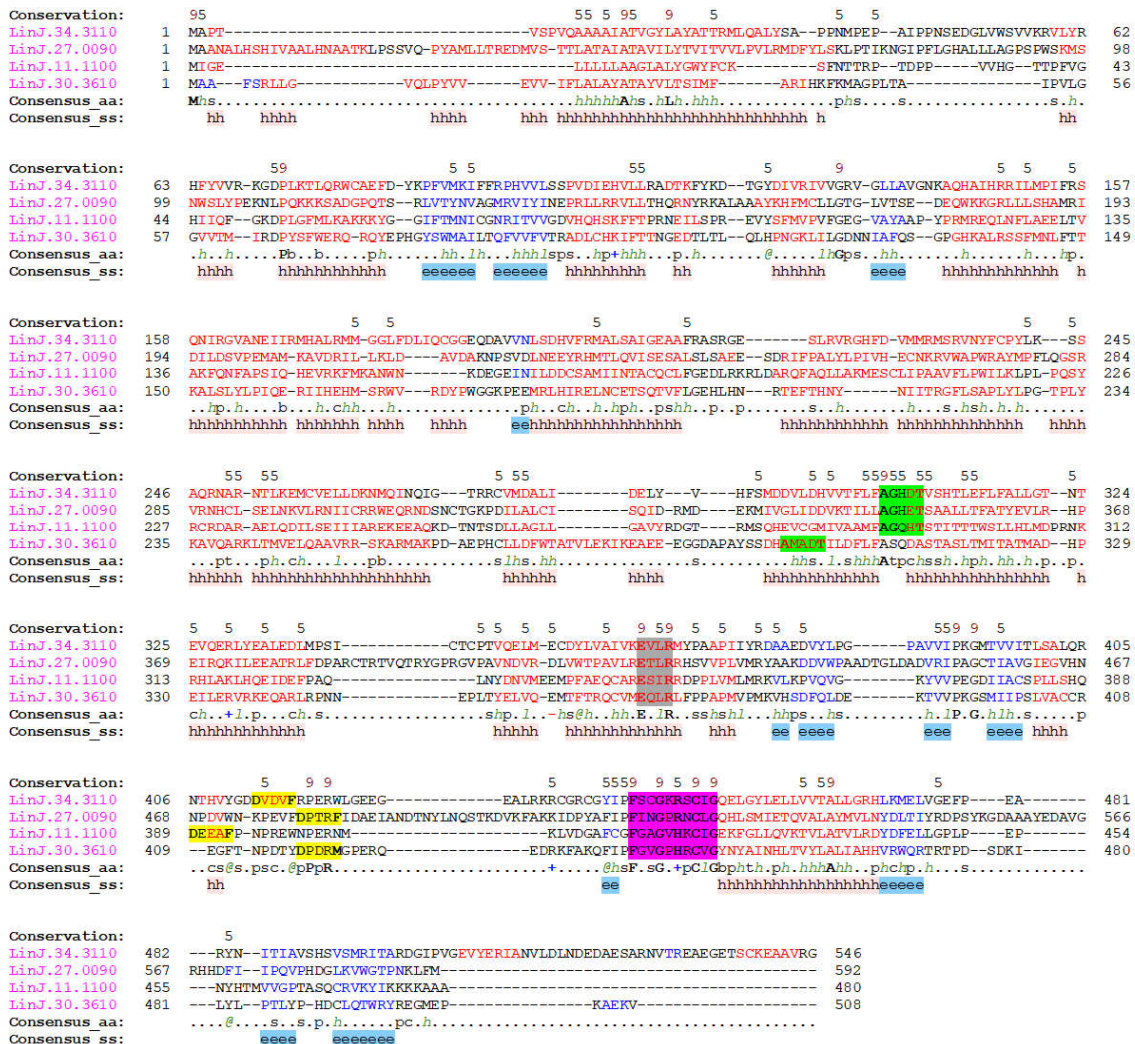


Figura 5.1. Predição de estruturas secundárias através do alinhamento de múltiplas sequências das sequências P450 putativas de *L. infantum*, com identificação dos motivos AGXXT (verde), EXXR (cinza), DXXXF (amarelo) e FXXGXRXCXG (rosa). Predição e identificação de estruturas secundárias: α -hélice (h) indicada em vermelho e folha- β (e) indicada em azul.

5.5. Análise *in silico* da anotação de mRNA e da expressão proteica em dados proteômicos das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

A análise da expressão do mRNA e da expressão proteica é importante para corroborar a classificação das sequências em moléculas funcionais. Assim, as análises *in silico* demonstram que todas as sequências anotadas possuem anotação de expressão do mRNA, com seus respectivos transcritos relacionados às enzimas P450 (Tabela 5.2): LinJ.11.1100:mRNA transcreve a enzima CYP51A1 com

atividade estero 14- α -desmetilase, conhecida como CYP51A1; LinJ.27.0090:mRNA, LinJ.30.3610:mRNA e LinJ.34.3110:mRNA transcrevem produtos relacionados com “cytochrome p450-like protein”.

A pesquisa de dados proteômicos revelou um experimento *in silico* de proteômica (PRD000608), publicado na forma de artigo intitulado “A proteogenomic approach to map the proteome of an unsequenced pathogen - *Leishmania donovani*”. Nesse experimento foram identificadas a expressão de 22.322 proteínas preditas de *L. donovani*, que possuem similaridade com 3.711 proteínas preditas de *L. infantum*, entre elas LinJ.11.1100 e LinJ.27.0090, duas das sequências P450 putativas identificadas em nosso estudo.

