



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



BRUNO CRUZ DE SOUZA

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE INIBIDORES
ALOSTÉRICOS PARA A SUPERÓXIDO DISMUTASE DE
*Leishmania braziliensis***

Feira de Santana, BA
2025

BRUNO CRUZ DE SOUZA

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE INIBIDORES
ALOSTÉRICOS PARA A SUPERÓXIDO DISMUTASE DE
*Leishmania braziliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Franco Henrique Andrade Leite
Coorientadora: Profa. Dra. Thamires Quadros Froes

Feira de Santana, BA
2025

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Souza, Bruno Cruz de
S713p Planejamento e avaliação de inibidores alostéricos para a superóxido
dismutase de *Leishmania braziliensis* / Bruno Cruz de Souza. - 2025.
133f.: il.

Orientador: Franco Henrique Andrade Leite.
Coorientadora: Thamires Quadros Froes
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Superóxido dismutase. 3. Thermofluor.
I. Leite, Franco Henrique Andrade, orient. II. Froes, Thamires Quadros,
coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 616.993.161:577.15

BRUNO CRUZ DE SOUZA

**“PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE INIBIDORES ALOSTÉRICOS PARA A
SUPERÓXIDO DISMUTASE DE *Leishmania braziliensis*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 31 de março de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE**
Data: 31/03/2025 13:37:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. **Franco Henrique Andrade Leite**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO HABIB BECHELANE MAIA**
Data: 02/04/2025 09:58:17-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Eduardo Habib Bechelane Maia**

CEFET

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO SILVA ANDRADE**
Data: 04/04/2025 04:35:56-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Bruno Silva Andrade**

UESB

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL LUCIANO FALKOSKI**
Data: 03/04/2025 08:49:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Daniel Luciano Falkoski**

UFSJ

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL GEDDER SILVA**
Data: 02/04/2025 18:44:51-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Daniel Gedder Silva**

USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Elieci Cruz e Geraldo Souza pelo amor e cuidado e ao meu irmão Elyaldo Cruz pelo incentivo e encorajamento. Não existe semente de sonho em mim que não tenha sido regada por vocês.

Ao meu orientador Franco Henrique e a minha coorientadora Thamires Quadros pelo suporte constante.

Ao professor Marcelo Castilho e suas alunas Marina Sena e Ariane Melo, do Laboratório de Cristalização Macromolecular (LACRIMA-UFBA) pela receptividade e cooperação.

Ao professor Humberto Fonseca (UEFS) por suas valiosas contribuições.

Aos professores Rogério Mercês e Raquel Benevides do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM-UEFS) pela disponibilidade. Aos funcionários e técnicos do LAPEM-UEFS, principalmente a Gorete.

Aos Laboratórios de Modelagem Molecular (LMM-UEFS), de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON-UEFS), de Toxicologia (UEFS) e de Fitoquímica (UEFS) pela assistência.

Aos colegas pós-graduandos que acompanhei nessa jornada, pelos risos em momentos de incertezas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

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

“It’s not what’s in front but who’s beside you / It’s all that came before and what it provides you / All those that held the line / Who wouldn’t bow down and resign / It’s not the waking, it’s the rising / Power has been cried by those stronger than me / Straight into the face that tells you to rattle your chains if you love being free”
(Hozier – Nina Cried Power)

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada por protozoários do gênero *Leishmania spp.* e responsável por cerca de 30 mil mortes anuais. Dentre as suas apresentações, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um problema relevante de saúde pública no Brasil, sendo a *Leishmania braziliensis* o principal agente etiológico no país. Apesar do impacto epidemiológico, o tratamento farmacológico da doença é limitado pelo surgimento de cepas resistentes, eficácia espécie-dependente e alto perfil de efeitos adversos graves. Dentre os alvos biológicos em *Leishmania spp.*, a enzima ferro superóxido dismutase (SOD) se destaca devido ao seu papel crucial na via antioxidante e na garantia de sobrevivência do parasito, tendo sua relevância validada em ensaios genéticos e químicos. Assim, o trabalho teve como objetivo a obtenção de superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis* (LbSOD) através da clonagem, expressão e purificação da enzima, além da priorização de sítios e inibidores alostéricos nesta isoforma através de técnicas computacionais. A atividade de inibidores alostéricos para a superóxido dismutase de *Leishmania* priorizados nas etapas *in silico* foi avaliada frente a LbSOD através de ensaios de deslocamento térmico (ThermoFluor®). Adicionalmente, a estabilidade e o perfil de interação dos complexos inibidores-LbSOD foram avaliados através de rotinas de dinâmica molecular, caracterizando o perfil de interação dos complexos ligante-macromolécula.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, ThermoFluor, Superóxido dismutase.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease (NTD) caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp., responsible for about 30,000 annual deaths. Among its clinical forms, american cutaneous leishmaniasis (ACL) is a relevant public health problem in Brazil, with *Leishmania braziliensis* being its main etiological agent in the country. Despite its epidemiological impact, the pharmacological treatment for the disease is limited by the emergence of resistant strains, species-dependent efficacy and serious adverse effects. Within the biological targets in *Leishmania* spp., the enzyme iron superoxide dismutase (SOD) stands out due to its crucial role in the antioxidant pathway and in ensuring the parasite's survival, and its relevance is validated through genetic and chemical assays. The objective of this work was to obtain superoxide dismutase from *Leishmania braziliensis* (LbSOD) through cloning, expression and purification, while also prioritizing allosteric sites and inhibitors through computational methods. The activity of allosteric inhibitors for superoxide dismutase from *Leishmania* which were previously identified by computational techniques was evaluated against LbSOD through thermal displacement assays (ThermoFluor®). Additionally, the stability and interaction profile of the inhibitor-LbSOD complexes was evaluated using molecular dynamics routines, characterizing the interaction profiles of the complexes.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, ThermoFluor, Superoxide dismutase

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Distribuição mundial de leishmaniose cutânea no ano de 2020.....	2
Figura 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose	3
Figura 3. Atividade da SOD no ciclo de vida dos parasitos <i>Leishmania</i>	6
Figura 4. Alinhamento sequencial entre a MnSOD humana (NCBI: NP_000627.2) e a FeSOD de <i>Leishmania braziliensis</i> (NCBI: XP_001567555.1) realizado no servidor Clustal Omega (identidade global = 36%).....	7
Figura 5. Inibidores de LbSOD caracterizados por Martin-Montes e colaboradores (2017), junto aos seus valores de IC ₅₀ para promastigotas, amastigotas e macrófagos.....	8
Figura 6. Inibidores de TcSOD (Olmo et al., 2015) e PfSOD (Soulère et al., 2003) junto aos seus valores de IC ₅₀	9
Figura 7. Representação esquemática do ensaio de deslocamento térmico (curva de fluorescência versus temperatura). ΔT_m = temperatura média onde 50% da proteína está desenovelada	12

CAPÍTULO 1

Fig. 1 Multiple sequence alignment of superoxide dismutase enzymes in Dataset A. The top bar displays the residue conservation ratio (shades of red), while the residue numbering is indicated at the bottom. The PDB IDs are listed on the right-hand side. The dendrogram highlights the major SOD families. The figure was created using the Bio3D module, as available in RStudio.	24
Fig. 2 Multiple sequence alignment of superoxide dismutase enzymes in Dataset B. The top bar displays the residue conservation ratio (shades of red), while the residue numbering is indicated at the bottom. The PDB IDs are listed on the right-hand side. The dendrogram highlights the major SOD families. The figure was created using the Bio3D module, as available in RStudio.	26
Fig. 3 Structural comparison of SOD structures within Dataset A. [A] Superposition of aligned SOD structures upon the core (red). Protein structures are displayed as cartoon (smooth loops) and ions are shown in spheres; [B] Dendrogram based on principal component analysis that show the SOD families identified by colors: human SOD1 and SOD3 are shown in black, human SOD2 in pink and trypanosomatids SODs are shown in green. [C] Score plot for the SOD families and [D] Loading plot for the principal components.	28
Fig. 4 Graphical representations (cartoon) of the representative structures of superoxide dismutase enzymes. [A] <i>Leishmania major</i> SOD (PDB: 4F2N); [B] <i>Trypanosoma cruzi</i> SOD (PDB: 2GPC);	

[C] *Trypanosoma brucei* SOD (PDB: 3ESF); [D] *Homo sapiens* SOD2 (PDB: 5T30); [E] *Homo sapiens* SOD3 (PDB: 2JLP); [F] *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V)..... 28

Fig. 5 Active sites of [A] *Leishmania major* FeSOD (PDB:4F2N, purple) and [B] *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V, yellow), showing the main residues (in sticks) involved in the stabilization of the metal ions. The Fe and Cu ions are shown as orange spheres, and the Zn ion is shown as a violet sphere. 30

Fig. 6 FTMap consensus sites (CS) found for the trypanosomatids' representative structures of SODs. The consensus sites and their probes are shown in colored sticks. Their PDB code, organism and number of probes per CS is shown on the right of their cartoon representation..... 31

Fig. 7 FTMap consensus sites (CS) found for the human representative structures of SODs. The consensus sites and their probes are shown in colored sticks. Their PDB code, organism and number of probes per CS is shown on the right of their cartoon representation..... 32

Fig. 8 Distribution of hotspots (mesh) on the surface of LmSOD (PDB ID: 4F2N; purple), TcSOD (PDB ID: 2GPC; brown) and TbSOD (PDB ID: 3ESF; violet) according to DrugPy. The druggable and druggable-small hotspots are shown in red and the borderline-druggable and borderline-druggable-small hotspots are shown in salmon. The SODs are depicted in cartoon and the metal (Fe) is depicted in orange spheres..... 34

Fig. 9 Distribution of hotspots (mesh) on the surface of HsSOD2 (PDB ID: 5T30; blue), HsSOD3 (PDB ID: 2JLP; green) and HsSOD1 (PDB ID: 2C9V; green) according to DrugPy. The druggable and druggable-small hotspots are shown in red and the borderline-druggable and borderline-druggable-small hotspots are shown in salmon. The SODs are depicted in cartoon and the metals are shown in spheres (Mn/Zn in purple, Cu in orange). 36

Fig. 10 Example of how DrugPy hotspots were used to generate pockets which accommodates the residues that interact with the probes. A druggable pocket of LmSOD (PDB:4F2N) is shown on the right side, with its constituent residues. 38

Fig. 11. Graphical representation of the region of the pockets on TcSOD (PDB:2GPC) vs TbSOD (PDB: 3ESF), which share similarity (PocketMatch's P-max > 0.6). Druggable sites are shown in red-colored meshes and borderline-druggable hotspots are shown in salmon-colored meshes. The average of the P-max values (0.83) is shown on the bottom of the picture. 40

Fig. 12. Sequential alignment of the unique overlapping pockets (P-max > 0.6) of TcSOD (PDB:2GPC) vs TbSOD (PDB: 3ESF). On the bottom line, the low consensus (>50%) residues are presented in blue, while the high consensus residues (>90%) are shown in red. 41

Fig. 13. Graphical representation of the region of the pockets on HsSOD2 (PDB: 5T30)/LmSOD (PDB: 4F2N)/TcSOD (PDN: 2GPC)/TbSOD (PDB: 3ESF), which share similarity (PocketMatch's P-max > 0.6). Druggable sites are shown in red-colored meshes and borderline-druggable hotspots

are shown in salmon-colored meshes. The average of the P-max values (0.7) is shown on the bottom of the picture.	42
Fig. 14. Sequential alignment of the unique overlapping pockets (P-max > 0.6) of HsSOD2 (PDB: 5T30)/LmSOD (PDB: 4F2N)/TcSOD (PDN: 2GPC)/TbSOD (PDB: 3ESF). On the bottom line, the low consensus (>50%) residues are presented in blue, while the high consensus residues (>90%) are shown in red.	43
Fig. 15. Graphical representation of the region of the pockets on HsSOD3 (PDB: 2JLP) vs HsSOD1 (PDB: 2C9V), which share similarity (PocketMatch's P-max > 0.6). Druggable sites are shown in red-colored meshes and borderline-druggable hotspots are shown in salmon-colored meshes. The average of the P-max values (0.64) is shown on the bottom of the picture	44
Fig. 16. Sequential alignment of the unique overlapping pockets (P-max > 0.6) of HsSOD3 (PDB: 2JLP) vs HsSOD1 (PDB: 2C9V). On the bottom line, the low consensus (>50%) residues are presented in blue, while the high consensus residues (>90%) are shown in red.	45
Fig. 17 Graphical representations (cartoon) of the Allosite pockets on the representative structures of superoxide dismutase enzymes. [A] <i>Leishmania major</i> SOD (PDB: 4F2N); [B] <i>Trypanosoma brucei</i> SOD (PDB: 3ESF); [C] <i>Homo sapiens</i> SOD2 (PDB: 5T30); [D] <i>Homo sapiens</i> SOD3 (PDB: 2JLP); [E] <i>Homo sapiens</i> SOD1 (PDB: 2C9V).	46

CAPÍTULO 2

Figura 1: Compostos de origem sintética utilizados no estudo (C01-C10), junto aos seus valores de massa molecular (MM) e sobreposição ao modelo farmacofórico (QFIT). Características do modelo farmacofórico: hidrofóbico (ciano), doador (rosa) e aceptor (verde) de ligações de hidrogênio. Compostos são apresentados em cinza (carbono).	76
Figura 2: Compostos oriundos de produtos naturais (C11, C13 e C16) utilizados no estudo, junto as suas poses de acoplamento frente a LbSODB2 e aos respectivos valores de pontuação Vina, pontuação CNN (gnina) e massa molecular (MM). O sítio alostérico predito para tripanossomatídeos é apresentado em <i>mesh</i> vermelho, sobreposto a proteína em <i>cartoon</i> roxo.	78
Figura 3: Gráfico de mediana e amplitude interquartil das triplicatas do ensaio de concentração única (100µM) para compostos sintéticos (C01-C10) frente a LbSODB2. Compostos com ΔTm médio > 0°C são representados em barras coloridas.	84
Figura 4: Gráfico da média da variação de ΔTm no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400µM) para o composto C04 frente a LbSODB2.	85

Figura 5: Gráfico de mediana e amplitude interquartil das triplicatas do ensaio de concentração única (100 μ M) para compostos do catálogo II frente a LbSODB2. Compostos com ΔT_m médio > 0°C são representados em barras coloridas.	86
Figura 6: Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (5 concentrações; 0 - 50 μ M) para o composto C11 frente a LbSODB2.	87
Figura 7: Gráfico de deslocamento térmico para os compostos [A] C04 e [B] C11 frente a LbSODB2, obtido no servidor Thermott, junto aos seus respectivos valores de constante de dissociação (K_d) e constante de ligação (K_b). A esquerda: gráficos de fluorescência dos poços analisados vs temperatura, a direita: gráficos de concentração de ligante versus temperatura de desenovelamento (°C).	88
Figura 8: Estruturas representativas dos sistemas de DM para [A] LbSODB2 APO ($t = 36,50$ ps); [B] C04-LbSODB2 ($t = 88,70$ ps); e [C] C11-LbSODB2 (54.65 ps). LbSODB2 é apresentada em formato <i>cartoon</i> e C04/C11 são representados em <i>sticks</i> (C04 = carbonos em cor amarela; C11 = carbonos em cor púrpura).	90
Figura 9: Gráfico de RMSD para os sistemas APO, C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2 durante o tempo de simulação das DMs (10000ps = 100ns).	91
Figura 10: Gráfico de RMSF para os sistemas APO, C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2 durante o tempo de simulação das DMs (10000ps = 100ns).	92
Figura 11: Estrutura representativa do sistema APO de C04-LbSODB2, com a região correspondente à faixa de átomos 2400-2800 destacada em vermelho.	93
Figura 12: Gráfico de energia para os sistemas APO, C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2 durante o tempo de simulação das DMs (10000ps = 100ns).	94
Figura 13: Sítio ativo da LbSODB2 (representada em forma <i>cartoon</i> , cor branca). Os resíduos do sítio ativo estão representados em <i>sticks</i> de cor verde (carbono). Os íons ferro são representados por esferas laranja.....	97
Figura 14: Gráfico de análise MM/PBSA para o complexo C04-LbSODB2. ΔG_{GAS} e seus constituintes estão representados em rosa, ΔG_{SOLV} e seus constituintes apresentados em azul, e a energia entrópica total (ΔT_{TOTAL}) em amarelo.....	99
Figura 15: Gráfico de contribuição entálpica (ΔH) por resíduo para o complexo C04-LbSODB2 e representação 3D dos resíduos envolvidos coloridos com base na contribuição energética.	100
Figura 16: Gráfico de análise MM/PBSA para o complexo C11-LbSODB2. ΔG_{GAS} e seus constituintes estão representados em rosa, ΔG_{SOLV} e seus constituintes apresentados em azul, e a energia entrópica total (ΔT_{TOTAL}) em amarelo.....	101
Figura 17: Gráfico de contribuição entálpica (ΔH) por resíduo para o complexo C11-LbSODB2 e representação 3D dos resíduos envolvidos coloridos com base na contribuição energética.	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 Summary of the number of occurrences of SOD pockets' similarities found through PocketMatch.....	39
Table 2 Characteristics of the allosteric sites found on the SOD representatives. The pockets column contains their PDB code, and the table shows their volume (Å ³), SASA, (Å ²), Druggability score and allosteric probability (%).	47
Table 3 Values of similarity (P-max > 0.6) calculated for the Allosite pockets on Pocketmatch. ...	48

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Listagem das ligações de hidrogênio no composto C04-LbSOB2 durante a rotina de DM, discriminadas em átomo doador e aceptor, contagem de aparições e porcentagem de permanência.	95
Tabela 2: Listagem das ligações de hidrogênio no composto C11-LbSOB2 durante a rotina de DM, discriminadas em átomo doador e aceptor, contagem de aparições e porcentagem de permanência.	96
Tabela 3: Listagem comparativa dos principais marcadores ADMET calculados para C04 e C11 no servidor ADMETlab.	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Dinâmica molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doença tropical negligenciada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/Síndrome da imunodeficiência adquirida
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
Kb	Constante de ligação
Kd	Constante de dissociação
LbSOD	Superóxido dismutase de <i>Leishmania braziliensis</i>
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MM/PBSA	<i>Molecular Mechanic/Poisson-Boltzmann Surface Area</i> , Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Análise de componentes principais
PfSOD	Superóxido dismutase de <i>Plasmodium falciparum</i>
QFIT	<i>Query fit</i> , Sobreposição à busca em modelo farmacofórico
RMSD	Desvio padrão médio quadrático
RMSF	Flutuação da raiz média quadrática
SOD	Superóxido dismutase
TcSOD	Superóxido dismutase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEV	Vírus da corrosão do tabaco
Tm	Temperatura de desnaturação
TSA	<i>Thermal shift assay</i> , ensaio de deslocamento térmico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS	1
REFERÊNCIAS.....	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2.1. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE: SUPERÓXIDO DISMUTASE	6
2.2. ALOSTERISMO E INIBIÇÃO ALOSTÉRICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM PARASITOS.....	9
2.3. QUÍMICA MEDICINAL, PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS.....	10
2.3.1. Técnicas <i>in silico</i> para priorização de inibidores alostéricos	10
2.3.2. Ensaios de deslocamento térmico (ThermoFluor)	11
REFERÊNCIAS.....	13
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO 1	19
1. Introduction.....	20
2. Methods.....	22
2.1 Superoxide dismutase dataset approaches and final sampling.....	22
2.2 Alignment and clustering of superoxide dismutase structures.....	22
2.3 FTMap hotspot predictions and Pocketmatch similarity analysis	22
2.4 Allosite allosteric sites prediction and Pocketmatch similarity analysis.....	23
3. RESULTS AND DISCUSSION	23
3.1 Analyses of superoxide dismutase datasets.....	23
3.2 Dataset A Bio3D analysis.....	27
3.3 FTMap routines and pockets druggability prediction with DrugPy.....	29
3.4 Druggability assessment of Trypanosomatids and Human SODs.....	33
3.5 PocketMatch calculations for the superoxide dismutase pockets on DrugPy	38
3.6 PocketMatch calculations for the Superoxide dismutase pockets on Allosite.....	46
Conclusion	48
References	48
Supplementary Material.....	54
CAPÍTULO 2	72
1. INTRODUÇÃO.....	74
2. MATERIAIS E MÉTODOS	75
2.1. CONJUNTO DE COMPOSTOS ANALISADOS FRENTE A LBSODB2	75

2.2. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LBSODB2	79
2.3. ENSAIOS DE DESLOCAMENTO TÉRMICO (THERMOFLUOR)	79
2.4. ANÁLISE DE DADOS E DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (KD) DOS COMPOSTOS	80
2.5. ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR	80
2.6. ITENS DE AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS DE DM	81
2.7. CARACTERIZAÇÃO FARMACOCINÉTICA E TOXICOLÓGICA DOS MODULADORES DE SOD	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS POTENCIAIS MODULADORES ALOSTÉRICOS DE LBSODB2 POR DESLOCAMENTO TÉRMICO	83
3.1.1. Compostos de origem sintética (C01-C10)	83
3.1.2. Compostos oriundos de produtos naturais (C11, C13 e C16)	85
3.2. ESTIMATIVA DE CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO POR DESLOCAMENTO TÉRMICO (THERMOTT)	87
3.3. ROTINAS DE DINÂMICA MOLECULAR	89
3.4. CÁLCULO DA CONTRIBUIÇÃO ENTÁLPICA PARA AS ENERGIAS DE LIGAÇÃO ATRAVÉS DO MM/PBSA	98
3.5. AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA E DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS C04 E C11	102
4. CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	105
MATERIAL SUPLEMENTAR	110

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) correspondem ao grupo de doenças infecciosas com baixa incidência em sociedades desenvolvidas, mas que persistem nos países subdesenvolvidos e que, por falta de tratamento adequado, resultam em incapacitações e estigmas sociais, e em alguns casos óbitos, representando impacto social e econômico direto (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2020)

Embora apresentem mortalidade e morbidade anuais comparáveis às doenças de incidência global como câncer, diabetes, vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), cardiopatias e doenças neurológicas, as DTNs ainda enfrentam pouco avanço no seu perfil epidemiológico e de tratamento. Parte desse panorama se justifica pelo desinteresse da indústria farmacêutica em buscar novas alternativas terapêuticas para doenças que se concentram em países com pouca possibilidade de retorno financeiro (RIVERA; PATEL; BANDYOPADHYAY, 2021).