Tabela 5.11. Anotações de expressão de RNA mensageiro encontradas no conjunto de transcritos obtidos de banco de dados TriTrypDB das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

Sequências putativas de P450 – Código Transcriptoma	Atividade catalítica do produto do transcrito
LinJ.11.1100:mRNA	sterol 14-alpha-demethylase
LinJ.27.0090:mRNA	cytochrome p450-like protein
LinJ.30.3610:mRNA	cytochrome p450-like protein
LinJ.34.3110:mRNA	cytochrome p450-like protein

5.6. Análise dos níveis de mRNA das sequências P450 putativas de *L. infantum*.

Os níveis de expressão de mRNA das seqüências putativas (CYP27.0090, CYP30.3610, CYP34.3110 e CYP51) foram conduzidos por q-PCR no RNA total extraído de culturas de *L. infantum* em fase logarítmica (3º dia de cultura). A expressão gênica da CYP51, que codifica a enzima CYP51A1 com atividade estero 14- α -desmetilase, foi comparada com outras sequências putativas. Assim, pudemos comprovar que os genes que identificamos através de nossas abordagens *in silico* são de fato transcritos no parasito. Observamos, ainda, que a CYP51 gera 11,6x, 9,8x e 1,4x mais transcritos do que CYP27.0090, CYP30.3610, CYP34.3110, respectivamente (Figura 5.2).

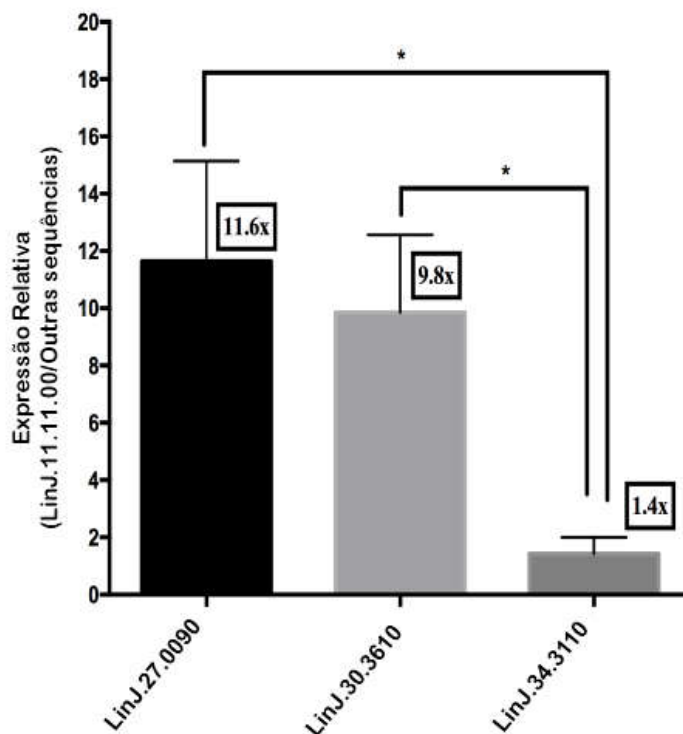


Figura 5.2. Expressão de mRNA em *L. infantum* por RT-PCR quantitativa em tempo real. As razões da expressão de mRNA da CYP51 foram medidas em *L. infantum*, e então foram comparadas aos níveis de expressão do gene CYP27.0090, gene CYP30.3610, gene CYP34.3110. A expressão de GAPDH foi usada para normalizar os dados. Os valores são a média de três experimentos independentes realizadas com três preparações biológicas de RNA. Os dados foram analisados pelo teste t-student * $p > 0,05$.

Na figura 5.3 podemos observar que as sequências LinJ.34.3110 e LinJ.11.1100 possuem valores menores de ΔCT em relação as outras duas sequências, e os valores de ΔCT são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucléico na amostra, então quanto menor o valor de ΔCT , maior é o nível de expressão do gene naquela amostra. Assim, estes dois genes possuem um maior nível de expressão que as sequências LinJ.27.0090 e LinJ.30.3610. Porém, com esse resultado podemos concluir novamente que todas as sequências são transcritas no parasito.

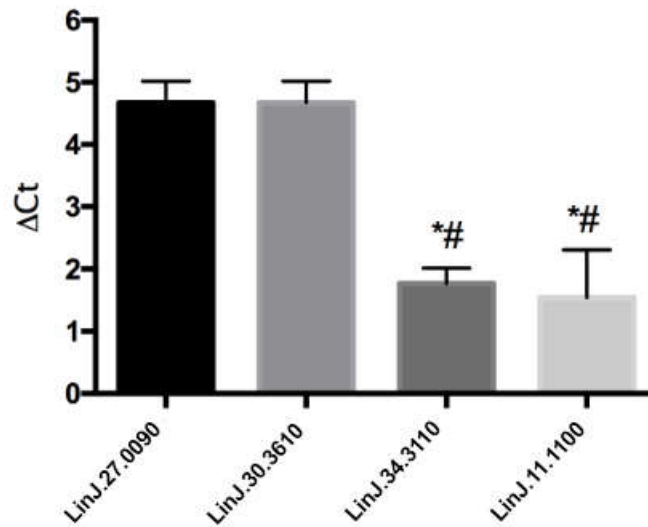


Figura 5.3. Expressão de mRNA em *L. infantum* por RT-PCR quantitativa em tempo real. São expressos os valores de delta dos valores de CT. A expressão de GAPDH ou Actina foram usadas para normalizar os dados. Média de três experimentos independentes realizadas com três preparações biológicas de RNA. Os dados foram analisados pelo teste t-student *# $p > 0,05$.

6. Discussão

A necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses se justifica pelos problemas enfrentados no tratamento atual: fármacos de primeira escolha, os antimoniais pentavalentes e outros fármacos como pentamidina, anfotericina B, miltefosina e paromomicina são medicamentos dispendiosos, possuem diversos efeitos colaterais e a maioria deles necessita da hospitalização do paciente (Alvar *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de uma nova molécula como forma inovadora para tratamento de doenças enfrenta muitas dificuldades, principalmente o longo tempo entre a descoberta e o licenciamento desse novo composto e os altos custos que todo esse processo demanda. O interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos para doenças tropicais negligenciadas é menor ainda, pois o custo das pesquisas de novos fármacos é conhecidamente alto e a recuperação do investimento e a lucratividade são de longo prazo (Ekins *et al.*, 2011). Essas dificuldades têm direcionado as pesquisas a encontrar uma alternativa que possa facilitar e agilizar a chegada de novos tratamentos na clínica médica.

O reposicionamento de fármacos tem surgido como uma alternativa viável. Esse processo possui como principais vantagens a diminuição de tempo e custo no desenvolvimento de novas terapias, pois trabalha-se com fármacos aprovados e seus aspectos farmacocinéticos e toxicológicos já são determinados e conhecidamente seguros (Oprea & Mestres, 2012).

Como descrito anteriormente, diversas classes de fármacos têm sido alvo de estudos de reposicionamento. Sobre o tratamento das leishmanioses, duas revisões recentes mostraram estudos sobre vários medicamentos licenciados de diferentes classes que já foram testados contra *Leishmania* spp., indicando triagem *in vitro*, ensaios *in vivo* e mecanismo de ação e ensaios clínicos (Charlton *et al.*, 2018; Andrade-Neto *et al.*, 2018). No contexto do reposicionamento de fármacos inibidores de enzimas P450, a maioria dos estudos foca especificamente a inibição da CYP51, a enzima mais estudada nessa superfamília (Lepesheva *et al.*, 2018; Debnath *et al.*, 2017; Gunatilleke *et al.*, 2012).

Muitas ferramentas *in silico* podem direcionar o conhecimento de possíveis fármacos candidatos ao reposicionamento através da construção de modelos

preditivos, utilizando informações disponíveis para a comunidade científica, como estudos de proteínas-alvo e estrutura química dos fármacos, por exemplo (Prathipati & Mizuguchi, 2016). Diversos métodos computacionais podem auxiliar a elucidar esses modelos preditivos como os métodos baseados em alvos, estruturas químicas, vias metabólicas e mecanismo de ação (Jin & Wong, 2014).

Ferramentas de bioinformática têm sido aplicadas em várias pesquisas sobre o complexo enzimático P450, como mostra o trabalho de Zhang & Wei (2015), que compila estudos anteriores sobre essas enzimas utilizando métodos da bioinformática estrutural, avaliando o impacto do uso dessas ferramentas no planejamento de medicamentos.

Baseado nessa compilação de informações, nosso estudo lançou mão do uso de ferramentas clássicas de bioinformática, com o objetivo de encontrar novas enzimas P450 no conjunto de proteínas preditas de *L. infantum* homólogas às enzimas humanas, que pudessem ser utilizadas como alvos farmacológicos no processo de reposicionamento de fármacos inibidores de enzimas P450 de humanos para o tratamento das leishmanioses.

Assim, identificamos 4 sequências P450 putativas através da busca por similaridade local entre as enzimas P450 humanas depositadas no banco de dados CYPED e o conjunto de proteínas preditas de *L. infantum*. Cada uma das sequências podem ser potencialmente homólogas a diversas famílias e subfamílias das enzimas humanas.

Lisitsa *et al* (2003) realizou um alinhamento local utilizando a ferramenta BLASTp de enzimas P450 e demonstrou que as sequências compartilham uma certa similaridade geral, o que justificaria a identificação de diversas famílias/subfamílias para cada sequência de *L. infantum* no nosso trabalho. Ao mesmo tempo, por meio de análise de clusters, demonstrou-se que a superfamília P450 pode ser dividida em vários grupos de proteínas intimamente relacionadas, revelando forte hierarquia entre as enzimas P450 de animais, bactérias e fungos e distância dessa hierarquia entre as enzimas de plantas. Estima-se que essa similaridade seja de cerca de 10-30% em enzimas microsossomais (Hasemann *et al.*, 1995).

Quando realizamos o mapeamento das sequências humanas potencialmente homólogas identificadas no CYPED para cada sequência de *L. infantum*, a fim de obter uma correspondência para cada uma das sequências humanas no banco de

dados de proteínas humanas Uniprot, observamos que várias sequências do CYPED possuem o mesmo identificador no Uniprot, indicando uma redundância de anotação de sequências P450 no banco de dados CYPED, possivelmente de várias isoformas da mesma enzima. Porém, todas as 4 sequências P450 putativas de *L. infantum* obtiveram correspondência com sequências anotadas no banco de dados SwissProt, um banco de dados curado de anotação de informações de proteínas, o que suporta que essas sequências putativas possam ser homólogas a enzimas P450 humanas.

O processo de geração de bancos de dados, também conhecido no contexto biológico como anotação, pode ser realizado de duas maneiras: através de anotação manual, gerado com a supervisão integral ou parcial de especialistas, e esses são conhecidos como bancos de dados curados; ou através de anotação automática, gerado por processos computacionais de forma automatizada (Oliveira, 2011). O banco de dados CYPED faz parte do consórcio BioCatNet, um repositório de banco de dados específico de famílias de proteínas e foi criado a partir da recuperação de informações de dados de sequências, estruturas e informação de anotação do GenBank e do Protein Data Bank (PDB), dois bancos de dados de anotações de sequências de nucleotídeos publicamente disponíveis e suas traduções de proteínas. O CYPED é atualizado regularmente por um script automatizado em linguagem Perl e um BLAST contra a versão atual do banco de dados GenBank é realizado e as novas anotações de sequências e estrutura no GenBank são atualizadas e são classificadas em famílias homólogas com base em similaridade de sequência (Sirim *et al.*, 2009).

O GenBank é um dos maiores e mais completos bancos de anotação de dados genômicos no mundo e faz parte de uma Colaboração Internacional de Banco de Dados de Sequência de Nucleotídeos (do inglês INSDC - International Nucleotide Sequence Database Collaboration), que compreende o DNA DataBank do Japão (DDBJ), o European Nucleotide Archive (ENA) e o próprio GenBank no NCBI. Essas três organizações trocam dados diariamente. Porém, o GenBank não é considerado um banco de dados curado, podendo conter inconsistências em suas informações, inclusive dados redundantes relacionados à anotação gênica (Cabral *et al.*, 2011).