A leishmaniose, embora considerada uma das três maiores DTNs de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), continua muito pouco pesquisada e recebe recursos escassos para projetos de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos quando comparadas com outras doenças como malária, tuberculose e HIV/AIDS (CHOI et al., 2021; SALAM; AL-SHAQHA; AZZI, 2014). A parasitose, originária de protozoários do gênero *Leishmania*, é endêmica em cerca de 98 países e tem abrangência de mais de 350 milhões de pessoas em situação de risco (JONES; WELBURN, 2021). Aproximadamente 1,3 milhões de novos casos são reportados anualmente com uma taxa de 30 mil mortes por conta dos agravos da doença (HERNÁNDEZ-BOJORGE et al., 2020; SHMUELI; BEN-SHIMOL, 2024).

A doença é prevalente em todos os continentes, exceto Antártida e Oceania (Figura 1), e é considerada a terceira parasitose mais comum depois da esquistossomose e da malária, com base no número de anos de vida perdidos por incapacidade (do inglês, *Disability Adjusted Live Years*) (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017)

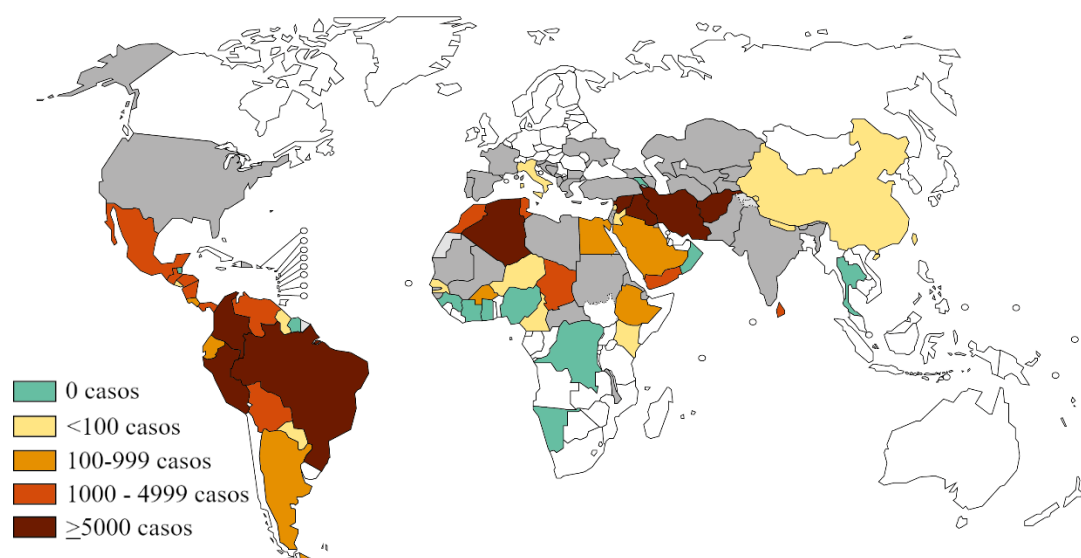


Figura 1. Distribuição mundial de leishmaniose cutânea no ano de 2022

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2025 (adaptado)

Os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, incluindo uma grande diversidade de espécies de *Leishmania*, vetores (hospedeiros invertebrados) e reservatórios (hospedeiros vertebrados). No Brasil, oito espécies de *Leishmania* são catalogadas, porém se destacam as espécies *Leishmania chagasi* (principal responsável pela forma visceral) e *Leishmania braziliensis* (principal responsável pelas formas cutânea e mucocutânea) (ANVERSA et al., 2018). Enquanto a leishmaniose (muco)cutânea gera cicatrizes que são desfigurantes e causam estigmatização social, a leishmaniose visceral é a sua forma mais severa e se caracteriza por febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso, com a possibilidade de evolução a óbito (BILGIC-TEMEL; MURRELL; UZUN, 2019).

Os fármacos de primeira escolha no tratamento de pacientes com Leishmaniose são o estibogluconato de sódio, antimoniato de N-metilglucamina e a miltefosina, e os de segunda escolha (ou de associação) são a anfotericina B e a pentamidina (Tabela 1) (ANVERSA et al., 2018).

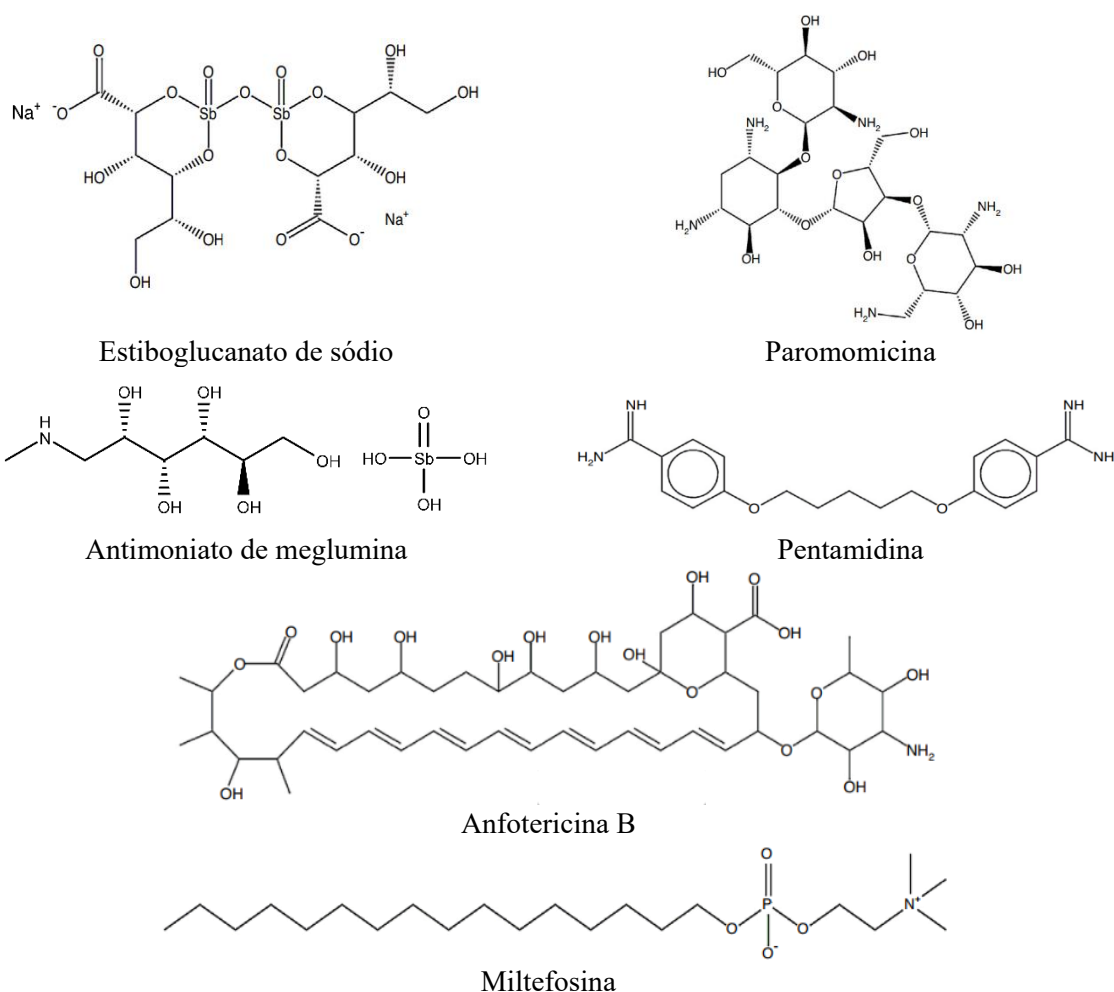


Figura 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose
Fonte: Adaptado de Zulficar; Shelper; Avery, (2017)

Em comparação a outras doenças, o tratamento medicamentoso da leishmaniose é caro, variando de 30 a 1500 dólares americanos por paciente, sendo esse um fator que dificulta a difusão do tratamento, já que é uma patologia de maior abrangência em países pobres (OKWOR; UZONNA, 2016). No Brasil, o levantamento de Carvalho e colaboradores (2021) junto ao ministério da Saúde evidencia o alto valor da terapia, sendo que o antimoniato de meglumina requer 167,66 dólares por paciente, seguido por miltefosina (USD 259,92), e anfotericina B lipossomal (715,35 dólares), sendo o valor do regime de 30 dias para o antimoniato de meglumina equivalente ao triplo da soma dos custos do regime ambulatorial envolvendo consultas médicas e administração de medicamentos e exames complementares ao paciente.

Adicionalmente, a farmacoterapia para tratamento de pacientes com leishmaniose apresenta desvantagens que restringem o seu sucesso clínico. Os fármacos comumente utilizados nos esquemas de tratamento (antimoniais pentavalentes, anfotericina B, milfetosina e paromomicina) apresentam eficácia limitada e efeitos adversos graves por conta da sua alta toxicidade e período extenso de

tratamento. Somado a isso, de todos os fármacos utilizados, apenas a miltefosina é administrada por via oral, o que reduz a adesão dos pacientes ao tratamento. O surgimento de cepas resistentes a antimoniais e variações de suscetibilidade de várias cepas já são observadas. Coletivamente, esses fatores contribuem para falha terapêutica na prática clínica (ALCÂNTARA et al., 2018). Diante desse panorama, é evidente a necessidade do surgimento de novas alternativas terapêuticas para o combate a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, L. M. et al. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430–439, 28 set. 2018.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.-A. et al. Overcoming the global burden of neglected tropical diseases. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, p. 2049936120966449, 2020.

ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 281–289, mar. 2018.

BILGIC-TEMEL, A.; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 5, n. 3, p. 158–165, jul. 2019.

CARVALHO, J. D. P. et al. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e04542020, 2021.

CHOI, H. L. et al. The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009181, 18 fev. 2021.

HERNÁNDEZ-BOJORGE, S. E. et al. Epidemiology of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Nicaragua. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 11, p. e00192, 1 nov. 2020.

JONES, C. M.; WELBURN, S. C. Leishmaniasis Beyond East Africa. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, mar. 2016.

RIVERA, G.; PATEL, N. B.; BANDYOPADHYAY, D. Editorial: Discovery and Development of Drugs for Neglected Diseases: Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis, and Leishmaniasis. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 775327, 7 out. 2021.

SALAM, N.; AL-SHAQHA, W. M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3208, 2 out. 2014.

SHMUELI, M.; BEN-SHIMOL, S. Review of Leishmaniasis Treatment: Can We See the Forest through the Trees? **Pharmacy**, v. 12, n. 1, p. 30, fev. 2024.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, out. 2017.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE: SUPERÓXIDO DISMUTASE

Nos tripanossomatídeos, cujo sistema de defesa antioxidante é também composto por ascorbato peroxidase (E.C: 1.11.1.11), tripanotiona redutase (E.C: 1.8.1.12) e triparedoxina peroxidase (E.C.: 1.11.1.-) (CASTRO et al., 2010; HANDY; LOSCALZO, 2012) a detoxificação dos radicais superóxidos é realizada primariamente pela superóxido dismutase (SOD), que atua como primeira enzima da via promovendo a dismutação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), fornecendo proteção primária e essencial contra o estresse oxidativo (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). Assim, a superóxido dismutase é um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania (Figura 3).

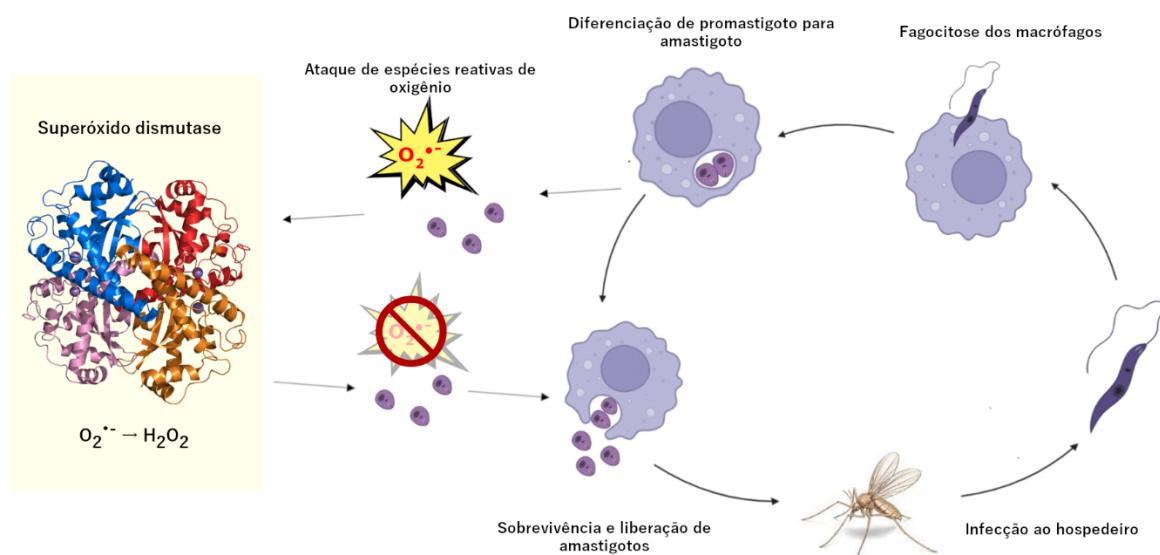
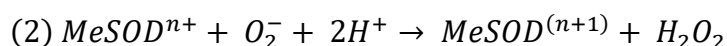
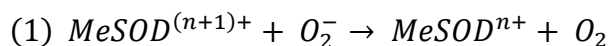


Figura 3. Atividade da SOD no ciclo de vida dos parasitos *Leishmania*
Fonte: Reproduzido e alterado de Fernandes (2023) com permissão

As superóxido-dismutases (E.C.: 1.15.1.1) são uma família de metaloproteínas que se diferenciam com base no metal presente no seu sítio ativo (cobre e zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe)). A enzima CuZn-SOD é expressa principalmente em eucariotos, bactérias e cloroplastos. A Mn-SOD pode ser encontrada em procariotos e mitocôndrias de eucariotos, enquanto que a Fe-SOD encontra-se em bactérias, protistas e cloroplastos de plantas (LI et al., 2015) (SHENG et al., 2014).

As reações realizadas pela superóxido dismutase são representadas pelas equações 1 e 2:



em que: “Me” correspondente ao íon metálico inerente a enzima SOD e “n” o número de elétrons da camada de valência do metal (MILLER, 2004).

Apesar da enzima superóxido dismutase estar presente tanto no parasita quanto no ser humano, a baixa similaridade entre suas sequências possibilita a identificação de substâncias que inibam seletivamente a enzima do parasita. Quando comparadas, as sequências da MnSOD humana, que é a isoforma mais similar a FeSODs no geral, e a FeSOD de *Leishmania braziliensis*, uma similaridade de 36% é reportada no servidor Clustal Omega (MADEIRA et al., 2024) (Figura 4).

NP_000627.2	MLSRVCGTSRQLAPVLGYLGSRQKHSLPDLPYDYGALEPH-INAQIMQLHHSKHHAAYV	59
XP_001567555.1	-----MPFCAQALPYDYGALSSKGISKDQVTCHYEKKHKGIV	37
	.. *****. : *. : : *.*** **	
NP_000627.2	NNLVNTEEKYQEALAKGDVTAQIALQPALKFNGGGHINHSIFWTNLSPNGGEPKGEELLE	119
XP_001567555.1	AKLNAAESNSEVSSKSLEEVIRTMSGPMFNAAQIFNHDFYWKSMSPSGGEPSCCKVAS	97
	:**.: *. *. :*. . :.: : .. :**.:*.:**.*****. :. .	
NP_000627.2	AIKRDFGSFDFKFKELTAASVGVQSGSGWGLGFNKERGHLQIAACPNQDPLQGTGLIPL	179
XP_001567555.1	AISESFGSFARFKEEFTNAAVGHFGSGWVWLKDKSSCKLKVYQTHDAGCPLTDPNLVPL	157
	...* :***:~* *~** **** ** :*. :~: : . . :~**	
NP_000627.2	LGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYLKAIWNVINWENVTERYMACKK 222	
XP_001567555.1	LACDVWEHAYYIDYKNDRAAYVNSWWSLVNWDFASSQL----- 195	
	*. *****:~*** * *~:~* *~:~** :.~:	

Figura 4. Alinhamento sequencial entre a MnSOD humana (NCBI: NP_000627.2) e a FeSOD de *Leishmania braziliensis* (NCBI: XP_001567555.1) realizado no servidor Clustal Omega (identidade global = 36%).

Legenda: “*” = resíduos idênticos; “:” = resíduos similares; “.” = resíduos não conservados, “-” = resíduos ausentes

A importância da SOD para a sobrevivência dos tripanossomatídeos é experimentalmente validada. Mitra e colaboradores (2017) identificaram em ensaios biológicos que a superóxido dismutase de *L. amazonensis*, além de proteger do estresse oxidativo, coordena mecanismos mediados por radicais livres no parasito que desencadeiam a diferenciação dos micro-organismos em formas infectantes. Adicionalmente, estudos de Oliveira e colaboradores (2019) direcionados a superóxido dismutase de *L. braziliensis* demonstraram que tanto a inibição da enzima (com o quelante dietilditiocarbamato) quanto o uso de um mimetizador de atividade da superóxido dismutase (Tempol) resultaram na diminuição da porcentagem de células infectadas e da carga de parasitos, o que reforça a conclusão de que, embora ainda não elucidados completamente, existem mecanismos mediados por radicais livres no parasito nos quais o papel da enzima é essencial. Logo, os estudos com a superóxido dismutase norteiam a busca de uma nova alternativa terapêutica mais seletiva e eficaz por se tratar de um alvo biológico multifator.

O desenho racional de inibidores de enzimas frequentemente depende da mimetização do substrato ou de um estado de transição da reação catalisada pela enzima. No entanto, no caso das

SODs, o substrato (O_2^-) é um ânion pequeno e altamente reativo, assim limitando o escopo de inibidores competitivos estruturalmente relacionados. Consequentemente, as pesquisas têm se baseado principalmente na triagem aleatória de bibliotecas químicas para identificar inibidores de SOD para parasitos.

Por exemplo, Martin-Montes e colaboradores (2017) utilizaram compostos sintéticos baseados no núcleo arilaminocetona para testes frente a FeSOD de *Leishmania braziliensis* (LbSOD), além de uma avaliação de toxicidade em macrófagos, com a obtenção de valores de IC₅₀ que indicam que a atividade dos compostos não inviabiliza células de defesa na mesma proporção (Figura 5).

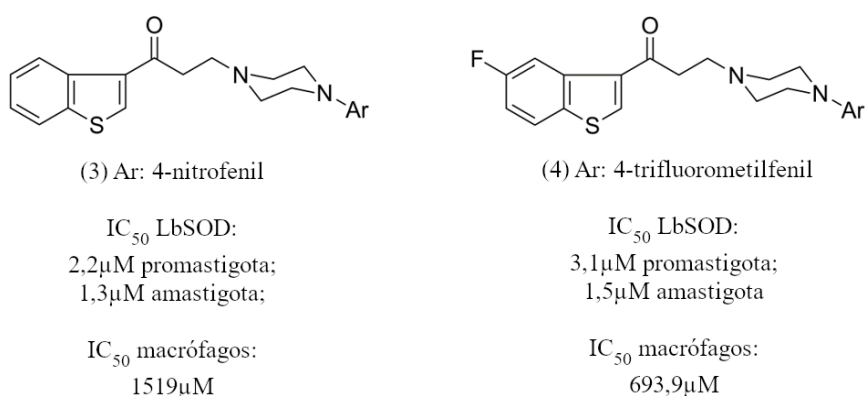


Figura 5. Inibidores de LbSOD caracterizados por Martin-Montes e colaboradores (2017), junto aos seus valores de IC₅₀ para promastigotas, amastigotas e macrófagos
Fonte: Martin-Montes et al., (2017)

De forma similar para SODs de outros parasitos, Olmo e colaboradores (2015) apresentam um inibidor de SOD de *Trypanosoma cruzi* (TcSOD) derivado de hidroxitalazinas, que apresenta IC₅₀ de 27µM para TcSOD e de 163µM para SOD de *Homo sapiens* (HsSOD), enquanto Soulère e colaboradores (2003) relataram inibição da SOD de *Plasmodium falciparum* (PfSOD) com IC₅₀ entre 27 a 37µM (Figura 6).