A presença de assinaturas, domínios e sítios importantes da superfamília P450 identificados nas 4 sequências de *L. infantum* pelo consórcio InterPro e a classificação ontológica, ou seja, anotações de processo biológico, função molecular e componente celular relacionados a enzimas P450 constituem um indício de que essas sequências possam ser caracterizadas como enzimas P450.

Análises de previsão das estruturas secundárias das 4 sequências P450 potencialmente homólogas de *L. infantum* também foram realizadas. Uma vez que as estruturas secundárias são mais conservadas do que a sequência primária de aminoácidos, é possível observar um grau de conservação entre sequências de proteínas. A conservação observada entre o CYP51A1 de *L. infantum* (LinJ.11.1100) e as outras sequências (LinJ.34.3110, LinJ.27.0090, LinJ.30.3610), bem como a colocação *in silico* de arranjos que caracterizam estruturas secundárias como α -hélice e folha- β e identificação dos principais motivos característicos da superfamília P450 entre as 4 sequências indicam uma possível conservação da função entre estas proteínas putativas.

Hasemann *et al* (1995) realizou o alinhamento múltiplo de estruturas secundárias de enzimas P450 de 3 espécies de bactérias, e observou que as regiões mais altamente conservadas entre as três estruturas são aquelas envolvidas na ligação ao heme, e geralmente, há uma conservação de resíduos não polares que estabelecem um ambiente hidrofóbico para o heme. De maneira semelhante, a mesma conservação e colocação do motivo de ligação ao heme FXXGXRXCXG foi encontrada nas 4 sequências de *L. infantum* do nosso estudo, com a mesma predominância de aminoácidos hidrofóbicos dentro do motivo. No mesmo estudo, foi realizado o alinhamento das 3 sequências P450 bacterianas juntamente com sequências P450 de outras espécies de animais e humanos, e realizou também a localização de motivos conservados. Como resultado, observou que o alinhamento da região da hélice K, que é representado pelo motivo conservado EXXR, mostrou-se invariante em todas as sequências examinadas. Nosso estudo também mostrou que o motivo EXXR dentro das 4 sequências de *L. infantum* mostrou-se conservado e colocado *in silico*.

De maneira similar ao nosso trabalho, Li *et al.* em 2013 conduziu um estudo para entender o papel das enzimas P450 de uma cepa de *Streptomyces virginiae* IBL14, utilizando as mesmas técnicas *in silico* clássicas: comparações entre

sequência genômica e bancos de dados de proteínas através da comparação pela ferramenta blastp para identificar novas enzimas putativas; alinhamento com sequências P450 de outras espécies do gênero *Streptomyces* para realizar a predição das sequências de aminoácidos; identificação de motivos característicos e pesquisa por homólogos bacterianos mais próximos; na tentativa de classificar as sequências putativas nas correspondentes famílias e subfamílias P450.

Dados de transcriptoma mostraram que todas as 4 sequências P450 potencialmente homólogas de *L. infantum* possuem dados experimentais de anotação de expressão de mRNA, e foram confirmadas através dos nossos ensaios dos níveis de expressão relativa dos genes pela técnica de qPCR. A expressão relativa dos 3 genes classificados como “cytochrome p450-like protein” (LinJ.27.0090, LinJ.30.3610 e LinJ.34.3110) foram comparados aos níveis de expressão da sequência LinJ.11.1100, anotado como a CYP51 de *L. infantum*, pois esse gene já é conhecido por ser expresso em espécies de *Leishmania* e é uma importante enzima da via de biossíntese de esteróis. Os resultados de expressão relativa dessas 3 sequências podem indicar que estas podem potencialmente ser expressas em proteínas, assim como a CYP51. Além disso, nossos dados mostram que as sequências LinJ.34.3110 e LinJ.11.1100 são mais transcritas que as outras duas sequências identificadas.

Dados proteômicos já existentes na literatura mostram que pelo menos duas sequências P450 putativas identificadas em nosso estudo, LinJ.11.1100 e LinJ.27.0090, são potencialmente expressas em *L. infantum* (através da homologia com enzimas expressas em *L. donovani*). Outro estudo recente também utilizou dados de transcriptoma para identificar e analisar novos genes P450 da *Lonicera japonica*, uma importante planta medicinal (Qi *et al.*, 2017).

Importante ressaltar que não há dados de identificação e análise de genes e proteínas P450 de espécies do gênero *Leishmania* que sejam homólogas a enzimas P450 humanas na literatura, ressaltando uma maior importância dos dados apresentados nesse trabalho.

7. Conclusões

Nossos resultados *in silico* demonstraram que as 4 sequências P450 putativas de *L. infantum* encontradas em nossos estudos *in silico*, assim como todas as análises de caracterização *in silico* realizadas: análise de anotação funcional, identificação de motivos característicos da superfamília, predição de estruturas secundárias, análise *in silico* da expressão de transcrição, confirmada pelos ensaios experimentais de expressão relativa das sequências e análise de dados *in silico* de proteômica das sequências, levam a crer que as 4 sequências P450 putativas de *L. infantum* podem ser caracterizadas como enzimas pertencentes à superfamília Citocromo P450.