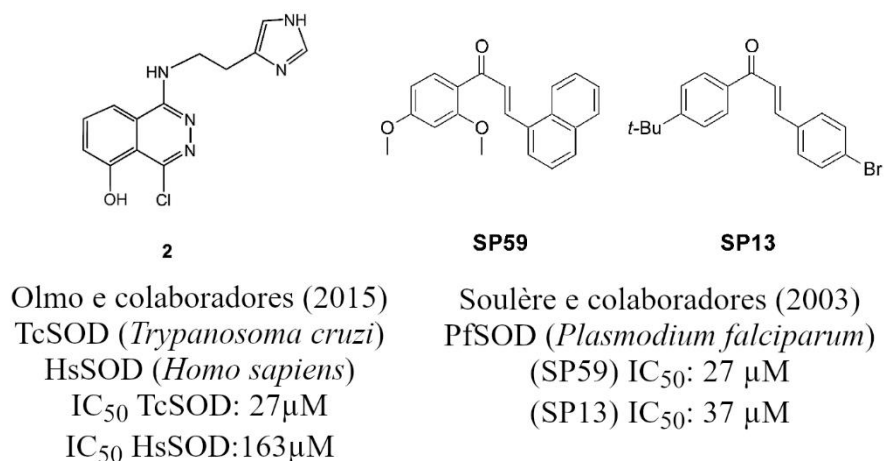


Figura 6. Inibidores de TcSOD (Olmo et al., 2015) e PfSOD (Soulère et al., 2003) junto aos seus valores de IC₅₀
Fonte: Olmo et al., (2015); Soulère et al., (2003)

Os compostos acima descritos, embora caracterizados como inibidores de SOD, não apresentam detalhamento de mecanismo de ação ou são compostos quelantes, que não são adequados para uma evolução de proposta terapêutica. Nessa perspectiva, o estudo do alvo levando em consideração as formas possíveis de modulação (no caso das SODs, modulação alostérica) são importantes para nortear a pesquisa de novos inibidores e melhor elucidar as interações ligante-macromolécula.

2.2. ALOSTERISMO E INIBIÇÃO ALOSTÉRICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM PARASITOS

O alosterismo ou modulação alostérica, nomenclatura derivada das palavras gregas “*allos*” (outro) e “*stereos*” (sólido/objeto), é o termo utilizado para definir os mecanismos de interação indireta entre sítios especificamente distintos do ponto de vista estérico, que são mediados por uma mudança conformacional em uma proteína (CHANGEUX, 2013). O conceito desse tipo de interação ganhou popularidade após a publicação de Monod, Changeux e Jacob (1963), que evidencia o fato de que a atividade biológica de várias proteínas é controlada por metabólitos que não interagem diretamente com o sítio de atividade primária (sítio ortostérico), nem com os substratos ou seus produtos reacionais. Desde então, o conceito se expandiu e a modulação alostérica é considerada uma propriedade inerente a várias proteínas e macromoléculas biologicamente relevantes, abrangendo desde o controle de mecanismos de metabolismo até a regulação de cascatas de transdução de sinais (CHATZIGOULAS; COURNIA, 2021).

Entre as vantagens do estudo da modulação alostérica, estão a possibilidade de maior seletividade e menor pressão evolutiva, por se tratarem de regiões geralmente não conservadas, além

da incidência menor de efeitos adversos (ABDEL-MAGID, 2015). Por não competirem com os ligantes endógenos ou substratos e, uma vez ocupados os locais alostéricos, não serem observados efeitos adicionais (efeitos saturáveis), somado ao fato de que vários trabalhos já demonstraram que ligantes alostéricos geralmente possuem melhores perfis de tratabilidade físico-química quando comparados a ligantes ortostéricos, a modulação alostérica também garante uma margem de segurança terapêutica maior (WENTHUR et al., 2014).

Assim, a possibilidade de modulação alostérica demonstra-se uma alternativa promissora no processo de desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista que atualmente no mercado estão disponíveis medicamentos amplamente utilizados que são moduladores alostéricos de diversos alvos, como canais iônicos, receptores acoplados à proteína G e enzimas.

Dentre os antiparasitários, a ivermectina se destaca por ser um modulador alostérico com atividades anti-helmíntica e inseticida de amplo espectro, além de ter doses terapêuticas consideradas seguras (MARTIN; ROBERTSON; CHOUDHARY, 2021). Também podem ser citados os benzodiazepínicos flumazenil, diazepam e flunitrazepam, que interferem na atividade dos canais iônicos do ácido gama aminobutírico A (GABA A); além do antirretroviral maraviroc (modulador alostérico negativo do receptor de quimiocina CCR5 da superfície celular), o medicamento para hiperparatireoidismo cinacalcet, (modulador alostérico positivo do receptor sensor de cálcio) e o antitumoral trametinibe (inibidor alostérico reversível altamente seletivo da atividade das enzimas MEK1 e MEK2) (DOLLER; HUANG, 2016).

2.3. QUÍMICA MEDICINAL, PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS

2.3.1. Técnicas *in silico* para priorização de inibidores alostéricos

A modulação alostérica obteve êxitos crescentes enquanto farmacoterapia (GUARNERA; BEREZOVSKY, 2020), e os avanços computacionais crescentes facilitaram a identificação de moduladores para diversos alvos, assim considera-se que a busca de moduladores alostéricos foi redirecionada do campo do “acaso” para o planejamento de fármacos baseado na estrutura (do inglês, *Structure-based drug design*) (LIU et al., 2019).

Partido dessa perspectiva, Sheik Amamuddy e colaboradores (2020) sinalizam que, com o amadurecimento de projetos de código aberto, a disponibilidade de computação mais barata e de grandes bancos de dados, as simulações computacionais são um caminho muito atraente para a etapa inicial da descoberta de fármacos, por ser um processo mais econômico, além de que a integração de múltiplas abordagens computacionais deve tornar a descoberta de medicamentos alostéricos mais eficiente e confiável.

A capacidade de modulação alostérica pode ser calculada computacionalmente por estratégias baseadas nas características do alvo biológico, como ferramentas de predição de cavidades e métodos de perturbação como flutuações ou correlações de resíduos. O trabalho de Lu e colaboradores (2019) exemplifica a diversidade de abordagens computacionais para o alosterismo, enquanto descreve 8 produtos distintos (ASD, ASBench, Allosite, AllositePro, Alloscore, AlloDriver, Allosterome e AlloFinder) direcionados para a descoberta de sítios alostéricos, que obtiveram sucesso com enzimas como a sirtuina 6 (SIRT6), caseína quinase 2 α (CK2 α) e a fosfodiesterase 10A.

Adicionalmente, a aplicação de rotinas de técnicas *in silico* complementadas pelas características dos ligantes (tais como acoplamento molecular, modelos farmacofóricos e rotinas de dinâmica molecular) em etapas de priorização de compostos para testes *in vitro* vem obtendo bons resultados na descoberta de inibidores alostéricos ao direcionar de forma eficiente a filtragem de bancos de moléculas para compostos que apresentam concentrações inibitórias na faixa de micromolar (TUBELEVICIUTE-AYDIN et al., 2019).

Por exemplo, Shinde e colaboradores (2018) relatam a descoberta de inibidores alostéricos da enzima tirosina fosfatase 1B, através de estudos de dinâmica molecular e de modelos farmacofóricos, que levaram a confirmação da atividade em estudos *in vitro*, com a priorização de 10 compostos com atividade na faixa de concentração de 1,25 μ M (IC₅₀). De maneira similar, Kirchweiger e colaboradores (2022) relatam a descoberta de moduladores alostéricos oriundos de produtos naturais para a proteína quinase ativada por AMP, evidenciados através de técnicas computacionais como acoplamento molecular e que tiveram sua atividade comprovada em ensaios *in vitro*, com a capacidade de aumentar a atividade enzimática em 50% com a concentração de 30 μ M.

Assim, o panorama atual da descoberta de moduladores alostéricos demonstra que a escolha de uma rotina de técnicas experimentais *in silico* (e consequentemente *in vitro*) sustentadas nas particularidades do alvo são parte crucial do sucesso das técnicas.

2.3.2. Ensaios de deslocamento térmico (ThermoFluor)

Por conta da natureza da maioria dos ensaios *in vitro* para SODs, que geram o substrato superóxido em pequenas quantidades por meio de reações enzimáticas (por exemplo, xantina oxidase) ou não enzimáticas (por exemplo, auto-oxidação do pirogalol ou sistema do nitrozol de tetrazólio), muitos compostos inicialmente identificados como inibidores de SOD são posteriormente descobertos como falso-positivos (Soulère et al., 2003). Nesse cenário, o ensaio de deslocamento térmico (também conhecido como fluorimetria de varredura diferencial ou ThermoFluor) é um ensaio viável para identificar ligantes em bancos de pequenas moléculas frente a proteínas recombinantes purificadas.

Resumidamente, o esquema de um ensaio de deslocamento térmico (Figura 7) envolve a incubação de proteínas naturalmente enoveladas com o fluoróforo SYPRO® Orange ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$) em uma placa de PCR. Por meio de um aumento sistemático na temperatura e monitoramento concomitante da emissão de fluorescência do SYPRO® Orange nos poços, é possível monitorar a desnaturação térmica da proteína em muitas condições simultaneamente em cada poço (HUYNH; PARTCH, 2015). O aumento na temperatura de fusão (T_m) sob diferentes condições experimentais, como tampão, pH ou presença de ligantes dá origem a um deslocamento térmico (ΔT_m) que quantifica a estabilização da proteína, que é aumentada na presença de ligantes que ofereçam interações favoráveis (LO et al., 2004; MATULIS et al., 2005).

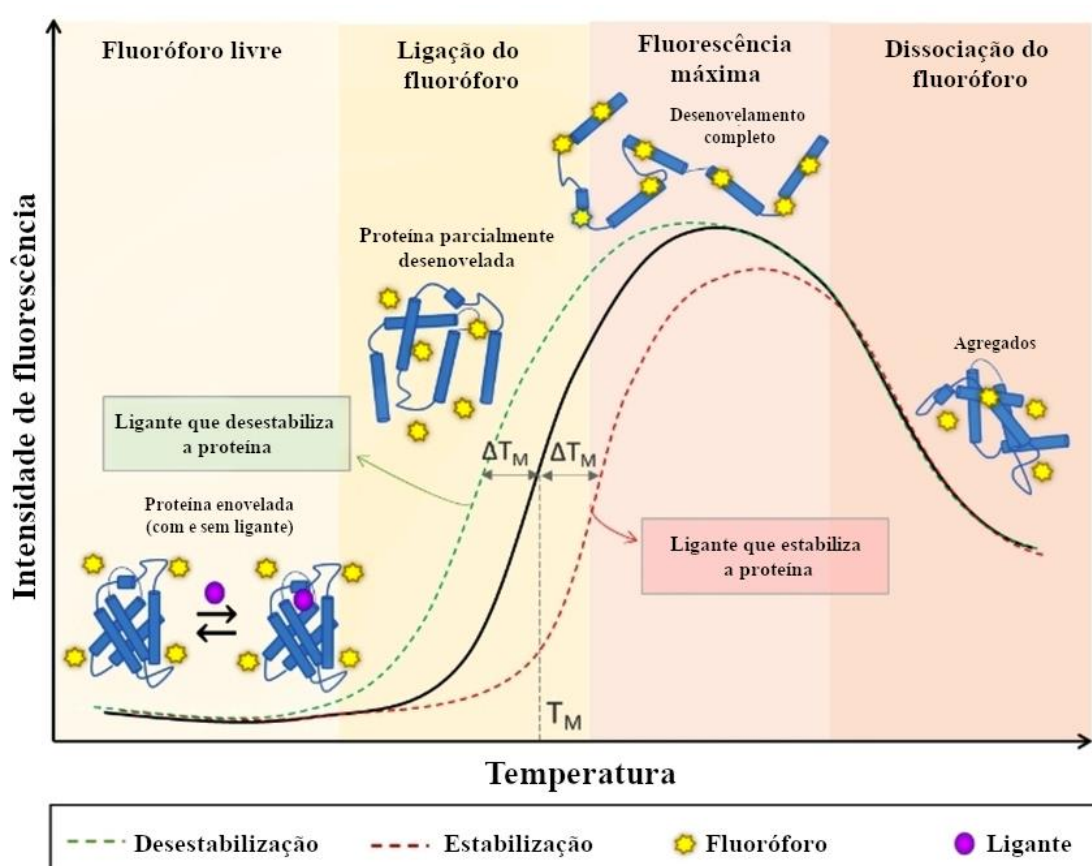


Figura 7. Representação esquemática do ensaio de deslocamento térmico (curva de fluorescência versus temperatura). ΔT_m = temperatura média onde 50% da proteína está desenovelada
Fonte: Adaptado de Kirkman et al., (2014).

Dada sua capacidade de alto rendimento, minimização da interferência de artefatos e o seu baixo custo, o ensaio de deslocamento térmico é uma alternativa promissora para investigar a estabilidade e as interações da SOD com os ligantes priorizados (KUSHWAH; CHAUHAN; DHAKED, 2024).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGID, A. F. Allosteric Modulators: An Emerging Concept in Drug Discovery. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 104–107, 12 fev. 2015.
- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- ALMEIDA, L. R. et al. Cristalografia: 100 Anos no Caminho da Inovação. **Revista Processos Químicos**, v. 8, n. 16, p. 75–86, 1 jul. 2014.
- ARAUJO, J. S. C. J. S. C. et al. Identification of new promising Plasmodium falciparum superoxide dismutase allosteric inhibitors through hierarchical pharmacophore-based virtual screening and molecular dynamics. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, n. 8, p. 220, 28 ago. 2018.
- BIJELIC, A.; ROMPEL, A. The use of polyoxometalates in protein crystallography – An attempt to widen a well-known bottleneck. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 299, p. 22–38, set. 2015.
- BRITO, C. C. B. et al. Molecular Cloning and Biochemical Characterization of Iron Superoxide Dismutase from Leishmania braziliensis. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 8, p. 595–600, 27 ago. 2018.
- BURLEY, S. K. et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D464–D474, 8 jan. 2019.
- CARVALHO, J. de P. et al. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. 04542020, p. 2021, 2021.
- CASTRO, H. et al. Mitochondrial Redox Metabolism in Trypanosomatids Is Independent of Tryparedoxin Activity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12607, 8 set. 2010.
- CHANGEUX, J.-P. The Concept of Allosteric Interaction and Its Consequences for the Chemistry of the Brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 26969–26986, 20 set. 2013.
- CHATZIGOULAS, A.; CURNIA, Z. Rational design of allosteric modulators: Challenges and successes. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 11, n. 6, p. e1529, nov. 2021.

- CIMPERMAN, P. et al. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. **Biophysical journal**, v. 95, n. 7, p. 3222–31, out. 2008
- DOLLER, D.; HUANG, X. Modulation of Biological Targets Using Allosteric Ligands: Food for Thought. **Allosterism Drug Discov.** Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016. p. 1–23.
- FERNANDES, J. Virus-Induced Lysis of Tumor and Other Pathogenic Unicellular Entities and Its Potential to Treat Leishmaniasis. **DNA and Cell Biology**, v. 42, n. 6, p. 305–314, jun. 2023.
- FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 15 set. 2011.
- GRANT, B. J. et al. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. v. 22, n. 21, p. 2695–2696, 2006.
- GUARNERA, E.; BEREZOVSKY, I. N. Allosteric drugs and mutations: chances, challenges, and necessity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 62, p. 149–157, jun. 2020.
- HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 11, p. 1323–1367, jun. 2012.
- HUANG, Z. et al. ASD: a comprehensive database of allosteric proteins and modulators. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database, p. D663–D669, 1 jan. 2011.
- KIRCHWEGER, B. et al. In Silico and In Vitro Approach to Assess Direct Allosteric AMPK Activators from Nature. **Planta Medica**, v. 88, n. 9/10, p. 794–804, ago. 2022.
- KIRKMAN, T. et al. How to Find a Fragment: Methods for Screening and Validation in Fragment-Based Drug Discovery. **ChemMedChem**, v. 19, n. 24, p. e202400342, 2024
- KOZAKOV, D. et al. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. **Nature Protocols**, v. 10, n. 5, p. 733–755, 9 maio 2015.
- LI, F. et al. Distinct contributions of one Fe- and two Cu/Zn-cofactored superoxide dismutases to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 81, p. 160–171, ago. 2015.
- LIU, X. et al. Unraveling allosteric landscapes of allosterome with ASD. **Nucleic Acids Research**, 29 out. 2019.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. **Nucleic acids research**, v. 52, n. W1, p. W521–W525, 1 jul. 2024.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; CHOUDHARY, S. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 1, p. 48–64, jan. 2021.

MARTIN-MONTES, A. et al. In vitro antileishmanial activity and iron superoxide dismutase inhibition of arylamine Mannich base derivatives. **Parasitology**, v. 144, n. 13, p. 1783–1790, nov. 2017.

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 70, n. 1, p. 2–20, 1 jan. 2014.

MILLER, A.-F. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p. 162–168, abr. 2004.

MITTRA, B. et al. The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes Leishmania virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 29, p. 12324–12338, 21 jul. 2017.

MONOD, J.; CHANGEUX, J.-P.; JACOB, F. Allosteric proteins and cellular control systems. **Journal of Molecular Biology**, v. 6, n. 4, p. 306–329, abr. 1963.

OLIVEIRA, L. B. et al. The Paradoxical Leishmanicidal Effects of Superoxide Dismutase (SOD)-Mimetic Tempol in Leishmania braziliensis Infection in vitro. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 26 jun. 2019.

OLMO, F. et al. An in vitro iron superoxide dismutase inhibitor decreases the parasitemia levels of Trypanosoma cruzi in BALB/c mouse model during acute phase. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 110–116, 1 dez. 2015.

RIVERA, G.; PATEL, N. B.; BANDYOPADHYAY, D. Editorial: Discovery and Development of Drugs for Neglected Diseases: Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis, and Leishmaniasis. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 7 out. 2021.

RUSSO KRAUSS, I. et al. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11643–11691, 31 maio 2013.

SALAM, N.; AL-SHAQHA, W. M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3208, 2 out. 2014.

SHEIK AMAMUDDY, O. et al. Integrated Computational Approaches and Tools for Allosteric Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 847, 28 jan. 2020.

SHENG, Y. et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3854–3918, 9 abr. 2014.

SHINDE, R. N. et al. Screening and identification of potential PTP1B allosteric inhibitors using in silico and in vitro approaches. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0199020, 18 jun. 2018.

SOULÈRE, L. et al. Screening of Plasmodium falciparum iron superoxide dismutase inhibitors and accuracy of the SOD-assays. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 4941–4944, nov. 2003.

SOUZA, B. C. de et al. Identification of potential Leishmania chagasi superoxide dismutase allosteric modulators by structure-based computational approaches: homology modelling, molecular dynamics and pharmacophore-based virtual screening. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, p. 1–17, 14 ago. 2020.

SU, X.-D. et al. Protein crystallography from the perspective of technology developments. **Crystallography Reviews**, v. 21, n. 1–2, p. 122–153, 2 jan. 2015.

TEIXEIRA, O. et al. Druggable hot spots in trypanothione reductase: novel insights and opportunities for drug discovery revealed by DRUGpy. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 35, n. 8, p. 871–882, 28 ago. 2021.

WENTHUR, C. J. et al. Drugs for Allosteric Sites on Receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 165–184, 6 jan. 2014.

WILSON, G. L.; LILL, M. A. Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 735–750, abr. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, out. 2017.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Identificar novos inibidores alostéricos para a ferro superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar sítios alostéricos na enzima superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis*;
- Expressão e purificação da enzima superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis*;
- Avaliação da atividade de inibidores alostéricos da superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis* através de testes de determinação por dose única e dose resposta;
- Calcular os valores de Kd dos inibidores frente a superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis*;
- Analisar as interações moleculares de inibidores alostéricos de *Leishmania braziliensis* por rotinas de dinâmica molecular.

01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

CAPÍTULO 1

Manuscrito 01 – Identificação e caracterização de sítios alostéricos em enzimas superóxido dismutase de tripanossomatídeos na perspectiva de alvos farmacológicos específicos

Artigo (em língua inglesa; em formatação recomendada) submetido ao periódico *Computational Biology and Chemistry*.

CAPÍTULO 1

Identification and characterization of allosteric sites on superoxide dismutases for use as species-specific drug targets to parasitic trypanosomatids

Bruno Cruz de Souza¹, Thamires Quadros Froes², Marcelo Santos Castilho², and Franco Henrique Andrade Leite^{1*}

¹ Laboratory of Molecular Modeling, Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil.

² Laboratory of Crystallography and Macromolecules, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil.

*Correspondence: fhenrique@uefs.br

ORCID IDs (ordered as above): 0000-0002-4163-5681, 0000-0001-7951-7560, 0000-0002-9563-5679, 0000-0003-3166-6051

Abstract

Trypanosomatids are etiological agents to neglected tropical diseases like Leishmaniasis, Chagas disease and Human African trypanosomiasis, which treatment options face challenges like toxicity, patient compliance, drug resistance and underfunded drug development. As they are involved in the primary mechanism of parasites defense to oxidative stress, superoxide dismutase enzymes (SODs) are putative drug targets for drug development efforts to fight diseases caused by trypanosomatids. However, the small volume of SODs active sites renders them undruggable. In order to circumvent this limitation, extensive in-silico studies were performed to identify druggable allosteric pockets in SODs from trypanosomatids that are absent in human SODs. Human MnSOD2 and trypanosomatids FeSOD share evolutionary heritage and have somewhat similar allosteric binding pockets and residue composition, implying that MnSOD2 inefficacy may be a noteworthy starting point on the discovery of new Leishmania SOD modulators. Crystallographic structures of SODs (human, Trypanosoma and Leishmania), collected manually, were clustered based on root-mean square deviation (RMSD) and principal component analysis, as available on the Bio3D R package. Then, a representative of each cluster (highest resolution) was submitted to computational solvent mapping. FTMove server was also employed to carry out the search and mapping step. The consensus sites identified by this approach were analyzed on DrugPy to compare and contrast druggable and borderline-druggable hot spots laying without the SODs' active site. The residues surrounding these hot spots were compared using PocketMatch server.

Keywords Superoxide dismutase, Trypanosomatids, Allostery, Solvent mapping

1. Introduction

Neglected tropical diseases (NTDs) are part of a diverse group of diseases of protozoan, helminthic, bacterial, viral, fungal and parasitic origin, prevalent in territories with tropical climates, along with situations of poverty, inequality and health inequities and their occurrence is associated with a significant burden of morbidity and mortality, physical disability and deformities, in addition to suffering, prejudice and stigma (Brito et al., 2022). Leishmaniasis, Chagas disease, and human African trypanosomiasis are among the 20 neglected tropical diseases (NTDs) currently within the World Health Organization (WHO) portfolio, and all 3 diseases have been targeted for elimination as part of the WHO road map for NTDs 2021–2030 (Horn, 2022).