8. Referências

- Agarwal G, Gupta S, Gabrani R, Gupta A, Chaudhary VK, Gupta V. Virtual screening of inhibitors against Envelope glycoprotein of Chikungunya Virus: a drug repositioning approach. *Braz J Infect Dis*. 2019. May - Jun;22(3):252-256. doi: 10.1016/j.bjid.2018.05.007.
- Agosin M, Naquira C, Paulin J, Capdevila J. Cytochrome P-450 and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: effects of phenobarbital. *Science*. 1976. Oct 8;194(4261):195-7.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 2012. May;7(5): e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Alves ÉAR, de Miranda MG, Borges TK, Magalhães KG, Muniz-Junqueira MI. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: the role of NF-κB and PPAR-γ. *Int Immunopharmacol*. 2015. Feb;24(2):314-324. doi: 10.1016/j.intimp.2014.12.025.
- Ahmad N, Mukhtar H. Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2004. Sep;123(3):417-25. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23307.x
- Akhondzadeh S. The Importance of Clinical Trials in Drug Development. *Avicenna J. Med*. 2016. Biotechnol. Oct-Dec; 8(4): 151.
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L, Sereno D. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017. Oct; 57:1-29. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2016. Mar 3;10(3). doi: 10.1371/journal.pntd.0004349e0004349.
- Akuffo H, Maasho K, Blostedt M, Hojeberg B, Britton S, Bakhiet M. *Leishmania aethiopica* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon-γ. *J. Infect. Dis*. 1997. Mar: 175, 737–741. doi: 10.1093/infdis/175.3.737.
- Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Dos Santos Faioes V, Pereira TM, Silva RL, Leon LL, Torres-Santos EC. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018 Jan 1;23:967-996.
- Andrade-Neto VV, Matos-Guedes HL, Gomes DC, Canto-Cavaleiro MM, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012. May;107(3):416-9.
- Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004. Aug;3(8):673-83. DOI:10.1038/nrd1468
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SCF. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. In: Fátima Conceição-Silva e Carlos Roberto Alves

- (Org.). Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014. p. 311-326.
- Bailly C. Toward a repositioning of the antibacterial drug nifuroxazide for cancer treatment. *Drug Discov Today*. 2019. Jun 28. pii: S1359-6446(19)30148-5. doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.017.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995. Sep;53(3):256-9. doi: 10.4269/ajtmh.1995.53.256.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1991, 44, 536–546.
- Barbosa EJ, Löbenberg R, de Araujo GLB, Bou-Chacra NA. Niclosamide repositioning for treating cancer: Challenges and nano-based drug delivery opportunities. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019. Aug;141:58-69. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.05.004.]
- Bathe U, Tissier A. Cytochrome P450 enzymes: A driving force of plant diterpene diversity. *Phytochemistry*. 2019. May;161:149-162. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.12.003.
- Behrendorff JB, Gillam EM. Prospects for Applying Synthetic Biology to Toxicology: Future Opportunities and Current Limitations for the Repurposing of Cytochrome P450 Systems. *Chem Res Toxicol*. 2017. Jan 17;30(1):453-468. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00396.
- Berger BJ, Fairlamb AH. Cytochrome P450 in trypanosomatids. *Biochem Pharmacol*. 1993. Jul 6;46(1):149-57.
- Bezerra-Souza A, Fernandez-Garcia R, Rodrigues GF, Bolas-Fernandez F, Dalastra Laurenti M, Passero LF, Lalatsa A, Serrano DR. Repurposing Butenafine as An Oral Nanomedicine for Visceral Leishmaniasis. *Pharmaceutics*. 2019. Jul 20;11(7). pii: E353. doi: 10.3390/pharmaceutics11070353.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 189 p. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. – 1. ed., 5. reimpr. 120 p. Brasília: Ministério da Saúde.
- Bruno RD, Njar VC. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg Med Chem*. 2007. Aug 1;15(15):5047-60. doi: 10.1016/j.bmc.2007.05.046
- Bortolanza M, Nascimento GC, Socias SB, Ploper D, Chehín RN, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018. Oct;125(10):1403-1415. doi: 10.1007/s00702-018-1913-1.

- Boulos M. Doenças emergentes e reemergentes no Brasil. 2001. v.29, n.170, p. 58-60.
- Brodie BB, Gillette JR, La Du BN. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annu Rev Biochem.* 1958. Jul;27(3):427-54.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018. Sep 15;392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- Cabral HCB, Librelotto GR, Simão EM, Sinigaglia M, Castro MAA, Mombach JCM. O Processamento de uma Ontologia sobre a Integração de Dados de Vias de Interação Molecular Envolvidas em Câncer. *Rev Bras Comp Apl.* 2011. Mar;3(1):82-91.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994. Abr: 56:315–25. doi: 10.1016/0001-706x(94)90103-1.
- Chan HH, Wajidi MF, Zairi J. Molecular cloning and xenobiotic induction of seven novel cytochromeP450 monooxygenases in *Aedes albopictus*. *J Insect Sci.* 2014. Jan 1;14:163. doi: 10.1093/jisesa/ieu025.
- Charlton RL, Rossi-Bergmann B, Denny PW, Steel PG. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology.* 2018. Feb;145(2):219-236. doi: 10.1017/S0031182017000993.
- Chávez-Fumagalli MA, Ribeiro TG, Castilho RO, Fernandes SOA, Cardoso VN, Coelho CSP, Mendonça DVC, Soto M, Tavares CAP, Faraco AAG, Coelho EAF. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015. v. 48, 235-242. doi: 10.1590/0037-8682-0138-2015
- Chen X, Gumina G, Virga KG. Recent Advances in Drug Repurposing for Parkinson's Disease. *Curr Med Chem.* 2018. Jul 19. doi: 10.2174/0929867325666180719144850.
- Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1972. Jan: 66, 603–610. doi: 10.1016/0035-9203(72)90306-9.
- Coon, MJ. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. 2005. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Jan: 45, 1-25.
- Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. *J. Trop. Med. Hyg.* 1986. Dez: 89, 319–323.
- de Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2013. Dec 23;8(12):e83247. doi: 10.1371/journal.pone.0083247
- Debnath A, Calvet CM, Jennings G, Zhou W, Aksenov A, Luth MR, Abagyan R, Nes WD, McKerrow JH, Podust LM. CYP51 is an essential drug target for the treatment of primary amoebic meningoencephalitis (PAM). *PLoS Negl Trop Dis.* 2017. Dec 28;11(12):e0006104. doi: 10.1371/journal.pntd.0006104.