Leishmaniasis, caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, infects approximately 1 million people each year on over 90 countries throughout Asia, Africa, the Middle East, and Central and South America (WHO, 2022), being estimated to cause the loss of 2.4 million disability adjusted life years, with greatest impact on the poorest communities (Charlton et al., 2018). The current treatment method for leishmaniasis relies on pentavalent antimonials, amphotericin B, and pentamidine, but the treatment choices are narrowed down by drugs' toxicity, high production cost, decreased efficacy, administration route, and, most importantly, the emergence of resistant strains (Sasidharan and Saudagar, 2021). Leishmaniasis control is also hugely underfunded (Choi et al., 2021; Sasidharan and Saudagar, 2021).

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* parasites, affects about 6–8 million people worldwide and causes approximately 50000 deaths per year, with another 65–100 million people living in areas at risk for infection (Lidani et al., 2019). Chronic Chagas disease leads to life threatening conditions cardiac, digestive, or neurological symptoms, often many years after the initial infection, with advanced stages of the disease requiring heart transplants (Horn, 2022). At present, there are only two drugs for the treatment of Chagas disease: nifurtimox and benznidazole, but these drugs are only effective in the acute or early infection phases, and its many adverse effects, therapy discontinuation and resistant strains have limited its potential (García-Huertas and Cardona-Castro, 2021).

Human African trypanosomiasis (HAT), a parasitic disease confined to sub-Saharan Africa, is caused by vector-borne parasite *Trypanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*), with around 50 million people living under the risk of contraction (Spaulding et al., 2019). If untreated, or inadequately treated, HAT is almost always fatal, due to its late central nervous system (CNS) stage causing a wide variety of neurological symptoms and brain dysfunction (Kennedy, 2019). The disease is close to elimination in many areas, although it was similarly close to elimination once before and subsequently reemerged, despite seemingly low rates of transmission (Capewell et al., 2019). Currently available therapies are limited as they are ineffective against CNS-stage disease (pentamidine and suramin), require parenteral administration and have inherent toxicity (melarsoprol) (Hulpia et al., 2020).

While overlooked by most big pharmaceutical companies, efforts to develop affordable and effective NTD treatments come from non-profit research and development organizations such as DNDi, that works in collaboration with academic institutions, pharmaceutical companies, and endemic countries (Drugs for Neglected Diseases initiative, n.d.).

In general, these drug development campaigns start with the target selection and validation steps (Sundar and Singh, 2018) Superoxide dismutase enzymes (SOD) of intracellular pathogens such as *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, and *Mycobacterium* are a mechanism of escape from the redox-based cytotoxic killing mechanism (Choi et al., 2021). In addition, many studies show that FeSOD downregulation contributes to miltefosine resistance and/or trivalent antimonials susceptibility in *Leishmania* species (Getachew and Gedamu, 2012; Santi and Murta, 2022; Tessarollo et al., 2015; Veronica et al., 2019), whereas the overexpression of SOD genes is associated with antimony resistance on clinical isolates (Bahrami et al., 2022), therefore SOD is a direct contributor to the *Leishmania* virulence. Additionally, as iron (Fe) SOD is absent in the human host (Santi et al., 2021), selective inhibition of this enzyme is expected.

Exploiting trypanosomatids' SODs as drug targets has been hindered by the enzyme active site volume, which is too small to bind druglike molecules (Perry et al., 2010). Currently, SOD inhibition has been reported with metal chelators such as tetrathiomolybdate (Doñate et al., 2008) and N-N'-diethyldithiocarbamate (Lushchak et al., 2005), which cannot be used as drugs to leishmaniasis. Allosteric modulation shows up as a promising alternative on this scenario, as it grants non-competitiveness and spatiotemporal selectivity in comparison to orthosteric modulation (Wah Tan et al., 2022).

As a computational approach to characterize new binding pockets, solvent mapping has emerged as a useful tool for identifying hot spots within binding sites on proteins for drug-like molecules and suggesting properties of potential modulators (Hall and Enyedy, 2015). The technique has successful applications with reproducibility of experimental target-molecule interaction patterns (Wakefield et al., 2022) and led to the development of different routines to further describe the binding pockets

In order to characterize superoxide dismutase modulable sites found on human and parasites isoforms, we propose a computational workflow that can be used to find druggable pockets on SODs and compare their similarity based on structural descriptors such as residue nature and interatomic distances (Landon et al., 2007; Teixeira et al., 2021).

2. Methods

2.1 Superoxide dismutase dataset approaches and final sampling

As a first strategy to sample the conformational space of superoxide dismutase (SOD) structures, two approaches were employed:

Dataset A (manual) A manual query search was conducted on the Protein Data Bank database (www.rcsb.org) using the following keywords: "superoxide dismutase" AND "Homo sapiens" or "superoxide dismutase" AND "Leishmania" or "superoxide dismutase" AND "Trypanosoma". The search was further refined by excluding structures without metalation and those containing the keywords "mutation", "mutant", "variant", "deleted", "segment", "substitution", "replacement", "corkscrew" and "defects" in the title or the abstract and limiting the experimental method to "X-ray diffraction" with a resolution better than 2.51 angstroms.

Dataset B (automated) The structure with the highest resolution on the initial search (Dataset A) for each organism was considered as a template for FTMove server (Egbert et al., 2022). Briefly, this server searches the PDB database for all structures that share at least 90% sequence similarity and 90% sequence coverage of the template. Then, it aligns all structures to the selected template, performs the solvent mapping on all structures and compares the predicted consensus sites to identify putative binding sites.

Final sampling The SOD structures identified by FTMove (Dataset B) were submitted to the same exclusion criteria employed above to afford Dataset A, in order to maintain uniformity, thus resulting in a final dataset which is the sum of the unique non-mutant and metal-complexed SOD structures from Homo sapiens, Leishmania and Trypanosoma found in both approaches. This final SOD sample was employed on the subsequent steps.

2.2 Alignment and clustering of superoxide dismutase structures

The final SOD sample was submitted to the Bio3D package (Grant et al., 2006), where multiple sequence alignment was performed using MUSCLE (Edgar, 2004), and a Bio3D routine was employed to find core regions upon which all structures were aligned.

The structural variance within SOD structures from the host and trypanosomatids was assessed using principal component and root-mean-square deviation analyses, as available in Bio3D (Grant et al., 2006). Then, the highest resolution structure from each cluster identified in the PCA was considered for the prediction of druggable and borderline-druggable hotspots in SODs located outside the active site.

2.3 FTMap hotspot predictions and Pocketmatch similarity analysis

In silico solvent mapping was performed using FTMap (Kozakov et al., 2015). Briefly, a set of 16 molecular probes was employed to identify regions on the protein surface where multiple organic solvents are likely to bind, resulting in “consensus sites” (CSs). The CSs are then ranked based on the number of probes they accommodate. The output from the server was analyzed with DrugPy (Teixeira et al., 2021) to identify combinations of CSs that result in druggable or borderline-druggable hotspots, following the criteria described by Kozakov and coworkers (Kozakov et al., 2015). Hotspots were compared based on their relative positioning in the protein structures (fractional overlap) through DrugPy and, additionally, the similarity of the residues surrounding the hot spots were evaluated according to PocketMatch (Nagarajan and Chandra, 2013), which evaluates pockets similarity based on shape descriptors like amino-acid physicochemical properties and pair-wise matching. The binding sites similarity was evaluated by P-max score, which ranges from 0 (no similarity) to 1 (total similarity). Values inferior to 0.6 are found in dissimilar binding sites, between 0.6 and 0.79 in somewhat similar sites, while very similar sites have values equal to or higher than 0.8. A multiple sequence alignment with hierarchical clustering of the unique pockets that had P-max > 0.6 was performed on the MultAlin server (Corpet, 1988) in order to show the consensus residues that constitute the somewhat/very similar pockets.

2.4 Allosite allosteric sites prediction and Pocketmatch similarity analysis

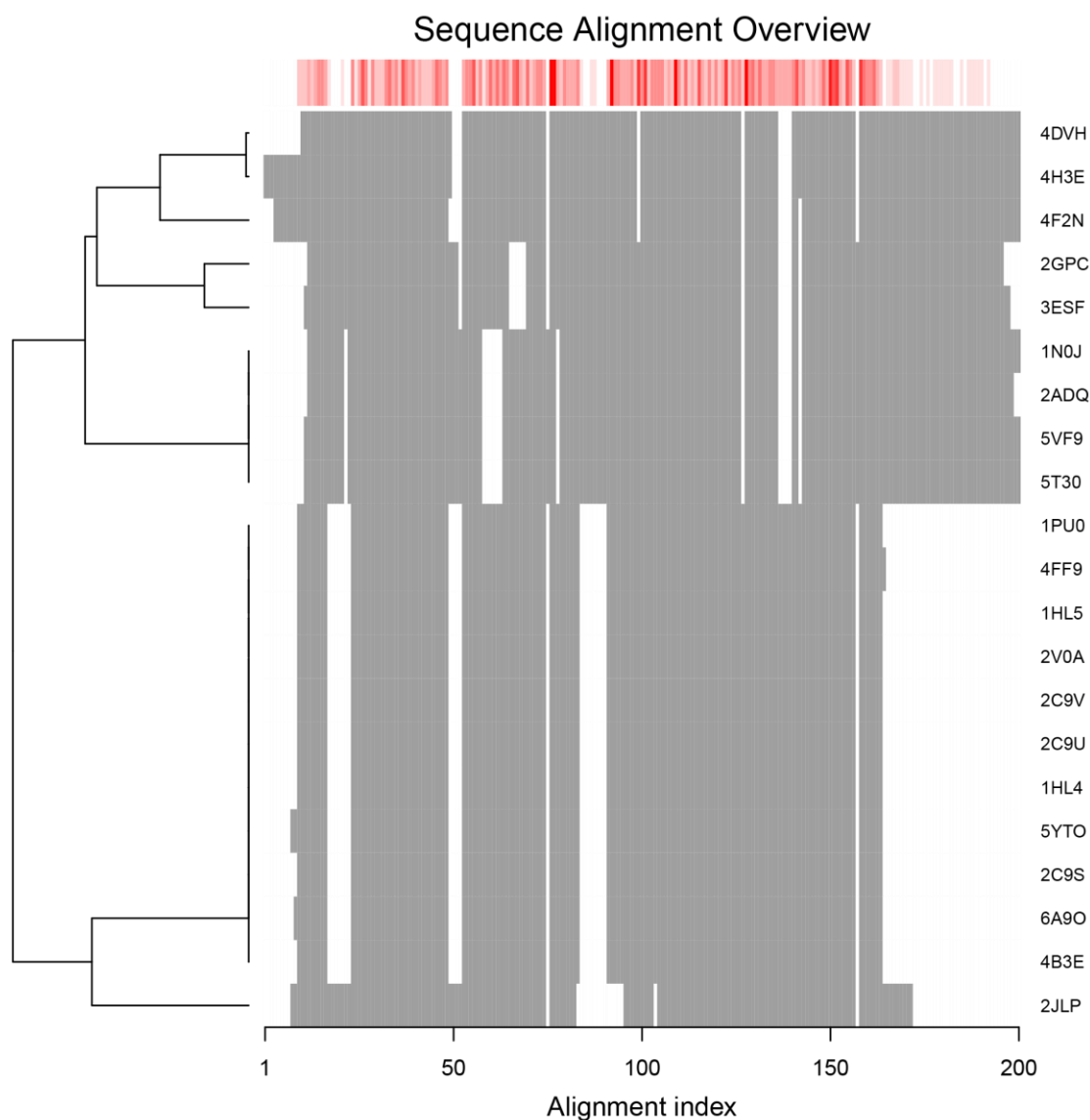
Furthermore, as an additional site analysis method, the final sampling dataset was submitted to the Allosite server, which identifies allosteric sites by combining feature-based regression and perturbation-based method on the input proteins (Huang et al., 2013; Song et al., 2017). The sites found by this method were also analyzed on Pocketmatch in order to describe their similarity.

3. Results and discussion

3.1 Analyses of superoxide dismutase datasets

Dataset A The manual search carried out in the PDB databank for superoxide dismutase structures yielded 21 entries (Dataset A) (Table 1S) that met the exclusion criteria (detailed in Methods section) from search refinement. The sequence alignment of all entries in Dataset A is shown on Figure 1.

Fig. 1 Multiple sequence alignment of superoxide dismutase enzymes in Dataset A. The top bar displays the residue conservation ratio (shades of red), while the residue numbering is indicated at the bottom. The PDB IDs are listed on the right-hand side. The dendrogram highlights the major SOD families. The figure was created using the Bio3D module, as available in RStudio.



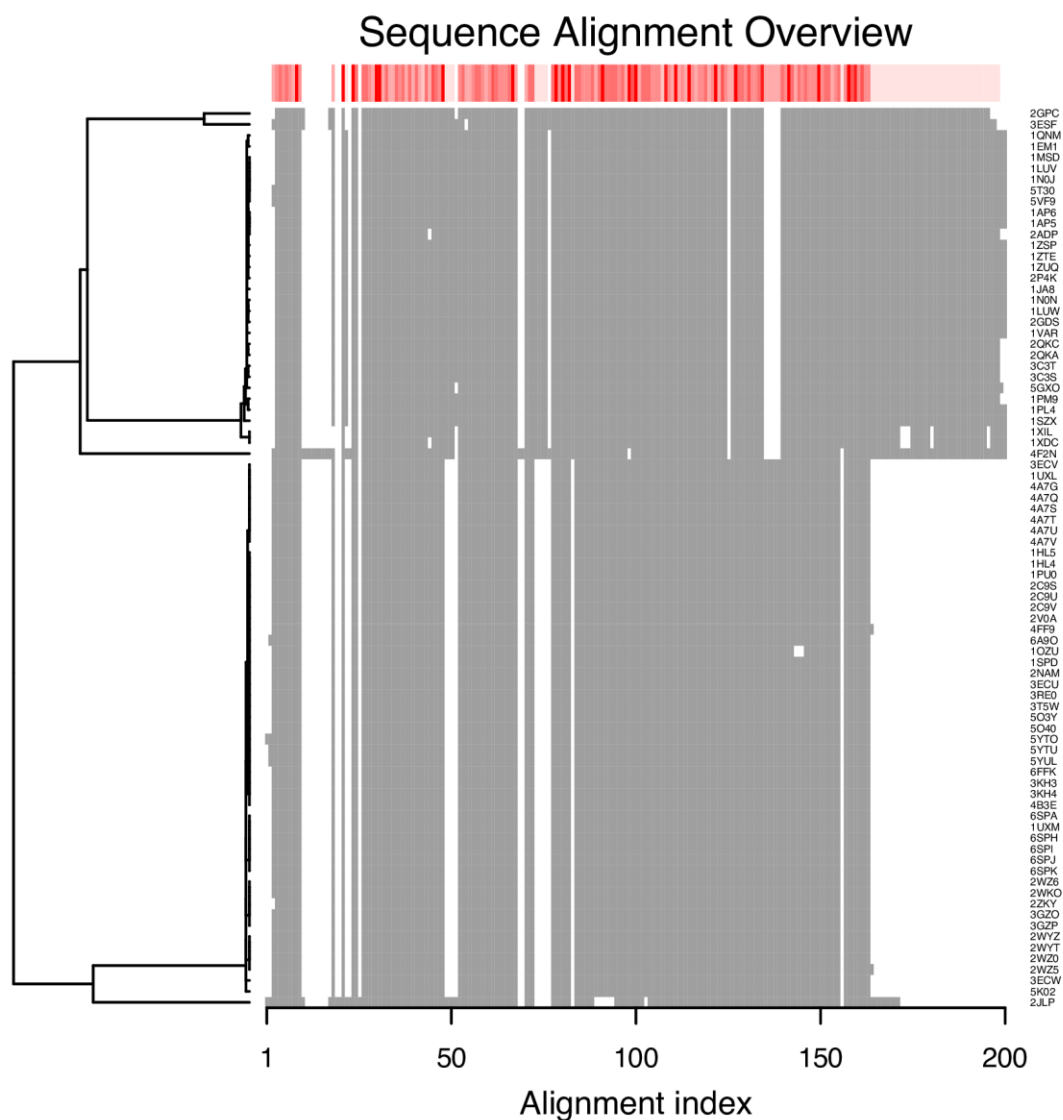
The alignment shows that the SODs share 55% overall sequence identity. The structures can be categorized into two main families: the first family comprises human SOD1 and SOD3 enzymes, both of which have Cu-Zn in the active site, while the second family includes human SOD2 and trypanosomatids SOD enzymes, characterized by containing Mn or Fe in their active site. Comparison of active site residues within each family reveals high conservation (100%).

Dataset B As stated before, the best resolution representative of each isoform of superoxide dismutase picked on Dataset A was used to build Dataset B through FTMove.

For the representative structures of the parasites SODs, *Leishmania major* (PDB: 4F2N, 1.85 Å), *Trypanosoma cruzi* (PDB: 2GPC, 1.90 Å) and *Trypanosoma brucei* (PDB: 3ESF, 2.01 Å), the FTMove server alignment could not find other structures other than themselves. As for the human SODs, when utilizing *Homo sapiens* SOD3 (PDB: 2JLP, 1.70 Å) as the template, the dataset automatically generated with FTMove identifies no similar entries, however 28 entries are identified when the template is replaced by *Homo sapiens* SOD2 (PDB: 5T30, 1.77 Å) and 49 entries are identified when the template is *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V, 1.07 Å). The FTMove-generated set of 78 SOD structures, including mutants, and how they fail to meet the exclusion criteria is shown on Table 2S.

The sequence alignment of all entries in Dataset B (Figure 2) reveals they share 59% overall sequence identity. The families found are similar to the ones found on Dataset A, with the number of human SOD1 and SOD2 mutant isoforms now being more than the half of the total sample.

Fig. 2 Multiple sequence alignment of superoxide dismutase enzymes in Dataset B. The top bar displays the residue conservation ratio (shades of red), while the residue numbering is indicated at the bottom. The PDB IDs are listed on the right-hand side. The dendrogram highlights the major SOD families. The figure was created using the Bio3D module, as available in RStudio.



Final sampling After removing entries that do not meet the exclusion criteria employed in Dataset A, Dataset B contains no additional entries. This showcases the precision of our search strategy, as it could retrieve all the SOD structures found by the FTMove search algorithm.

3.2 Dataset A Bio3D analysis

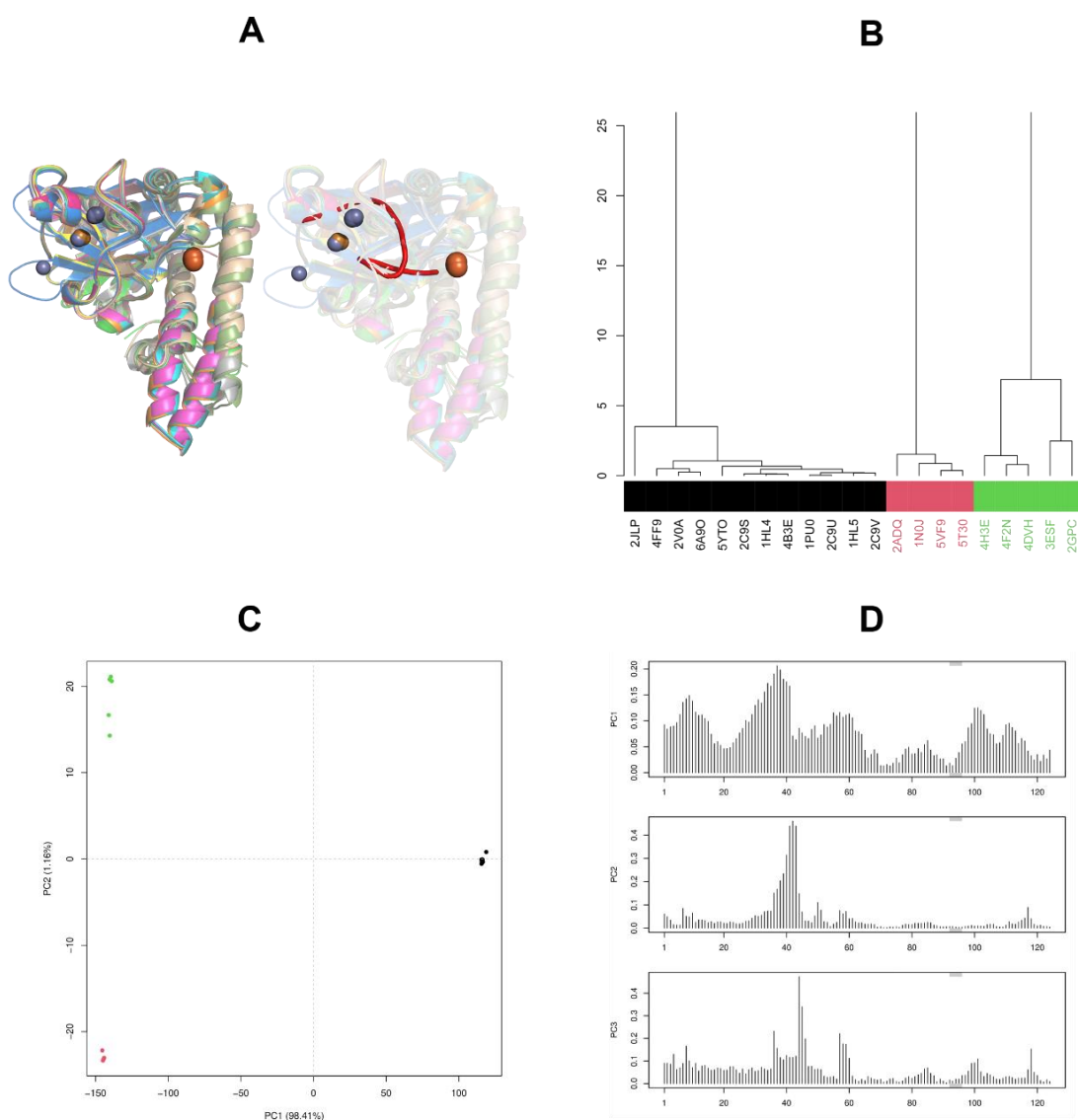
The evolutionary differences between SOD2 and parasite enzymes have already been established and have been the focus of several drug development campaigns (Hart et al., 1999; Xu et al., 2021). However, these efforts have not explicitly taken the druggability of the active site into account. While covalent inhibitors have been developed to deal with undruggable targets (Boike et al., 2022; Lee and Park, 2022; Sutanto et al., 2020), SODs from parasites lack reactive residues that could be exploited for such endeavors. An alternative approach would involve the development of allosteric modulators. This strategy is also supported in previous studies (Mendonça and Marana, 2011; Saen-Oon et al., 2008).