- Develoux M, Diallo S, Dieng Y, Mane I, Huerre M, Pratlong F, Dedet JP, Ndiaye B. Diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996. Ago;90, 396–397. doi: 10.1016/S0035-9203(96)90520-9.
- Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov today.* 2011. Apr;16(7-8):298–310. doi: 10.1016/j.drudis.2011.02.016.
- Ekins S, Mestres J, Testa B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol.* 2007. Sep;152(1):9-20. doi: 10.1038/sj.bjp.0707305.
- El-Sherbeni AA & El-Kadi AO. Microsomal cytochrome P450 as a target for drug discovery and repurposing. *Drug Metab Rev.* 2017 Feb;49(1):1-17. doi: 10.1080/03602532.2016.1257021
- Floeter-Winter LM, Cruz AK. Biologia Molecular da *Leishmania*: Genoma da *Leishmania*. In: Aldina Barral e Jackson Costa (Org.). *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. Bahia. CYTED; 2011. p. 24 – 38.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules.* 2009. Jun 30;14(7):2317-36. doi: 10.3390/molecules14072317.
- García-Serradilla M, Risco C, Pacheco B. Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals. *Virus Res.* 2019. Apr 15;264:22-31. doi: 10.1016/j.virusres.2019.02.011.
- Georgiadou SP, Makaritsis KP, and Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med.* 2015. Apr-Jun; 3(2): 43–50. doi: 10.1515/jtim-2015-0002
- Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010. Apr;8(4):419-33.
- Graham SE, Peterson JA. How similar are P450s and what can their differences teach us? *BMC Struct Biol.* 1999. Oct 15;10:34. doi: 10.1186/1472-6807-10-34.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989. Dez; 41(6):687-725. doi: 10.4269/ajtmh.1989.41.687.
- Gunatilleke, S.S.; Calvet, C.M.; Johnston, J.B.; Chen, C.K.; Erenburg, G.; Gut, J.; Engel, J.C.; Ang, K.K.; Mulvaney, J.; Chen, S.; Arkin, M.R.; McKerrow, J.H.; Podust, L.M. Diverse inhibitor chemotypes targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012. Jul;6(7):e1736. doi: 10.1371/journal.pntd.0001736.

- Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*. 1995.Jan 15;3(1):41-62.
- Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health*. 2016. Mar; 14;44:2. doi: 10.1186/s41182-016-0002-0.
- Isin EM, Guengerich FP. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2007. Mar;1770(3):314–29. doi:10.1016/j.bbagen.2006.07.003
- Jin G, Wong ST. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov Today*. 2014 May;19(5):637-44. doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.005.
- Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, *et al*. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis*. 1987. Jul;156, 73–83. doi: 10.1093/infdis/156.1.73.
- Kaiser M, Mäser P, Tadoori LP, Ioset JR, Brun R. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLoS One*. 2015. Aug 13;10(8):e0135556. doi: 10.1371/journal.pone.0135556.
- Karunaweera ND, Pratloug F, Siriwardane HV, Ihalamulla RL, Dedet JP. Sri lankan cutaneous leishmaniasis is caused by *Leishmania donovani* zymodeme mon-37. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2003. Jul-Aug;97(4):380-1.
- Kaur G, Rajput B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. *J Parasitol Res*. 2014. 2014:726328.doi: 10.1155/2014/726328.
- Keats T, Rosengren RJ, Ashton JC. The Rationale for Repurposing Sildenafil for Lung Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(3):367-374. doi: 10.2174/1871520617666171103100959.
- Kumar S, Chowdhury S, Kumar S. *In silico* repurposing of antipsychotic drugs for Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 2017. Oct 27;18(1):76. doi: 10.1186/s12868-017-0394-8.
- Kumar P, Lodge R, Trudel N, Ouellet M, Ouellette M, Tremblay MJ. Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigotes. *cPLoS Negl Trop Dis*. 2010. Mar 30;4(3):e642. doi: 10.1371/journal.pntd.0000642.
- Lane TR, Comer JE, Freiberg AN, Madrid PB, Ekins S. Repurposing Quinacrine Against Ebola Virus Infection *In vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019. Jul 15. pii: AAC.01142-19. doi: 10.1128/AAC.01142-19.
- Laudisi F, Di Grazia A, De Simone V, Cherubini F, Colantoni A, Ortenzi A, Franzè E, Dinallo V, Di Fusco D, Monteleone I, Fearon ER, Monteleone G, Stolfi C. Induction of endoplasmic reticulum stress and inhibition of colon carcinogenesis by the anti-helminthic drug rafoxanide. *Cancer Lett*. 2019. Jul 24. pii: S0304-3835(19)30410-0. doi: 10.1016/j.canlet.2019.07.014

- Lepesheva GI, Friggeri L, Waterman MR. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. *Parasitology*. 2018. Dec;145(14):1820-1836. doi: 10.1017/S0031182018000562
- Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Mar;1770(3):467-77. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.07.018
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Hitakarun A, Kato H, Tan-ariya, P, Siriyasatien P, Osatakul S, Mungthin M. Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. *BMC Microbiol*. 2013. Mar; 18;13:60. doi: 10.1186/1471-2180-13-60.
- Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*. 2004 Apr;5(3):305-18. doi: 10.1517/phgs.5.3.305.29827.
- Li ZZ, Li XF, Yang W, Dong X, Yu J, Zhu SL, Li M, Xie L, Tong WY. Identification and functional analysis of cytochrome P450 complement in *Streptomyces virginiae* IBL14. *BMC Genomics*. 2013. Feb; 27;14:130. doi: 10.1186/1471-2164-14-130.
- Liebhardt ME. Indústria Farmacêutica de Pesquisa: Novas terapias, novos métodos de pagamento e a convergência tecnológica. *Interfarma – Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa*. São Paulo. Jan. 2019.
- Lisitsa A, Archakov A, Lewi P, Janssen P. Bioinformatic insight into the unity and diversity of cytochromes P450. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003. Nov;25(9):733-45. doi: 10.1358/mf.2003.25.9.793342.
- Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, Barker DC, McCann SH, Watts DM. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1998. Ago: 59, 312–317. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.312.
- Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2005. Jan: 99, 55–61. doi: 10.1016/j.trstmh.2003.08.001.
- Maroutsos D, Huff H, Das A. Bacterial Expression of Membrane-Associated Cytochrome P450s and Their Activity Assay in Nanodiscs. *Methods Mol Biol*. 2019. Feb;1927:47-72. doi: 10.1007/978-1-4939-9142-6_5.
- Mehndiratta MM, Wadhai SA, Tyagi BK, Gulati NS, Sinha M. Drug repositioning. *Int J Epilepsy*. 2016. Dec; 03(02): 091-094 DOI: 10.1016/j.ijep.2016.09.002.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Out. 2017.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Tegumentar. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Jan. 2019.
- Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol*. 2014. Jan;4(1):4-9. doi: 10.4103/2229-5070.129142.

- Navarro-Mabarak C, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ. Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Drug Metab Rev.* 2018. May;50(2):95-108. doi: 10.1080/03602532.2018.1439502.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 1987. Feb;6(1):1-11. doi: 10.1089/dna.1987.6.1
- Nelson D (2013). [homepage da internet]. Cytochromes P450 in humans. [Acesso em 02 ago 2019]. Disponível em [<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>]
- Nelson DR. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol.* 2006. 320, 1-10.
- Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys.* 1999. Sep 1;369(1):1-10.
- Neuberger A. Renovation as innovation: is repurposing the future of drug discovery research? *Drug Discov Today.* 2018. Jan;24(1):1-3. doi: 10.1016/j.drudis.2018.06.012.
- Neve EP, Ingelman-Sundberg M. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem.* 2008. Nov;392(6):1075-84. doi: 10.1007/s00216-008-2200-z.
- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol.* 2011. Nov-Dec;86(6):1092-101. doi:dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000600005
- Noël F, Mendonça-Silva DL, Quintas, LEM. Radioligand binding assays in the drug discovery process: high throughput screening and the risk of false negative. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 2001. Feb;51(2):169-73.
- Ohk SO, Park HG, Lee H, Kwon YJ, Kim BJ, Kim D, Chun YJ. Heterologous expression and characterization of CYP61A1 from dandruff-causing *Malassezia globosa*. *Protein Expr Purif.* 2015. Oct;114:89-94. doi: 10.1016/j.pep.2015.07.002.
- Oliveira Neto MP, Grimaldi G Jr, Momen H, Pacheco RS, Marzochi MC, McMahon Pratt D. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1986, July/Sept. vol.81 no.3, 303–309.
- Omura T, Gotoh O. Evolutionary origin of mitochondrial cytochrome P450. *J Biochem.* 2017. May 1;161(5):399-407. doi: 10.1093/jb/mvx011.
- Omura T. Mitochondrial P450s. *Chem Biol Interact.* 2006.Oct 27;163(1-2):86-93. doi: doi.org/10.1016/j.cbi.2006.06.008Get.
- Oprea TI, Mestres J. Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *The AAPS J.* 2012. Dec;14(4);759–763. doi: 10.1208/s12248-012-9390-1.

- Ortiz de Montellano PR. Potential drug targets in the Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 system. *J Inorg Biochem.* 2018. Mar;180:235-245. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.010.
- Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: Clinical characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998. Jul; 59, 49–52. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.49.
- Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP. Repurposing drugs in your medicine cabinet: untapped opportunities for cancer therapy? *Future Oncol.* 2015. 11(2):181-4. doi: 10.2217/fon.14.244.
- Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(1):19-28. doi:10.1016/s0166-6851(01)00261-4
- Patil K, Bagade S, Bonde S, Sharma S, Saraogi G. Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis: Challenges and opportunities. *Biomed Pharmacother.* 2018. Mar;99:735-745. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.115
- Plenge RM, Scolnick EM, Altshuler D. Validating therapeutic targets through human genetics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. Aug;12(8):581-94. doi: 10.1038/nrd4051.
- Prathipati P, Mizuguchi K. Systems Biology Approaches to a Rational Drug Discovery Paradigm. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016. 16(9): 1009–1025. doi: 10.2174/1568026615666150826114524.
- Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996. Jan;22(1):1-13. doi: 10.1093/clinids/22.1.1.
- Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2018. Jan;18(1):41-58. doi: 10.1038/nrd9018.168.
- Qi X, Yu X, Xu D, Fang H, Dong K, Li W, Liang C. Identification and analysis of P450 genes from transcriptome of *Lonicera japonica* and expression analysis of chlorogenic acid biosynthesis related P450s. *PeerJ.* 2017. Sep 12;5:e3781. doi: 10.7717/peerj.3781.
- Ramakrishnan S, Docampo R. Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca²⁺ Homeostasis and Signaling. *Genes (Basel).* 2018. Jun;9(6):304. doi:10.3390/genes9060304
- Rana R, Sharma R, Kumar A. Repurposing of Fluvastatin against *Candida albicans* P450 lanosterol 14 α -demethylase, a target enzyme for antifungal therapy: An *In silico* and *In vitro* study. *Curr Mol Med.* 2019. May 19. doi: 10.2174/1566524019666190520094644.
- Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.* 2014. May 3;6:147-54. doi: 10.2147/CLEP.S44267.
- Rebello KM, Andrade-Neto VV, Gomes CRB, de Souza MVN, Branquinha MH, Santos ALS, Torres-Santos EC, d'Avila-Levy CM. Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy Against *Leishmania infantum* Infection: *In vitro* and *in*