Furthermore, there is a proposition that SOD from *Leishmania chagasi* possesses an allosteric binding pocket (Souza et al., 2021). This hypothesis is based on a 3D structure built through homology modeling and did not consider the druggability of the putative allosteric pocket.

As correlated/anti-correlated domain movements are suggestive of allostery (Olmo et al., 2015; Song et al., 2017), the conformational flexibility of the X-ray structures in dataset A was examined as follows: the core region among all structures was calculated based on their RMSD values after structural alignment (Figure 3). This approach allowed all the SOD structures to be superimposed on the same frame, consisting of 16 residues, which compose the region close to the active site region and their respective metals.

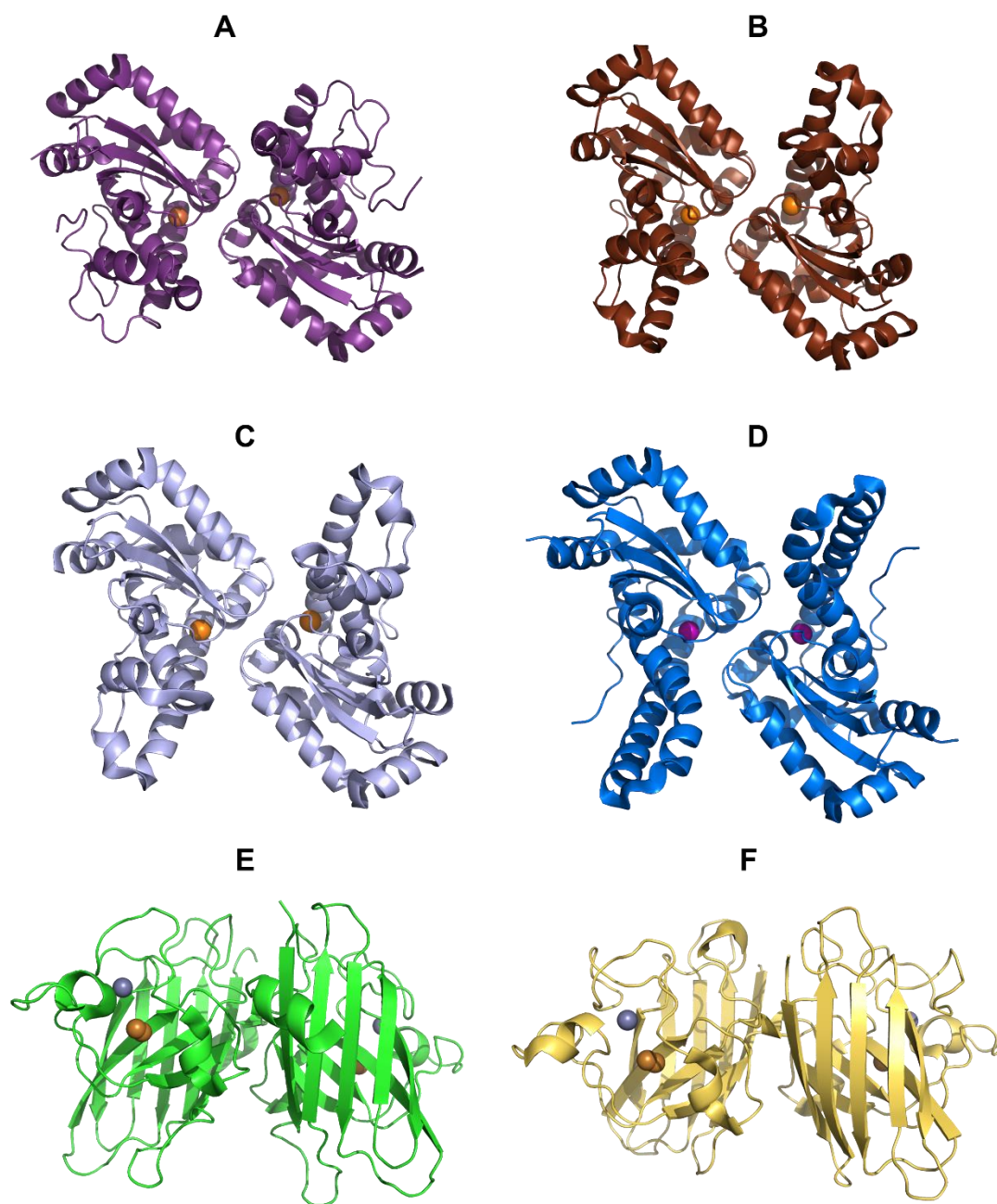
Also, a Principal Component Analysis (PCA) performed on the aligned structures reveals that the first principal component (PC1) explains 98.41% of the variance, while the second principal component (PC2) accounts for 1.16%. Using these two PCs, the SODs from dataset A can be classified into two groups: 1) human SOD1 and SOD3, 2) human SOD2 and trypanosomatids SODs, which corroborates with the sequential alignment dendrogram.

Fig. 3 Structural comparison of SOD structures within Dataset A. [A] Superposition of aligned SOD structures upon the core (red). Protein structures are displayed as cartoon (smooth loops) and ions are shown in spheres; [B] Dendrogram based on principal component analysis that show the SOD families identified by colors: human SOD1 and SOD3 are shown in black, human SOD2 in pink and trypanosomatids SODs are shown in green. [C] Score plot for the SOD families and [D] Loading plot for the principal components.



Based on the clustering and PCA analysis of the Dataset A on Bio3D, representative structures could be picked from each family to represent individual isoforms of each organism, thus ensuring good human and trypanosomatids SODs coverage. Using resolution as an additional selection filter, the structures of *Leishmania major* SOD (PDB: 4F2N); *Trypanosoma cruzi* SOD (PDB: 2GPC); *Trypanosoma brucei* SOD (PDB: 3ESF); *Homo sapiens* SOD2 (PDB: 5T30); *Homo sapiens* SOD3 (PDB: 2JLP) and *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V) were chosen for the subsequent steps (Figure 4).

Fig. 4 Graphical representations (cartoon) of the representative structures of superoxide dismutase enzymes. [A] *Leishmania major* SOD (PDB: 4F2N); [B] *Trypanosoma cruzi* SOD (PDB: 2GPC); [C] *Trypanosoma brucei* SOD (PDB: 3ESF); [D] *Homo sapiens* SOD2 (PDB: 5T30); [E] *Homo sapiens* SOD3 (PDB: 2JLP); [F] *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V).

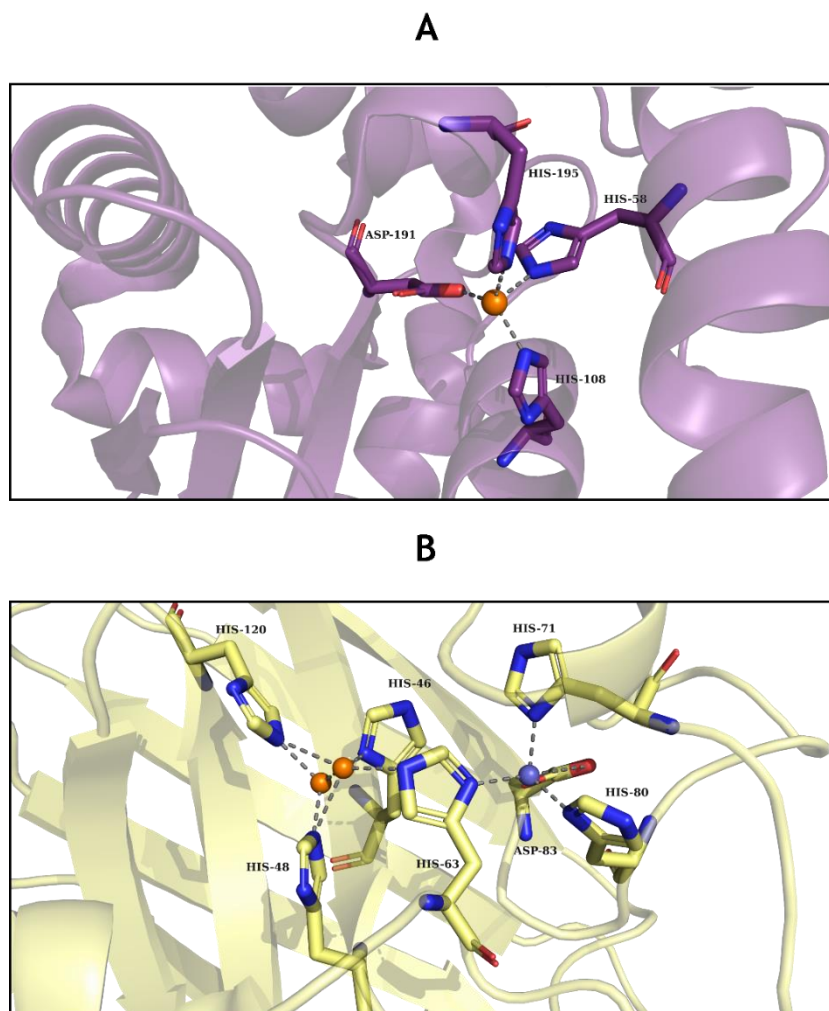


3.3 FTMap routines and pockets druggability prediction with DrugPy

As multiple studies suggest that dimers are the minimal functional structure for superoxide dismutase enzymes (Banci et al., 2002; Danielsson et al., 2011; Lindberg et al., 2004), they were employed for the subsequent solvent mapping routines. The dimeric conformation is also known to form the symmetric tunnel which leads to pockets where the metals bind on superoxide dismutases. However, the volume of these regions is limited, as it is constituted by a conserved set of charged amino acid residues forming a 10 Å wide channel leading to a less than 4 Å opening above the metals on Cu-Zn SODs (Hart et al., 1999) or only a ~5 Å gap being the only solvent-accessible area that allows entry into the active site

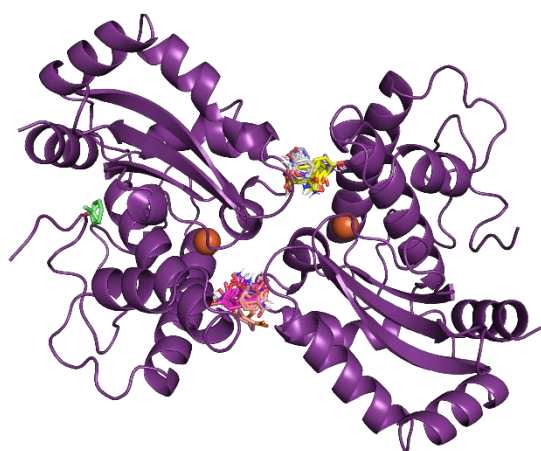
on Mn/Fe SODs (Azadmanesh and Borgstahl, 2018). This way, most consensus sites are located elsewhere in the protein surfaces, as the access to the SOD active sites is not targetable as the traditional modulation methods (Figure 5).

Fig. 5 Active sites of [A] *Leishmania major* FeSOD (PDB:4F2N, purple) and [B] *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V, yellow), showing the main residues (in sticks) involved in the stabilization of the metal ions. The Fe and Cu ions are shown as orange spheres, and the Zn ion is shown as a violet sphere.

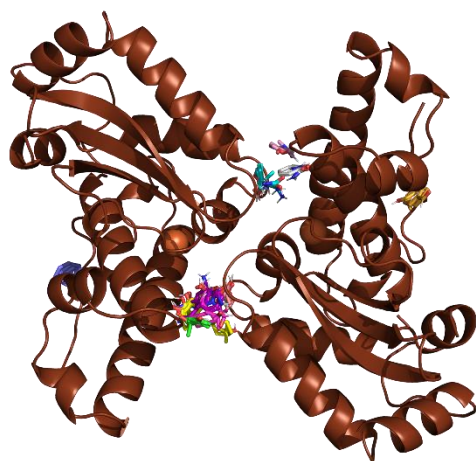


The superoxide dismutase dataset was submitted to the FTMap servers, where consensus sites formed by the aggregation of 16 or more probes are considered hot spots (Kozakov et al., 2015). Except for human SOD3 (which its' best consensus site ranked only 14 probes), all other SODs have pockets located outside the active site with the ability to bind fragment-sized molecules with high affinity. The FTMap results for these representative structures and the depiction of their tertiary structure as dimers are shown on Figure 6 (for trypanosomatids SODs) and Figure 7 (for human SODs). The majority of the consensus sites are located on the dimer-dimer interface, which forms a positive-charged channel that attracts the superoxide ion to the active site of SODs (Rakhit and Chakrabartty, 2006; Zheng et al., 2023).

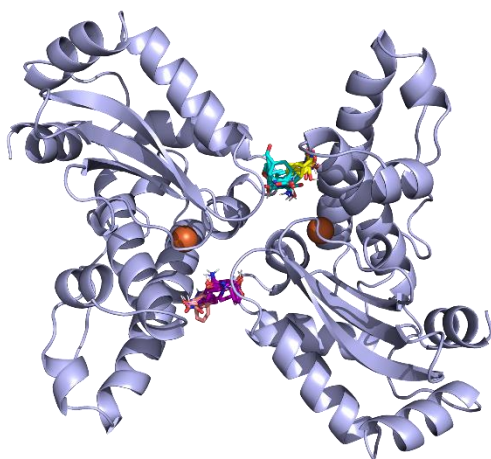
Fig. 6 FTMap consensus sites (CS) found for the trypanosomatids' representative structures of SODs. The consensus sites and their probes are shown in colored sticks. Their PDB code, organism and number of probes per CS is shown on the right of their cartoon representation.



PDB Code	Organism	Probes per CS
4F2N	<i>Leishmania major</i>	CS 01: 30 probes
		CS 02: 26 probes
		CS 03: 22 probes
		CS 04: 12 probes
		CS 05: 07 probes
		CS 06: 05 probes
		CS 07: 02 probes

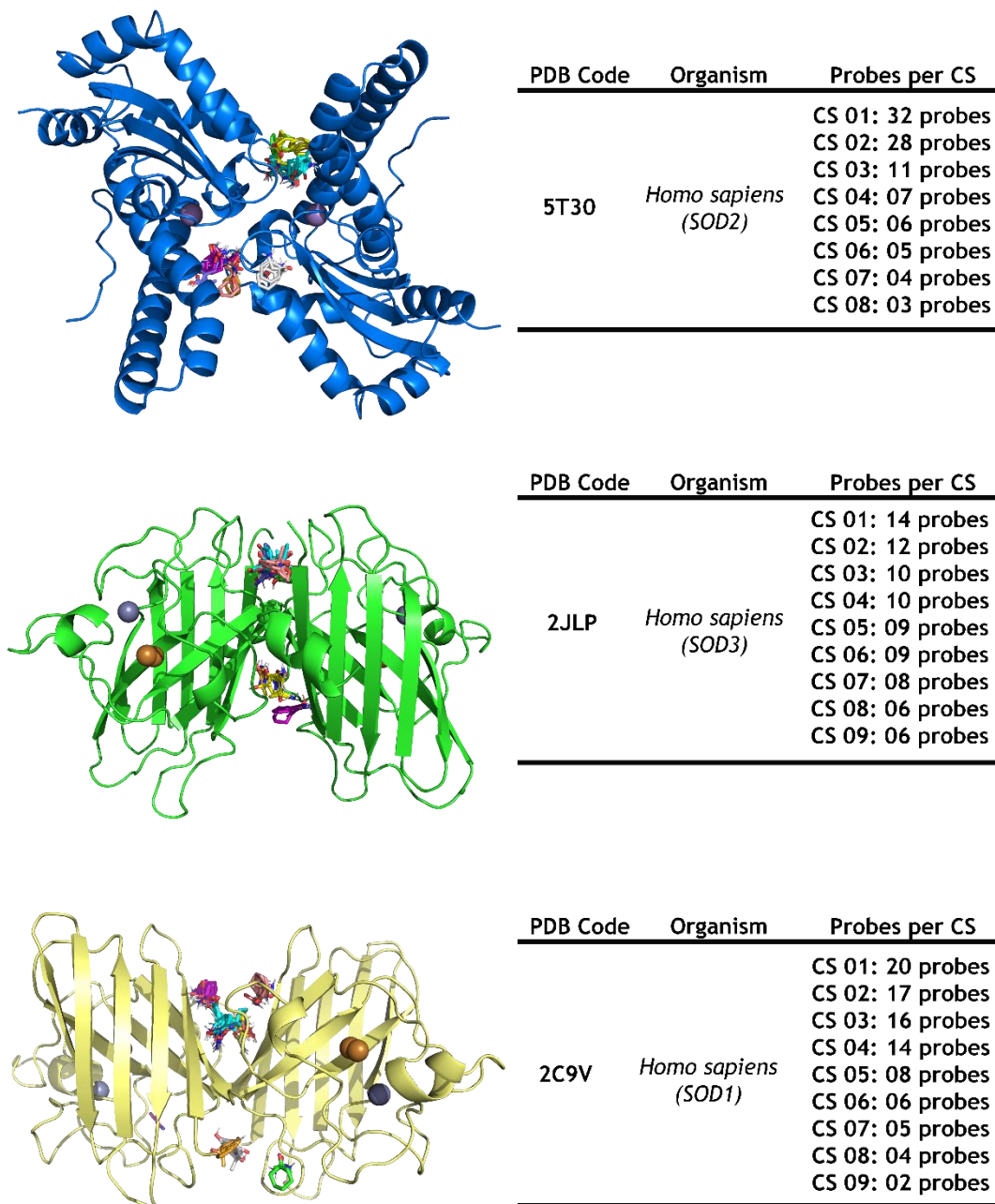


PDB Code	Organism	Probes per CS
2GPC	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CS 01: 17 probes
		CS 02: 15 probes
		CS 03: 15 probes
		CS 04: 14 probes
		CS 05: 08 probes
		CS 06: 06 probes
		CS 07: 06 probes
		CS 08: 05 probes
		CS 09: 04 probes
		CS 10: 04 probes
		CS 11: 02 probes



PDB Code	Organism	Probes per CS
3ESF	<i>Trypanosoma brucei</i>	CS 01: 28 probes
		CS 02: 24 probes
		CS 03: 15 probes
		CS 04: 14 probes
		CS 05: 07 probes
		CS 06: 06 probes

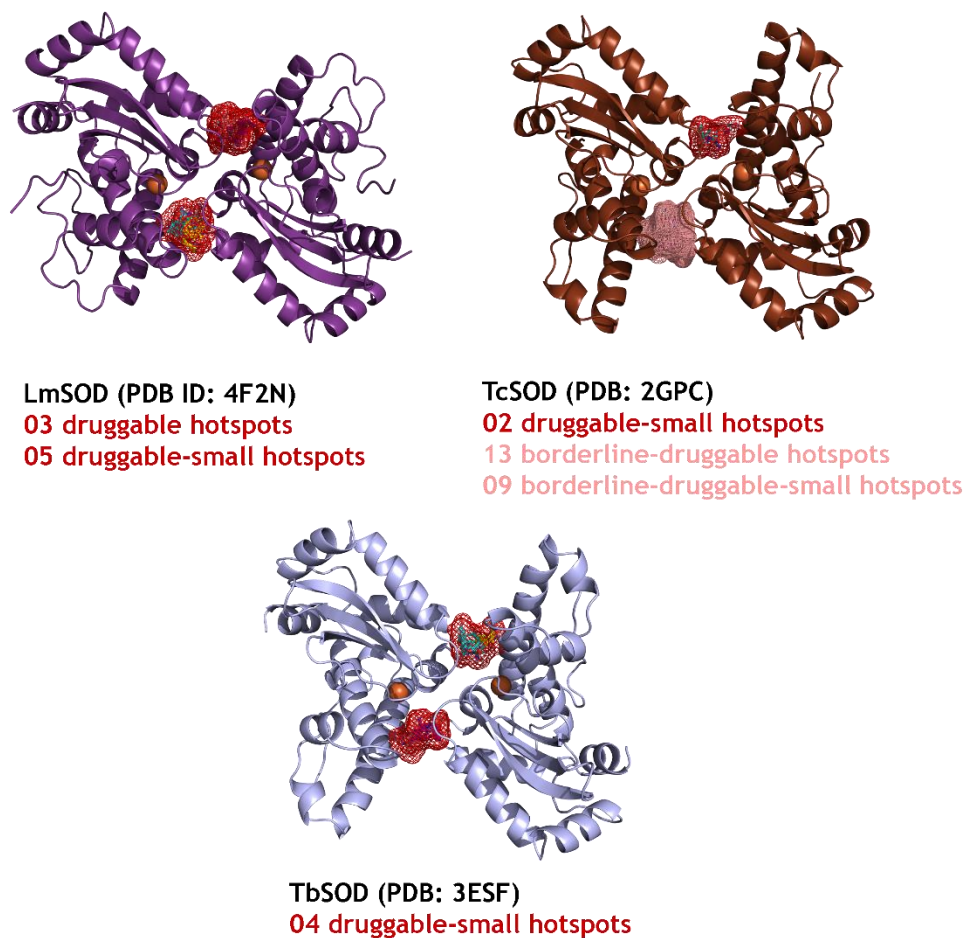
Fig. 7 FTMap consensus sites (CS) found for the human representative structures of SODs. The consensus sites and their probes are shown in colored sticks. Their PDB code, organism and number of probes per CS is shown on the right of their cartoon representation.



3.4 Druggability assessment of Trypanosomatids and Human SODs

The presence of hot spots is not enough to guarantee that these enzymes are suitable targets for drug development campaigns, as there might be no space to grow the fragments into lead-compounds. To assess whether the SODs can be modulated by druglike compounds, the raw outputs of the FTMap server were analyzed with the DrugPy plugin (Teixeira et al., 2021). This plugin calculates which ensembles afford druggable and borderline-druggable hot spots as proxies to characterize pockets that are predicted to bind druglike molecules with high-affinity (nanomolar) or at-least micromolar-affinity. There are several combinations of CSs that can render a (borderline-)druggable hotspot. For such cases, DrugPy ranks them according to the number of probes and the number of ensembles required to build each hotspot: hotspots with just one CS are ranked first, then those with two CSs and so forth. The location and strength of the hotspots predicted for each representative structure are discussed below and shown on Figure 8.

Fig. 8 Distribution of hotspots (mesh) on the surface of LmSOD (PDB ID: 4F2N; purple), TcSOD (PDB ID: 2GPC; brown) and TcSOD (PDB ID: 3ESF; violet) according to DrugPy. The druggable and druggable-small hotspots are shown in red and the borderline-druggable and borderline-druggable-small hotspots are shown in salmon. The SODs are depicted in cartoon and the metal (Fe) is depicted in orange spheres.



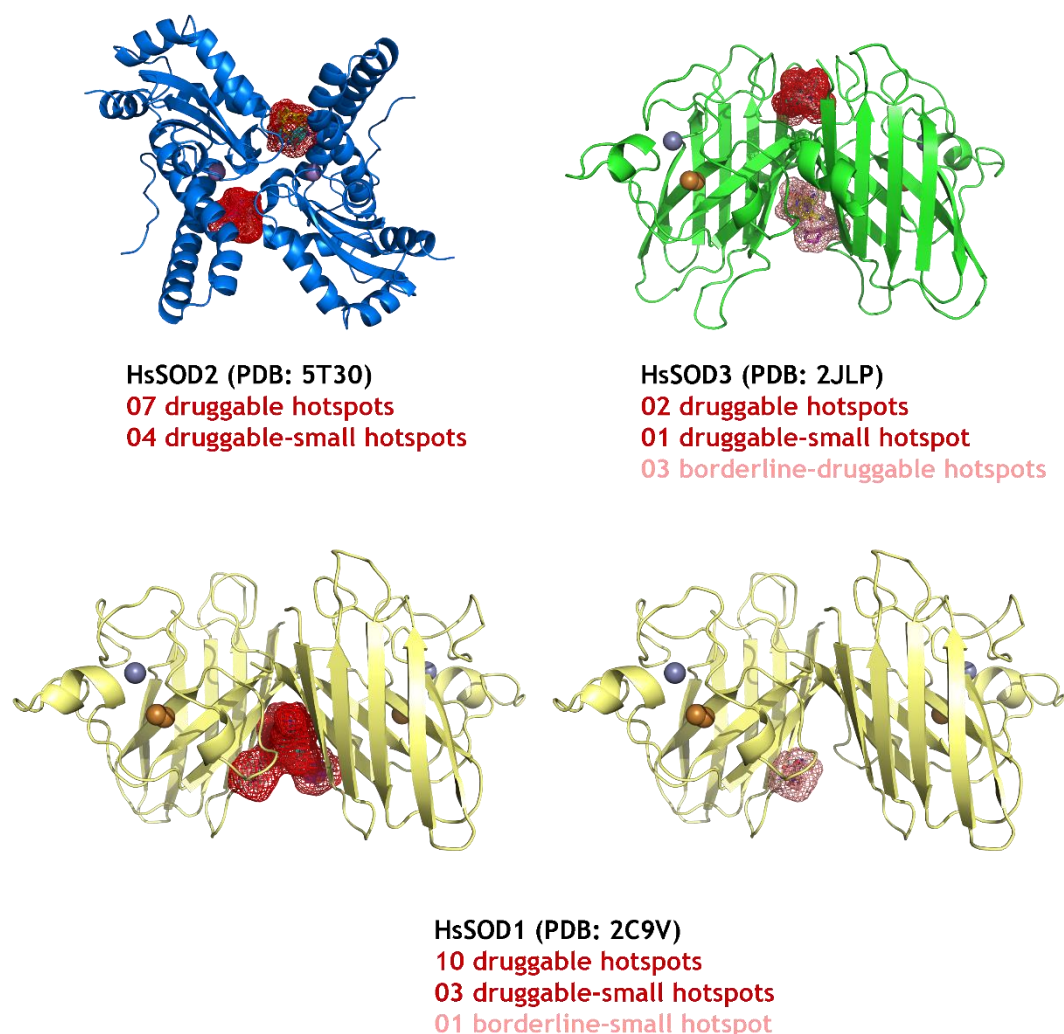
According to DrugPy, LmSOD representative structure (PDB ID: 4F2N) is predicted to display 03 druggable hotspots (D) and 5 additional hot spots that bind charged molecules with high affinity (Druggable small hotspots-Ds) (Figure 4 and Table 3S). The hotspots ranked Ds.01, and Ds.03 are contained in D.04 and D.07, whereas Ds ranked Ds.02, Ds.05 and Ds.06 are comprised in D.08. Overall, the hotspots share a number of 12 significative fractional overlaps (Fo) ($0.5 < Fo < 1.0$), which is further detailed in Table 4S.

Under the same analysis, 2 ensembles of CSs that afford Ds, 13 ensembles that afford borderline-druggable hotspots (B) and 9 ensembles that render Borderline-druggable small hot spots (Bs) could be identified on the surface of the TcSOD representative structure (PDB: 2GPC) (Figure 8 and Table 5S). The hot spots ranked as 1 and 3 (Ds) overlap between themselves and are far from the other hotspots which are clustered in the same region, as can be seen by their fractional overlap.

According to these results, developing TcSOD inhibitors that bind outside the active site would be challenging, as no high affinity pockets are available. However, one must consider that the X-ray structures chosen for this study aim to capture different points in the conformational space. Hence, it is feasible that the lack of druggable hot spots for TcSOD are a consequence of the conformation structure evaluated and not of the target per se. Overall, the hotspots share a number of 197 significant fractional overlaps (Fo) ($0.5 < Fo < 1.0$), which is further detailed in Table 6S. The representative structure of TbSOD (PDB ID: 3ESF) was also analyzed in DrugPy, and only 4 ensembles of CSs that afford Ds hot spots were identified (Figure 8 and Table 7S). Given the high sequence similarity of TcSOD and TbSOD (84%), it seems reasonable to assume that 3ESF represents the least druggable conformation of trypanosomatids' SODs. The hotspots share a number of 2 significant fractional overlaps (Fo) ($0.5 < Fo < 1.0$), which are further detailed in Table 8S.

For human SODs, as there are two metalation types, the spatial disposition and shape of the hot spots found by DrugPy is slightly more diverse. Their location and strength are shown on Figure 9 and discussed below.

Fig. 9 Distribution of hotspots (mesh) on the surface of HsSOD2 (PDB ID: 5T30; blue), HsSOD3 (PDB ID: 2JLP; green) and HsSOD1 (PDB ID: 2C9V; green) according to DrugPy. The druggable and druggable-small hotspots are shown in red and the borderline-druggable and borderline-druggable-small hotspots are shown in salmon. The SODs are depicted in cartoon and the metals are shown in spheres (Mn/Zn in purple, Cu in orange).



Based on the analysis of the representative structure of human SOD2 (PDB ID: 5T30), 7 ensembles of CSs that afford D hot spots and 4 additional ensembles that afford Ds hotspots are identified (Figure 9 and Table 9S). The best ranked hotspot (Ds) overlaps to the third (D) and fourth (Ds) with fractional overlaps (Fo) values ranging from 0.91 to 0.97, whereas all other hotspots show a moderate to high spatial overlap (0.59 to 0.94) among each other, but not to Ds.1. These hotspots are located in a pocket that allows druglike molecules to bind with high affinity. For the representative structure of human SOD3 (PDB ID: 2JLP), 2 ensembles of CSs that afford D hot spots, 1 ensemble that afford a Ds hotspot, and 3 ensembles that afford Bs hotspots were identified (Figure 9 and Table 11S). The top ranked hotspot (Ds) overlaps to the second (D, Fo = 0.55) and third (D, Fo = 0.75) hotspots, forming a distinct druggable region, while the borderline druggable hotspots (ranked fourth, fifth and sixth) also show high spatial overlap on a different region of the protein surface (Fo between 0.59 and 1.0). As for the human SOD1 representative structure (PDB: 2C9V), 10 ensembles

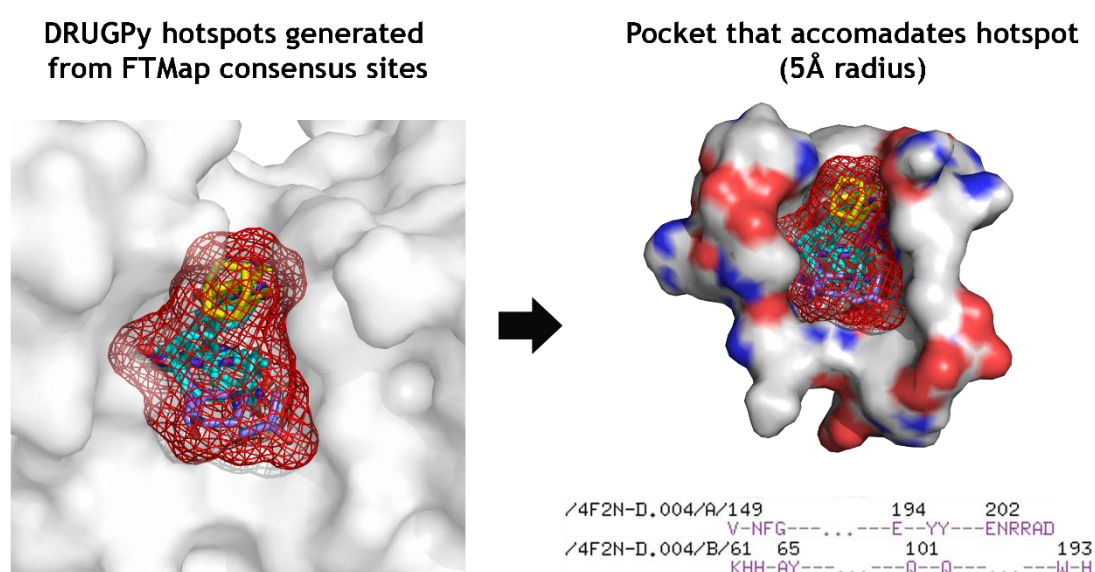
of CSs that afford druggable hotspots (D) were found, alongside 3 ensembles that afford druggable-small hotspots and 1 ensemble affording a borderline-druggable small hotspot (Figure 9 and Table 13S). The first ranked hotspot (Ds) has shown moderate to high overlap with all the other druggable (D) and druggable-small (Ds) hotspots (F_o range: 0.36 to 0.93), thus being part a of a region which this kind of hotspot are concentrated. On the other hand, the sole borderline-druggable small (Bs) site has no significant overlaps and is located on another region of the protein surface ($F_o = 0$).

The total of fractional overlaps of the hotspots of the human SODs are further detailed on Supplementary Material (Table 10S for HsSOD2, Table 12S for HsSOD3 and Table 14S for HsSOD1).

3.5 PocketMatch calculations for the superoxide dismutase pockets on DrugPy

The residues surrounding hotspots found through DrugPy were exported with PyMOL software (respecting a radius of tolerance of 5 angstroms). As there is a chance, based on how the hotspot overlap, that the residues surrounding 5 Å could be the same for more than one hotspot in a structure, the duplicate sites were not considered on the following discussions. The unique pockets were then submitted to the PocketMatch package, to evaluate their similarities based on their residue composition and electronic configuration (Nagarajan and Chandra, 2013). A graphical summary of how those pockets were obtained is shown on Figure 10.

Fig. 10 Example of how DrugPy hotspots were used to generate pockets which accommodates the residues that interact with the probes. A druggable pocket of LmSOD (PDB:4F2N) is shown on the right side, with its constituent residues.



As stated before, PocketMatch's similarity values are ranked as follows: from 0 to 0.6 (no similarity), from 0.6 to 0.79 (somewhat similar pockets) and from 0.8 to 1.0 (very similar pockets). The somewhat similar and very similar pockets range within different isoforms are discussed below and fully presented on the Supplementary material (Tables 15S to 17S).

Two similarity patterns were observed based on the P-max values obtained. One involved the pockets of Mn human isoform (HsSOD2) versus all the trypanosomatids SODs (TcSOD vs TbSOD vs LmSOD) and the other involved the pockets found on the Cu-Zn human isoforms (HsSOD1 vs HsSOD3). A summary of the number of occurrences of similar pockets found through PocketMatch is shown on Table 1 and further detailed on the Supplementary material (Tables 15S to 17S).

Table 1 Summary of the number of occurrences of SOD pockets' similarities found through PocketMatch.

Isoform 1	Isoform 2	Pocket comparison and number of occurrences of:	
		Two somewhat similar pockets	Two very similar pockets
		($0.6 \leq P\text{-max} < 0.8$)	($0.8 \leq P\text{-max}$)
TcSOD	TbSOD	65	16
	LmSOD	98	0
	HsSOD2	56	0
LmSOD	HsSOD2	48	0
TbSOD	LmSOD	23	0
	HsSOD2	22	0
HsSOD3	HsSOD1	10	0

The pockets comparison between TcSOD and TbSOD (Figure 11) was the only that yielded very similar pockets (with values of $0.8 \leq P\text{-max}$), with a P-max average of 0.83. The isoforms are also the closest evolutionary constituents of the sampling, and thus it was expected they would have similar residues on positional overlapping regions. The multiple sequence alignment with hierarchical clustering of the pockets, performed on the MultAlin server (Corpet, 1988), shows that in a 35-residue span, 02 residues have a high consensus level, being present in more of 90% of the pockets, while 20 residues have a low consensus score, which means that they are present in 50% or more of the pockets. This sequential alignment from the unique overlapping pockets on TcSOD vs TbSOD is shown on Figure 12.

Fig. 11. Graphical representation of the region of the pockets on TcSOD (PDB:2GPC) vs TbSOD (PDB: 3ESF), which share similarity (PocketMatch's $P\text{-max} \geq 0.6$). Druggable sites are shown in red-colored meshes and borderline-druggable hotspots are shown in salmon-colored meshes. The average of the P-max values (0.83) is shown on the bottom of the picture.

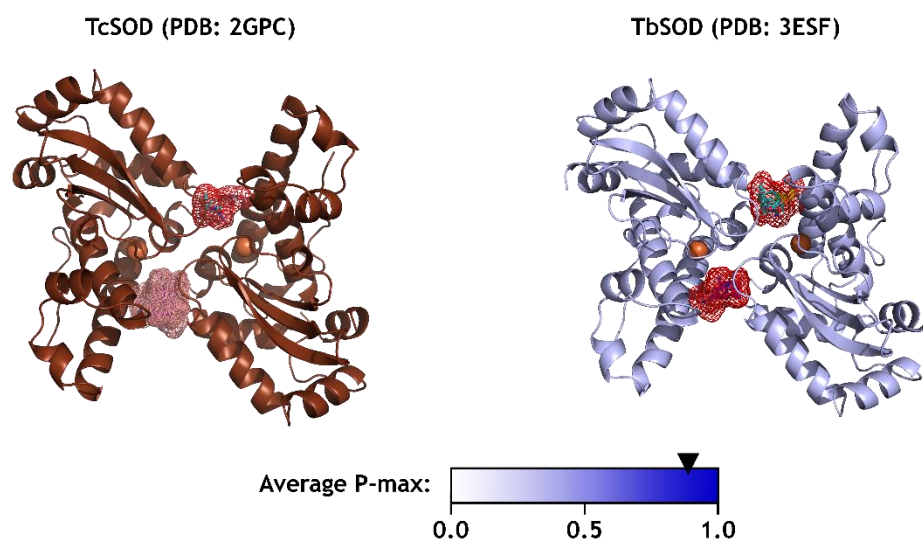
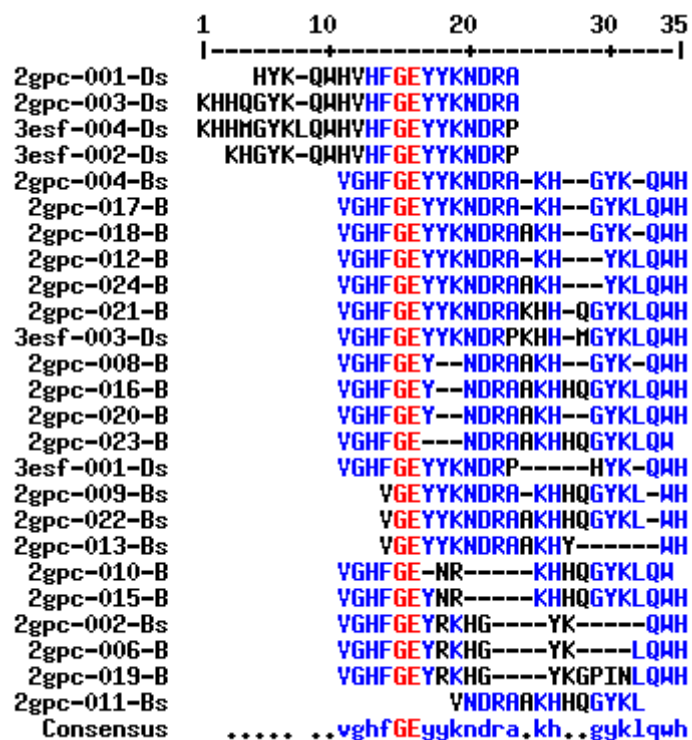


Fig. 12. Sequential alignment of the unique overlapping pockets ($P\text{-max} \geq 0.6$) of TcSOD (PDB:2GPC) vs TbSOD (PDB: 3ESF). On the bottom line, the low consensus ($>50\%$) residues are presented in blue, while the high consensus residues ($>90\%$) are shown in red.



Alternately, all the pockets found on SODs with Fe and Mn metalation (including HsSOD2) share some degree of similarity. Except for a small sized borderline-druggable pocket (from TcSOD, pocket 11-Bs), all other pockets found for TcSOD share some kind of similarity with the pockets found on TbSOD, LmSOD and HsSOD2. TbSOD pockets also shows similarities with LmSOD and HsSOD2, and similarities between pockets from LmSOD and HsSOD2 were also observed (Figure 13). Overall, they share a $P\text{-max}$ average value of 0.7.

The multiple sequence alignment of the unique overlapping pockets performed on MultAlin shows that in a 39-residue span, 02 residues have a high consensus level, being present in more of 90% of the pockets and 15 residues have a low consensus score, being present in 50% or more of the pockets. This sequential alignment from the unique overlapping pockets of HsSOD2/LmSOD/TcSOD/TbSOD is shown on Figure 14.

This result highlights how HsSOD2, which is the human SOD isoform that is closest to the trypanosomatids' SODs, is crucial in the discovery of new TrypSOD allosteric modulators, as it's configuration and energetic profile is very similar to the parasite's SODs. This way, compounds that are ineffective to human SOD2 from the get-go are more prone to be developed into species-specific TrypSOD inhibitors.

Fig. 13. Graphical representation of the region of the pockets on HsSOD2 (PDB: 5T30)/LmSOD (PDB: 4F2N)/TcSOD (PDN: 2GPC)/TbSOD (PDB: 3ESF), which share similarity (PocketMatch's $P\text{-max} \geq 0.6$). Druggable sites are shown in red-colored meshes and borderline-druggable hotspots are shown in salmon-colored meshes. The average of the $P\text{-max}$ values (0.7) is shown on the bottom of the picture.