- vivo* Approaches. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019. Jun 28;9:229. doi: 10.3389/fcimb.2019.00229.
- Rebello KM, Andrade-Neto VV, Zuma AA, Motta MCM, Gomes CRB, de Souza MVN, Atella GC, Branquinha MH, Santos ALS, Torres-Santos EC, d'Avila-Levy CM. Lopinavir, an HIV-1 peptidase inhibitor, induces alteration on the lipid metabolism of *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology.* 2018. Sep;145(10):1304-1310. doi: 10.1017/S0031182018000823.
- Reigada C, Sayé M, Valera-Vera E, Miranda MR, Pereira CA. Repurposing of terconazole as an anti *Trypanosoma cruzi* agent. *Heliyon.* 2019. Jun 12;5(6):e01947. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01947
- Rey L. *Parasitologia.* 2008. 4ª ed. Guanabara Koogan.
- Ridley DS, De Magalhaes AV, Marsden PD. Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. *J. Pathol.* 1989. Dez: 159, 293–299. doi: 10.1002/path.1711590406.
- Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990. Jan: 42, 51–55. doi: 10.4269/ajtmh.1990.42.51.
- Sardana D, Zhu C, Zhang M, Gudivada RC, Yang L, Jegga AG. Drug repositioning for orphan diseases. 2011. Jul;12(4):346-56. doi: 10.1093/bib/bbr021.
- Savarino A, Shytaj IL. Chloroquine and beyond: exploring anti-rheumatic drugs to reduce immune hyperactivation in HIV/AIDS. *Retrovirology.* 2015. Jun 18;12:51. doi: 10.1186/s12977-015-0178-0.
- Serafin MB, Hörner R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *Braz J Infect Dis.* 2018. May - Jun;22(3):252-256. doi: 10.1016/j.bjid.2018.05.007.
- Singh N, Kumar M, Singh R. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 2012. Jun;5(6):485-97. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60084-4.
- Sirim D, Wagner F, Lisitsa A, Pleiss J. The cytochrome P450 engineering database: Integration of biochemical properties. *BMC Biochem.* 2009. Nov 12;10:27. doi: 10.1186/1471-2091-10-27.
- Syed K, Mashele SS. Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse kingdom of fungi: identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family. *PLoS One.* 2014. Apr 17;9(4):e95616. doi: 10.1371/journal.pone.0095616.
- Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017. Jun 18;18(6). doi: 10.3390/ijms18061296.
- Sleire L, Førde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res.* 2017. Oct;124:74-91. doi: 10.1016/j.phrs.2017.07.013.
- Souza W. (Coord.). *Doenças negligenciadas.* Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.
- Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* 2015. Feb;16(2):237-52. doi: 10.1517/14656566.2015.973850

- Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, Boelaert M, Dujardin JC, Chakravarty J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis*. 2012. Aug;55(4):543-50. doi: 10.1093/cid/cis474
- Thakare R, Shukla M, Kaul G, Dasgupta A, Chopra S. Repurposing disulfiram for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2019. Jun;53(6):709-715. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.03.024.
- Thakur S, Daley B, Klubo-Gwiedzinska J. The role of the antidiabetic drug metformin in the treatment of endocrine tumors. *J Mol Endocrinol*. 2019. Jul 1. pii: JME-19-0083.R1. doi: 10.1530/JME-19-0083.
- Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, De Souza W. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 2013. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ.
- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017. May 26;6:750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002. Dez;186:1829–34. doi: 10.1086/345772.
- Walker VM, Kehoe PG, Martin RM, Davies NM. Repurposing antihypertensive drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a Mendelian randomization study. *Int J Epidemiol*. 2019. Jul 23. pii: dyz155. doi: 10.1093/ije/dyz155.
- Werck-Reichhart, D & Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 2000. Dec;1(6), REVIEWS3003. doi: 10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003
- WHO. Leishmaniasis – Epidemiological situation. 2016. [acesso em 22 Julho 2019]. Disponível em <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
- WHO. Global Health Observatory (GHO) data. Leishmaniasis. Situation and trends. 2017. [acesso em 22 Julho 2019]. Disponível em <https://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis/en/>
- WHO. Leishmaniasis – Key Facts. March 2019. [homepage na internet]. [acesso em 22 Julho 2019]. Disponível em <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 2018. Apr;145(4):464-480. doi: 10.1017/S0031182016002523.
- Valdivieso E, Mejías F, Carrillo E, Sánchez C, Moreno J. Potentiation of the leishmanicidal activity of nelfinavir in combination with miltefosine or amphotericin B. *Int J Antimicrob Agents*. 2018. Nov;52(5):682-687. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.016.
- Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1989. Set; 41, 280–288.

- Velloso, LAC. A capacidade inovadora da indústria farmacêutica brasileira e a relação com seu desempenho competitivo. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Administração de Empresas]. Pontifícia Universidade Católica (PUC-RJ). 2010.
- Verma S, Mehta A, Shaha C. CYP5122A1, a novel cytochrome P450 is essential for survival of *Leishmania donovani*. PLoS One. 2011. Sep;6(9):e25273. doi: 10.1371/journal.pone.0025273.
- Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Arch. Bras. Med. (1912). 1, 36–38.
- Vieira VMM, Ohayon P. (2006). Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. Revista Economia & Gestão, v.6, n.13.
- Yousfi H, Ranque S, Rolain JM, Bittar F. Repurposing of ribavirin as an adjunct therapy against invasive *Candida* strains: *In vitro* study. Antimicrob Agents Chemother. 2019. Jul 15. pii: AAC.00263-19. doi: 10.1128/AAC.00263-19.
- Zhang T, Wei D. Recent progress on structural bioinformatics research of cytochrome P450 and its impact on drug discovery. Adv Exp Med Biol. 2015. 827:327-39. doi: 10.1007/978-94-017-9245-5_19.
- Zhang QL, Lian DD, Zhu MJ, Li XM, Lee JK, Yoon TJ, Lee JH, Jiang RH, Kim CD. Antitumor Effect of Albendazole on Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (SCC) Cells. Biomed Res Int. 2019. Jun 9;2019:3689517. doi: 10.1155/2019/3689517.

Anexo 1: Artigo publicado