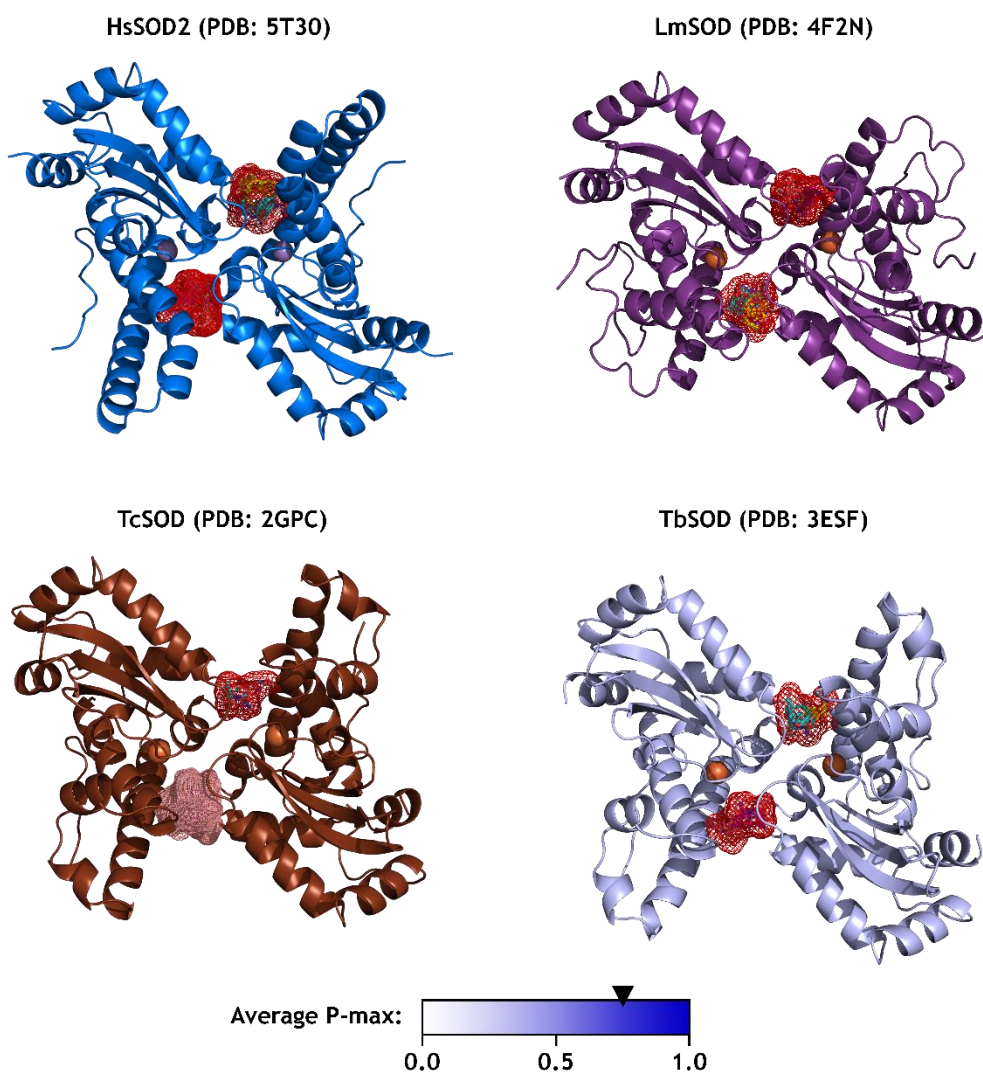


Fig. 14. Sequential alignment of the unique overlapping pockets ($P\text{-max} \geq 0.6$) of HsSOD2 (PDB: 5T30)/LmSOD (PDB: 4F2N)/TcSOD (PDN: 2GPC)/TbSOD (PDB: 3ESF). On the bottom line, the low consensus ($>50\%$) residues are presented in blue, while the high consensus ($>90\%$) are shown in red.

	1	10	20	30	39
	-----+-----+-----+-----+-----				
2gpc-001-Ds	HYK---	QWHY--	HFGEYYKNDRA		
2gpc-003-Ds	KHHQGYK---	QWHY--	HFGEYYKNDRA		
3esf-004-Ds	KHHMGYKL--	QWHY--	HFGEYYKNDRP		
3esf-002-Ds	KHGYK---	QWHY--	HFGEYYKNDRP		
4f2n-005-Ds	KHHAYQ---	QWHY--	NFGEYYENRRA		
4f2n-008-D	KHHAYQ---	QWHG	VNNFGEYYENRRA		
5t30-002-Ds	KHHAYF---	QWH---	GEYYKNVRP		
5t30-007-Ds	KHHAYF---	QWHY--	V-GEYYKNVRP		
5t30-005-D	KHHAYNLFNQWH---	Q-	GEYYKNVRP		
5t30-009-D	KHHAYNLFNQWHVGVQ-		GEYYKNVRP		
5t30-010-D	KHHAYN-FNQWHVGVQ-		GEYYKNVRP		
5t30-011-D	KHHAYNLFNQWHY-VQ-		GEYYKNVRP		
2gpc-002-Bs			VGHFGEYRKH----	GYK-----	QWH
2gpc-006-B			VGHFGEYRKH----	GYK-----	LQWH
2gpc-019-B			VGHFGEYRKH----	GYKGPINLQWH	
2gpc-010-B			VGHFGE--NRK----	HHQG-YKLQW	
2gpc-015-B			VGHFGEYNRK----	HHQG-YKLQWH	
2gpc-004-Bs			VGHFGEYYKNDRA-KH--	GYK-QWH	
2gpc-017-B			VGHFGEYYKNDRA-KH--	GYKLQWH	
2gpc-018-B			VGHFGEYYKNDRAAKH--	GYK-QWH	
2gpc-012-B			VGHFGEYYKNDRA-KH--	YKLQWH	
2gpc-024-B			VGHFGEYYKNDRAAKH--	YKLQWH	
2gpc-021-B			VGHFGEYYKNDRAKHH-Q	GYKLQWH	
3esf-003-Ds			VGHFGEYYKNDRPKHH-M	GYKLQWH	
2gpc-008-B			VGHFGEY--NDRAAKH--	GYK-QWH	
2gpc-016-B			VGHFGEY--NDRAAKHHQ	GYKLQWH	
2gpc-020-B			VGHFGEY--NDRAAKH--	GYKLQWH	
2gpc-023-B			VGHFGE--NDRAAKHHQ	GYKLQW	
3esf-001-Ds			VGHFGEYYKNDRP-----	HYK-QWH	
2gpc-009-Bs			VGEYYKNDRA-KHHQGYK-L	WH	
2gpc-022-Bs			VGEYYKNDRAAKHHQGYK-L	WH	
4f2n-001-Ds			VNFGEYYENRRA-KHH-AY	Q-QWH	
4f2n-002-Ds			GNNFGEYYENRRA-KHH-AY	Q-QWH	
4f2n-007-D			GNNFGEYYENRRADKHH-AY	Q-QWH	
4f2n-004-D			VNFGEYYENRRADKHH-AY	Q-QWH	
2gpc-013-Bs			VGEYYKNDRAAKH-----	YWH	
5t30-001-Ds			VGVSQGEYYKNVR-KHHAYN-F	NQWH	
5t30-003-D			VGVSQGEYYKNVR-KHHAYNLF	NQWH	
5t30-004-Ds			VGVSQGEYYKNVRPKHHAYN-F	NQWH	
5t30-008-D			VGVSQGEYYKNVRPKHHAYNLF	NQWH	
2gpc-011-Bs			VNDRAAKHHQGYKL		
Consensus			v.hfGEyykndra..h....	y...qwh	

As for the HsSOD3 vs HsSOD1 pockets, 03 borderline-druggable pockets from HsSOD3 have shown similarity with 06 druggable sites from HsSOD1; however, their similarity cap is 0.64, which indicates that the pockets rank very close to the beginning of the “somewhat similar” threshold of PocketMatch. No pockets were considered very similar ($0.8 \leq P\text{-max}$) between HsSOD3 and HsSOD1 (Figure 15).

The multiple sequence alignment of the unique overlapping pockets performed on MultAlin shows that in a 43-residue span, 05 residues have a high consensus level, being present in more of 90% of the pockets and 15 residues have a low consensus score, being present in 50% or more of the pockets. However, HsSOD1 crystallographic conformation favor the retrieval of pockets that involves the two chains of this isoform, when compared to HsSOD1, thus explaining the residue composition differences that were observed. This sequential alignment from the unique overlapping pockets of HsSOD3 vs HsSOD1 is shown on Figure 16.

Fig. 15. Graphical representation of the region of the pockets on HsSOD3 (PDB: 2JLP) vs HsSOD1 (PDB: 2C9V), which share similarity (PocketMatch’s $P\text{-max} \geq 0.6$). Druggable sites are shown in red-colored meshes and borderline-druggable hotspots are shown in salmon-colored meshes. The average of the $P\text{-max}$ values (0.64) is shown on the bottom of the picture

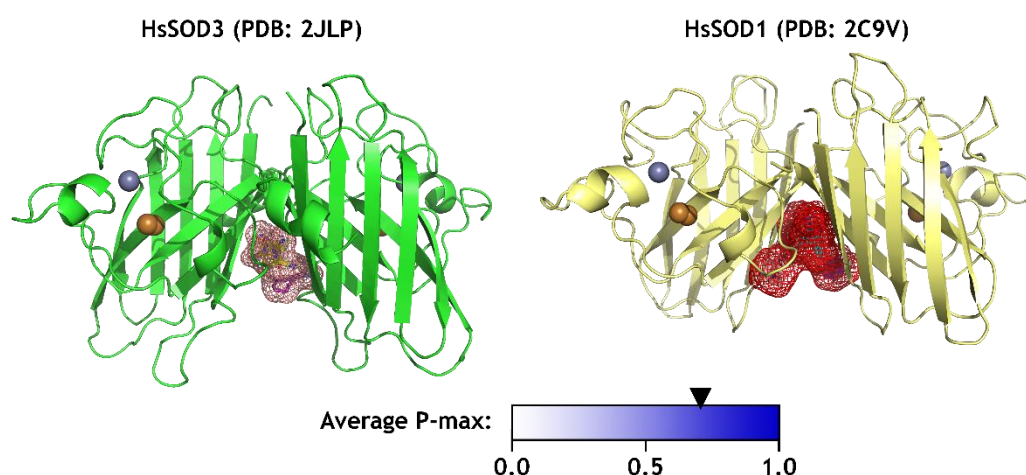


Fig. 16. Sequential alignment of the unique overlapping pockets ($P\text{-max} \geq 0.6$) of HsSOD3 (PDB: 2JLP) vs HsSOD1 (PDB: 2C9V). On the bottom line, the low consensus ($>50\%$) residues are presented in blue, while the high consensus residues ($>90\%$) are shown in red.

```

      1      10      20      30      40 43
      |-----+-----+-----+-----+-----|
2jlp-004-B      CQYQGLCCYACQYQPSAT-LGCLACCVYG
2jlp-005-B      ACQVQ-LCCYVGGYQPSATGLGCLACCV
2c9v-005-D VCVLKGDGN--GCACGVIG-CVLKGDN----TCGV
2c9v-012-D VCVLKGDGNTGCACGVIGVCVLKGDN----TCGVIG
2c9v-006-D VCVLKGDN-----TCGVIGVCVLKGDN----TCGVIG
2c9v-007-D VCVLKGN-----CGVIG-CVLKGDGNTGCACGV
2c9v-013-D VCVLKGDN-----TCGVIGVCVLKGDGNTGCACGVIG
Consensus vcvlkg... ..CgVig.Cvlkg#.....cGv.....

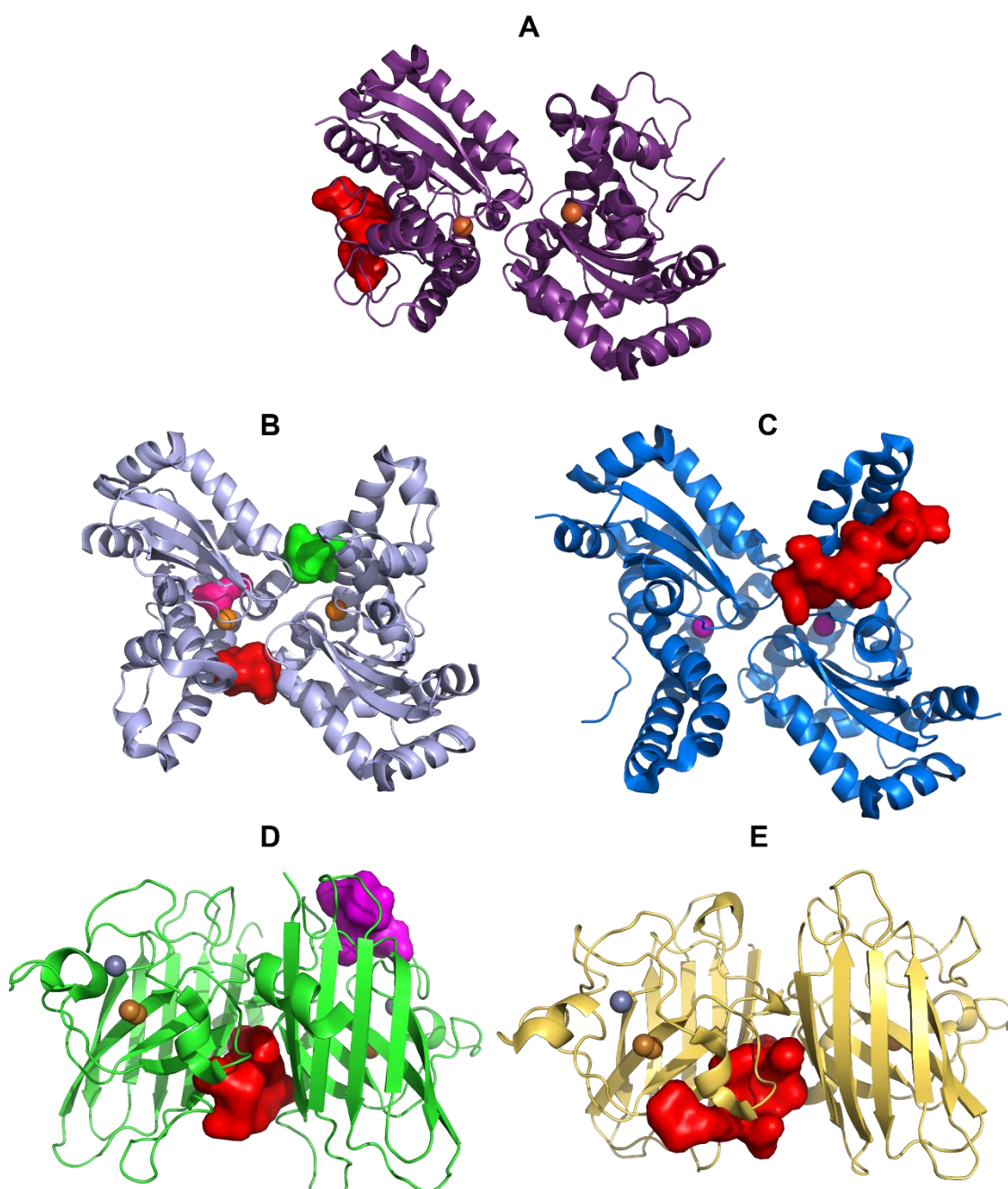
```

These values show that the pockets signaled by the PocketMatch routines were mostly conserved within superoxide dismutase isoforms of the same family, and that human SOD2, due to its similarity to the trypanosomatids SODs, has shown similar pocket/residue compositions. As the strength of the interactions of the FTMap probes is what determines DrugPy pocket characterization as druggable or borderline-druggable, the attraction of the probes to the heavily charged positive channel that attracts the superoxide ion to the SODs active site is probably stronger than all other kinds of probe interactions to this family of enzymes. Other computational methods that prioritize protein perturbation could lead to different mechanisms of modulation as those regions are less conserved. To shed light on this, an additional protein-based method of pockets prioritization is discussed next.

3.6 PocketMatch calculations for the Superoxide dismutase pockets on Allosite

The SOD representative structures were also submitted to Allosite (Huang et al., 2013) and 08 pockets were found throughout 05 of the representative structures. TcSOD is the only isoform that the server could not retrieve any significant allosteric site. The overview of the sites on their representative structures can be seen on Figure 10.

Fig. 17 Graphical representations (cartoon) of the Allosite pockets on the representative structures of superoxide dismutase enzymes. [A] *Leishmania major* SOD (PDB: 4F2N); [B] *Trypanosoma brucei* SOD (PDB: 3ESF); [C] *Homo sapiens* SOD2 (PDB: 5T30); [D] *Homo sapiens* SOD3 (PDB: 2JLP); [E] *Homo sapiens* SOD1 (PDB: 2C9V).



The server also outputs characteristics of the allosteric sites found, including its volume ($\text{\AA}^3$), its solvent-accessible surface area (SASA, $\text{\AA}^2$), druggability score (from 0 to 1) and probability of allostery (%). These values can be seen on Table 2.

Table 2 Characteristics of the allosteric sites found on the SOD representatives. The pockets column contains their PDB code, and the table shows their volume ($\text{\AA}^3$), SASA, ($\text{\AA}^2$), Druggability score and allosteric probability (%).

Pocket	Volume ($\text{\AA}^3$)	SASA ($\text{\AA}^2$)	Druggability	Allosteric probability (%)
S01-4F2N	1135.592	617.355	0.769	94.02%
S02-3ESF	560.019	362.87	0.65	95.51%
S03-3ESF	620.918	385.317	0.139	73.69%
S04-3ESF	112.353	19.507	0.84	72.41%
S05-5T30	2158.79	809.677	0.816	93.87%
S06-2C9V	1459.593	715.741	0.131	82.68%
S07-2JLP	1175.386	523.664	0.735	97.41%
S08-2JLP	645.218	329.45	0.309	89.63%

When compared to the DrugPy SOD pockets, Allosite didn't prioritize the highly conserved regions of superoxide ion attraction, thus resulting in more diverse pockets located on hydrophobic pockets or loop regions, as seen on Figure 10. To evaluate their differences, the pockets found on Allosite server were then exported and analyzed on PocketMatch software. The P-max values of the sites are shown on Table 3. Only two pocket comparisons scored P-max values > 0.6 , those being a TbSOD vs TbSOD site comparison (S02-3ESF vs S03-3ESF) and a HsSOD3 vs HsSOD1 site comparison (S06-2C9V vs S07-2JLP). All other sites were not classified as similar.

Table 3 Values of similarity (P-max > 0.6) calculated for the Allosite pockets on Pocketmatch.

Pockets	P-max							
S01-4F2N	1							
S02-3ESF	0.33	1						
S03-3ESF	0.24	0.72	1					
S04-3ESF	0.17	0.29	0.33	1				
S05-5T30	0.34	0.31	0.19	0.24	1			
S06-2C9V	0.42	0.17	0.11	0.09	0.29	1		
S07-2JLP	0.34	0.11	0.05	0.06	0.30	0.62	1	
S08-2JLP	0.41	0.36	0.24	0.18	0.47	0.34	0.35	1
	S01-4F2N	S02-3ESF	S03-3ESF	S04-3ESF	S05-5T30	S06-2C9V	S07-2JLP	S08-2JLP

Conclusion

As an approach to understand the possibilities of superoxide dismutase (SOD) modulation in trypanosomatids target due to its importance as a validated target to the parasites' survival on its virulence stage to the hosts defense mechanisms, we proposed a computational workflow which can be used to characterize SODs modulable pockets through interspecies similarity studies, solvent mapping or feature-based regression and perturbation-based method, druggability scores based on probes' strength and clustering pattern and binding pockets comparison based on residue nature and interatomic distances. On this scenario, three major families of SODs were characterized: human Cu-Zn SODs, human Mn SODs and trypanosomatids SODs. The overall routine corroborates that the similarities of human SOD2 (MnSOD) and trypanosomatids FeSOD is sufficient to grant similar allosteric sites spatial positions while maintaining similar interatomic configurations, thus highlighting MnSOD ineffectiveness as an important factor for the discovery of successful trypanosomatids' superoxide dismutase modulators. This study highlights how conserved the most energetically favorable sites on superoxide dismutases are, and how allosteric modulation outside the SODs positively charged substrate channel could be useful as it shares way less features per isoform thus resulting in more selective allosteric SOD modulators.

References

- Azadmanesh, J., Borgstahl, G., 2018. A Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase. *Antioxidants* 7, 25. <https://doi.org/10.3390/antiox7020025>
- Bahrami, A., Mohebbali, M., Reisi Nafchi, H., Raoofian, R., Kazemirad, E., Hajjaran, H., 2022. Overexpression of Iron Super Oxide Dismutases A/B Genes Are Associated with Antimony Resistance of *Leishmania tropica* Clinical Isolates. *Iran J Parasitol* 17, 473–482. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v17i4.11273>
- Banci, L., Bertini, I., Cramaro, F., Del Conte, R., Viezzoli, M.S., 2002. The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 269, 1905–1915. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02840.x>
- Boike, L., Henning, N.J., Nomura, D.K., 2022. Advances in covalent drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 21, 881–898. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00542-z>
- Brito, S.P., Fuentes Ferreira, A., Lima, M., Ramos Jr, A., 2022. Mortality from neglected tropical diseases in the state of Piauí, Northeast Brazil: temporal trend and spatial patterns, 2001-2018. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 31, e2021732. <https://doi.org/10.1590/S1679-49742022000100014>
- Capewell, P., Atkins, K., Weir, W., Jamonneau, V., Camara, M., Clucas, C., Swar, N.-R.K., Ngoyi, D.M., Rotureau, B., Garside, P., Galvani, A.P., Bucheton, B., MacLeod, A., 2019. Resolving the apparent transmission paradox of African sleeping sickness. *PLoS Biol* 17, e3000105. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000105>
- Charlton, R.L., Rossi-Bergmann, B., Denny, P.W., Steel, P.G., 2018. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology* 145, 219–236. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000993>
- Choi, H.L., Jain, S., Postigo, J.A.R., Borisch, B., Dagne, D.A., 2021. The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15, e0009181. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009181>
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Danielsson, J., Kurnik, M., Lang, L., Oliveberg, M., 2011. Cutting Off Functional Loops from Homodimeric Enzyme Superoxide Dismutase 1 (SOD1) Leaves Monomeric β -Barrels. *Journal of Biological Chemistry* 286, 33070–33083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251223>
- Doñate, F., Juarez, J.C., Burnett, M.E., Manuia, M.M., Guan, X., Shaw, D.E., Smith, E.L.P., Timucin, C., Braunstein, M.J., Batuman, O.A., Mazar, A.P., 2008. Identification of biomarkers for the antiangiogenic and antitumour activity of the superoxide dismutase 1 (SOD1) inhibitor tetrathiomolybdate (ATN-224). *Br J Cancer* 98, 776–783. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604226>
- Drugs for Neglected Diseases initiative, Dnd., n.d. Towards a new generation of treatments for leishmaniasis.

- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Egbert, M., Jones, G., Collins, M.R., Kozakov, D., Vajda, S., 2022. FTMove: A Web Server for Detection and Analysis of Cryptic and Allosteric Binding Sites by Mapping Multiple Protein Structures. *Journal of Molecular Biology, Computation Resources for Molecular Biology* 434, 167587. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167587>
- García-Huertas, P., Cardona-Castro, N., 2021. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants, and targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 142, 112020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>
- Getachew, F., Gedamu, L., 2012. Leishmania donovani mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Molecular and Biochemical Parasitology* 183, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.01.005>
- Grant, B.J., Rodrigues, A.P.C., ElSawy, K.M., McCammon, J.A., Caves, L.S.D., 2006. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* 22, 2695–2696. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl461>
- Hall, D.R., Enyedy, I.J., 2015. Computational solvent mapping in structure-based drug design. *Future Med Chem* 7, 337–353. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.155>
- Hart, P.J., Balbirnie, M.M., Ogiwara, N.L., Nersissian, A.M., Weiss, M.S., Valentine, J.S., Eisenberg, D., 1999. A Structure-Based Mechanism for Copper–Zinc Superoxide Dismutase. *Biochemistry* 38, 2167–2178. <https://doi.org/10.1021/bi982284u>
- Horn, D., 2022. A profile of research on the parasitic trypanosomatids and the diseases they cause. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16, e0010040. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010040>
- Huang, W., Lu, S., Huang, Z., Liu, X., Mou, L., Luo, Y., Zhao, Y., Liu, Y., Chen, Z., Hou, T., Zhang, J., 2013. Allosite: a method for predicting allosteric sites. *Bioinformatics* 29, 2357–2359. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt399>
- Hulpia, F., Bouton, J., Campagnaro, G.D., Alfayez, I.A., Mabilie, D., Maes, L., De Koning, H.P., Caljon, G., Van Calenbergh, S., 2020. C6–O-alkylated 7-deazainosine nucleoside analogues: Discovery of potent and selective anti-sleeping sickness agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 188, 112018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112018>
- Kennedy, P.G.E., 2019. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *J Neurol* 266, 2334–2337. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09425-7>

- Kozakov, D., Grove, L.E., Hall, D.R., Bohnuud, T., Mottarella, S.E., Luo, L., Xia, B., Beglov, D., Vajda, S., 2015. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nat Protoc* 10, 733–755. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>
- Landon, M.R., Lancia, D.R., Yu, J., Thiel, S.C., Vajda, S., 2007. Identification of Hot Spots within Druggable Binding Regions by Computational Solvent Mapping of Proteins. *J. Med. Chem.* 50, 1231–1240. <https://doi.org/10.1021/jm061134b>
- Lee, J., Park, S.B., 2022. Extended Applications of Small-Molecule Covalent Inhibitors toward Novel Therapeutic Targets. *Pharmaceuticals* 15, 1478. <https://doi.org/10.3390/ph15121478>
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* 7, 458711. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lindberg, M.J., Normark, J., Holmgren, A., Oliveberg, M., 2004. Folding of human superoxide dismutase: Disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15893–15898. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403979101>
- Lushchak, V., Semchyshyn, H., Lushchak, O., Mandryk, S., 2005. Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 1739–1744. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.147>
- Mendonça, L.M.F., Marana, S.R., 2011. Single mutations outside the active site affect the substrate specificity in a β -glycosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814, 1616–1623. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.012>
- Nagarajan, D., Chandra, N., 2013. PocketMatch (version 2.0): A parallel algorithm for the detection of structural similarities between protein ligand binding-sites, in: 2013 National Conference on Parallel Computing Technologies (PARCOMPTECH). Presented at the 2013 National Conference on Parallel Computing Technologies (PARCOMPTECH), IEEE, Bangalore, India, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1109/ParCompTech.2013.6621397>
- Olmo, F., Urbanová, K., Rosales, M.J., Martín-Escolano, R., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., 2015. An in vitro iron superoxide dismutase inhibitor decreases the parasitemia levels of *Trypanosoma cruzi* in BALB/c mouse model during acute phase. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.002>

- Perry, J.J.P., Shin, D.S., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>
- Rakhit, R., Chakrabartty, A., 2006. Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1762, 1025–1037. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.004>
- Saen-Oon, S., Ghanem, M., Schramm, V.L., Schwartz, S.D., 2008. Remote Mutations and Active Site Dynamics Correlate with Catalytic Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase. *Biophys J* 94, 4078–4088. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121913>
- Santi, A.M.M., Murta, S.M.F., 2022. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 117, e210401. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210401>
- Santi, A.M.M., Silva, P.A., Santos, I.F.M., Murta, S.M.F., 2021. Downregulation of FeSOD-A expression in *Leishmania infantum* alters trivalent antimony and miltefosine susceptibility. *Parasites & Vectors* 14, 366. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04838-8>
- Sasidharan, S., Saudagar, P., 2021. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitol Res* 120, 1541–1554. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>
- Song, K., Liu, X., Huang, W., Lu, S., Shen, Q., Zhang, L., Zhang, J., 2017. Improved Method for the Identification and Validation of Allosteric Sites. *J. Chem. Inf. Model.* 57, 2358–2363. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00014>
- Souza, B.C. de, Lacerda, P.S., Pita, S.S. da R., Kato, R.B., Leite, F.H.A., 2021. Identification of potential *Leishmania chagasi* superoxide dismutase allosteric modulators by structure-based computational approaches: homology modelling, molecular dynamics and pharmacophore-based virtual screening. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 39, 7000–7016. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1804453>
- Spaulding, A., Gallerstein, M.F., Ferrins, L., 2019. Drug Discovery and Development for Human African Trypanosomiasis, in: *Neglected Tropical Diseases*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 115–137. <https://doi.org/10.1002/9783527808656.ch5>
- Sundar, S., Singh, B., 2018. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 22, 467–486. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241>
- Sutanto, F., Konstantinidou, M., Dömling, A., 2020. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC Med Chem* 11, 876–884. <https://doi.org/10.1039/d0md00154f>

- Teixeira, O., Lacerda, P., Froes, T.Q., Nonato, M.C., Castilho, M.S., 2021. Druggable hot spots in trypanothione reductase: novel insights and opportunities for drug discovery revealed by DRUGpy. *J Comput Aided Mol Des* 35, 871–882. <https://doi.org/10.1007/s10822-021-00403-8>
- Tessarollo, N.G., Andrade, J.M., Moreira, D.S., Murta, S.M.F., 2015. Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasitology International* 64, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.11.001>
- Veronica, J., Chandrasekaran, S., Dayakar, A., Devender, M., Prajapati, V.K., Sundar, S., Maurya, R., 2019. Iron superoxide dismutase contributes to miltefosine resistance in *Leishmania donovani*. *The FEBS Journal* 286, 3488–3503. <https://doi.org/10.1111/febs.14923>
- Wah Tan, Z., Tee, W.-V., Berezovsky, I.N., 2022. Learning About Allosteric Drugs and Ways to Design Them. *Journal of Molecular Biology* 434, 167692. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167692>
- Wakefield, A.E., Kozakov, D., Vajda, S., 2022. Mapping the binding sites of challenging drug targets. *Current Opinion in Structural Biology* 75, 102396. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102396>
- WHO, W.H.O., 2022. Leishmaniasis [WWW Document]. Leishmaniasis. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed 11.27.22).
- Xu, D., Meisburger, S.P., Ando, N., 2021. Correlated Motions in Structural Biology. *Biochemistry* 60, 2331–2340. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00420>
- Zheng, M., Liu, Y., Zhang, G., Yang, Z., Xu, W., Chen, Q., 2023. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants* 12, 1675. <https://doi.org/10.3390/antiox12091675>

Supplementary material

Table 1S Superoxide dismutase enzymes returned from PDB in previously described search requirements (Dataset A).

PDB Code	Organism	Resolution (Å)
1HL4	<i>Homo sapiens</i>	1.82 Å
1HL5	<i>Homo sapiens</i>	1.80 Å
1N0J	<i>Homo sapiens</i>	2.20 Å
1PU0	<i>Homo sapiens</i>	1.70 Å
2ADQ	<i>Homo sapiens</i>	2.40 Å
2C9S	<i>Homo sapiens</i>	1.24 Å
2C9U	<i>Homo sapiens</i>	1.24 Å
2C9V	<i>Homo sapiens</i>	1.07 Å
2GPC	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1.90 Å
2JLP	<i>Homo sapiens</i>	1.70 Å
2V0A	<i>Homo sapiens</i>	1.15 Å
3ESF	<i>Trypanosoma brucei</i>	2.01 Å
4B3E	<i>Homo sapiens</i>	2.15 Å
4DVH	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2.23 Å
4F2N	<i>Leishmania major</i>	1.85 Å
4FF9	<i>Homo sapiens</i>	2.50 Å
4H3E	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2.25 Å
5T30	<i>Homo sapiens</i>	1.77 Å
5VF9	<i>Homo sapiens</i>	1.82 Å
5YTO	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å
6A9O	<i>Homo sapiens</i>	2.50 Å

Table 2S Superoxide dismutase enzymes returned from PDB in previously described search requirements (Dataset B).

PDB Code	Organism	Resolution (Å)	Exclusion
1AP5	<i>Homo sapiens</i>	2.20 Å	Mutant
1AP6	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	Mutant
1EM1	<i>Homo sapiens</i>	2.13 Å	Mutant
1HL4	<i>Homo sapiens</i>	1.82 Å	
1HL5	<i>Homo sapiens</i>	1.80 Å	
1JA8	<i>Homo sapiens</i>	2.12 Å	Mutant
1LUV	<i>Homo sapiens</i>	1.85 Å	Mutant
1LUW	<i>Homo sapiens</i>	2.30 Å	Mutant
1MSD	<i>Homo sapiens</i>	3.20 Å	Mutant
1N0J	<i>Homo sapiens</i>	2.20 Å	
1N0N	<i>Homo sapiens</i>	1.82 Å	Mutant
1OZU	<i>Homo sapiens</i>	1.30 Å	Mutant
1PL4	<i>Homo sapiens</i>	1.47 Å	Mutant
1PM9	<i>Homo sapiens</i>	1.70 Å	Mutant
1PU0	<i>Homo sapiens</i>	1.70 Å	
1QNM	<i>Homo sapiens</i>	2.30 Å	Mutant
1SPD	<i>Homo sapiens</i>	2.40 Å	Mutant
1SZX	<i>Homo sapiens</i>	1.95 Å	Mutant
1UXL	<i>Homo sapiens</i>	1.60 Å	Mutant
1UXM	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	Mutant
1VAR	<i>Homo sapiens</i>	2.50 Å	Mutant
1XDC	<i>Homo sapiens</i>	1.85 Å	Mutant
1XIL	<i>Homo sapiens</i>	1.53 Å	Mutant
1ZSP	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	Mutant

Table 2S Superoxide dismutase enzymes returned from PDB in previously described search requirements (Dataset B) (cont.)

PDB Code	Organism	Resolution (Å)	Exclusion
1ZTE	<i>Homo sapiens</i>	1.85 Å	Mutant
1ZUQ	<i>Homo sapiens</i>	2.00 Å	Mutant
2ADP	<i>Homo sapiens</i>	2.40 Å	Mutant
2ADQ	<i>Homo sapiens</i>	2.40 Å	
2C9S	<i>Homo sapiens</i>	1.24 Å	
2C9U	<i>Homo sapiens</i>	1.24 Å	
2C9V	<i>Homo sapiens</i>	1.07 Å	
2GDS	<i>Homo sapiens</i>	2.30 Å	Mutant
2GPC	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1.90 Å	
2JLP	<i>Homo sapiens</i>	1.70 Å	
2NAM	<i>Homo sapiens</i>	-	Solution NMR
2P4K	<i>Homo sapiens</i>	1.48 Å	Mutant
2QKA	<i>Homo sapiens</i>	2.20 Å	Mutant
2QKC	<i>Homo sapiens</i>	2.30 Å	Mutant
2V0A	<i>Homo sapiens</i>	1.15 Å	
2WKO	<i>Homo sapiens</i>	1.97 Å	Mutant
2WYT	<i>Homo sapiens</i>	1.00 Å	Mutant
2WYZ	<i>Homo sapiens</i>	1.70 Å	Mutant
2WZ0	<i>Homo sapiens</i>	1.72 Å	Mutant
2WZ5	<i>Homo sapiens</i>	1.50 Å	Mutant
2WZ6	<i>Homo sapiens</i>	1.55 Å	Mutant
2ZKY	<i>Homo sapiens</i>	2.40 Å	Mutant
3C3S	<i>Homo sapiens</i>	2.50 Å	Mutant
3C3T	<i>Homo sapiens</i>	2.20 Å	Mutant

Table 2S Superoxide dismutase enzymes returned from PDB in previously described search requirements (Dataset B) (cont.)

PDB Code	Organism	Resolution (Å)	Exclusion
3ECU	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	No metalations
3ECV	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	Mutant
3ECW	<i>Homo sapiens</i>	2.15 Å	Mutant
3ESF	<i>Trypanosoma brucei</i>	2.01 Å	
3GZO	<i>Homo sapiens</i>	2.10 Å	Mutant
3GZP	<i>Homo sapiens</i>	3.10 Å	Mutant
3KH3	<i>Homo sapiens</i>	3.50 Å	Mutant
3KH4	<i>Homo sapiens</i>	3.50 Å	Mutant
3RE0	<i>Homo sapiens</i>	2.28 Å	No metalation
3T5W	<i>Homo sapiens</i>	1.80 Å	Mutant
4A7G	<i>Homo sapiens</i>	1.24 Å	Mutant
4A7Q	<i>Homo sapiens</i>	1.22 Å	Mutant
4A7S	<i>Homo sapiens</i>	1.06 Å	Mutant
4A7T	<i>Homo sapiens</i>	1.45 Å	Mutant
4A7U	<i>Homo sapiens</i>	0.98 Å	Mutant
4A7V	<i>Homo sapiens</i>	1.00 Å	Mutant
4B3E	<i>Homo sapiens</i>	2.15 Å	
4DVH	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2.23 Å	
4F2N	<i>Leishmania major</i>	1.85 Å	
4FF9	<i>Homo sapiens</i>	2.50 Å	
4H3E	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2.25 Å	
5GXO	<i>Homo sapiens</i>	2.30 Å	Mutant
5K02	<i>Homo sapiens</i>	1.99 Å	Mutant
5O3Y	<i>Homo sapiens</i>	1.30 Å	Mutant

Table 2S Superoxide dismutase enzymes returned from PDB in previously described search requirements (Dataset B) (cont.)

PDB Code	Organism	Resolution (Å)	Exclusion
5O40	<i>Homo sapiens</i>	1.50 Å	Mutant
5T30	<i>Homo sapiens</i>	1.77 Å	
5VF9	<i>Homo sapiens</i>	1.82 Å	
5YTO	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	
5YTU	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	No metalation
5YUL	<i>Homo sapiens</i>	1.90 Å	No metalation
6A9O	<i>Homo sapiens</i>	2.50 Å	
6FFK	<i>Homo sapiens</i>	1.94 Å	No metalation
6SPA	<i>Homo sapiens</i>	1.65 Å	Mutant
6SPH	<i>Homo sapiens</i>	2.25 Å	Mutant
6SPI	<i>Homo sapiens</i>	2.80 Å	Mutant
6SPJ	<i>Homo sapiens</i>	1.97 Å	Mutant
6SPK	<i>Homo sapiens</i>	2.77 Å	Mutant

Table 3S Pockets predicted by DrugPy for the LmSOD representative structure. Their class, sum of probes strength (S), initial cluster strength (S0), center-to-center cluster distance (CD) and maximum distance (MD) are described.

Pocket	Class	S	S0	CD	MD
4F2N-Ds.001	Druggable small	30	30	0	8.79
4F2N-Ds.002	Druggable small	26	26	0	8.96
4F2N-Ds.003	Druggable small	42	30	4.05	9.94
4F2N-D.004	Druggable	35	30	3.34	10.63
4F2N-Ds.005	Druggable small	37	26	4.23	9.77
4F2N-Ds.006	Druggable small	33	26	3.21	8.96
4F2N-D.007	Druggable	47	30	6.27	10.63
4F2N-D.008	Druggable	44	26	5.9	10.06

Table 4S Fractional overlap of the DrugPy pockets from LmSOD (PDB: 4F2N).

Pocket:	Fractional overlap							
4F2N-Ds.001	1							
4F2N-Ds.002	0	1						
4F2N-Ds.003	0.97	0	1					
4F2N-D.004	0.95	0	0.96	1				
4F2N-Ds.005	0	0.96	0	0	1			
4F2N-Ds.006	0	0.99	0	0	0.99	1		
4F2N-D.007	0.94	0	0.97	0.96	0	0	1	
4F2N-D.008	0	0.97	0	0	0.99	0.96	0	1
	4F2N-Ds.001	4F2N-Ds.002	4F2N-Ds.003	4F2N-D.004	4F2N-Ds.005	4F2N-Ds.006	4F2N-D.007	4F2N-D.008

Table 5S Pockets predicted by DrugPy for the TcSOD representative structure. Their class, sum of probes strength (S), initial cluster strength (S0), center-to-center cluster distance (CD) and maximum distance (MD) are described.

Pocket	Class	S	S0	CD	MD
2GPC-Ds.001	Druggable small	17	17	0	7.44
2GPC-Bs.002	Borderline-druggable small	15	15	0	7.68
2GPC-Ds.003	Druggable small	25	17	4.8	8.54
2GPC-Bs.004	Borderline-druggable small	30	15	4.68	9.35
2GPC-Bs.005	Borderline-druggable small	29	15	3.94	8.92
2GPC-B.006	Borderline druggable	20	15	6.06	11.11
2GPC-Bs.007	Borderline-druggable small	19	15	2.87	8.59
2GPC-B.008	Borderline druggable	17	15	6.96	10.32
2GPC-Bs.009	Borderline-druggable small	29	15	5.19	9.63
2GPC-B.010	Borderline druggable	19	15	5.99	10.21
2GPC-Bs.011	Borderline-druggable small	17	15	5.81	9.63
2GPC-B.012	Borderline druggable	18	14	5.7	10.77
2GPC-Bs.013	Borderline-druggable small	16	14	4.92	8.73
2GPC-Bs.014	Borderline-druggable small	44	15	5.19	9.63
2GPC-B.015	Borderline druggable	34	15	5.99	10.21
2GPC-B.016	Borderline druggable	32	15	6.96	10.32
2GPC-B.017	Borderline druggable	33	15	5.7	10.77
2GPC-B.018	Borderline druggable	31	15	6.96	10.32
2GPC-B.019	Borderline druggable	24	15	6.06	11.11
2GPC-B.020	Borderline druggable	21	15	6.96	10.32
2GPC-B.021	Borderline druggable	33	15	5.99	10.77
2GPC-Bs.022	Borderline-druggable small	31	15	5.81	9.63
2GPC-B.023	Borderline druggable	21	15	6.94	10.27
2GPC-B.024	Borderline druggable	20	14	6.94	10.77

Table 6S Fractional overlap of the DrugPy pockets from TcSOD (PDB: 2GPC).

Pocket	FO											
2GPC-Ds.001	1											
2GPC-Bs.002	0	1										
2GPC-Ds.003	0.7	0	1									
2GPC-Bs.004	0	0.92	0	1								
2GPC-Bs.005	0	0.60	0	0.64	1							
2GPC-B.006	0	0.74	0	0.74	0.74	1						
2GPC-Bs.007	0	0.94	0	0.94	0.94	0.98	1					
2GPC-B.008	0	0.86	0	0.87	0.87	0.86	0.86	1				
2GPC-Bs.009	0	0.51	0	0.63	0.98	0.51	0.51	0.53	1			
2GPC-B.010	0	0.82	0	0.94	0.90	0.86	0.88	0.83	0.76	1		
2GPC-Bs.011	0	0.72	0	0.86	0.82	0.72	0.72	0.88	0.88	0.86	1	
2GPC-B.012	0	0.31	0	0.37	0.94	0.35	0.37	0.32	0.74	0.41	0.14	1
2GPC-Bs.013	0	0.12	0	0.21	0.85	0.12	0.12	0.29	0.87	0.18	0.32	0.85
2GPC-Bs.014	0	0.68	0	0.76	0.98	0.68	0.68	0.69	0.81	0.75	0.46	0.90
2GPC-B.015	0	0.90	0	0.97	0.95	0.92	0.93	0.91	0.63	0.99	0.49	0.87
2GPC-B.016	0	0.85	0	0.93	0.91	0.85	0.85	0.94	0.68	0.92	0.61	0.79
2GPC-B.017	0	0.63	0	0.66	0.97	0.65	0.66	0.63	0.61	0.67	0.15	0.99
2GPC-B.018	0	0.55	0	0.60	0.93	0.55	0.55	0.64	0.66	0.57	0.25	0.91
2GPC-B.019	0	0.75	0	0.75	0.75	0.98	0.89	0.75	0.28	0.88	0.10	0.87
2GPC-B.020	0	0.84	0	0.85	0.85	0.87	0.89	0.95	0.34	0.89	0.22	0.88
2GPC-B.021	0	0.55	0	0.65	0.94	0.57	0.58	0.56	0.86	0.67	0.52	0.88
2GPC-Bs.022	0	0.47	0	0.59	0.90	0.47	0.47	0.56	0.93	0.57	0.65	0.79
2GPC-B.023	0	0.73	0	0.84	0.81	0.76	0.78	0.85	0.69	0.89	0.78	0.72
2GPC-B.024	0	0.27	0	0.34	0.83	0.30	0.33	0.40	0.67	0.37	0.25	0.89
	2GPC-Ds.001	2GPC-Bs.002	2GPC-Ds.003	2GPC-Bs.004	2GPC-Bs.005	2GPC-B.006	2GPC-Bs.007	2GPC-B.008	2GPC-Bs.009	2GPC-B.010	2GPC-Bs.011	2GPC-B.012

Table 6S Fractional overlap of the DrugPy pockets from TcSOD (PDB: 2GPC) (cont.)

Pocket	FO											
2GPC-Ds.001												
2GPC-Bs.002												
2GPC-Ds.003												
2GPC-Bs.004												
2GPC-Bs.005												
2GPC-B.006												
2GPC-Bs.007												
2GPC-B.008												
2GPC-Bs.009												
2GPC-B.010												
2GPC-Bs.011												
2GPC-B.012												
2GPC-Bs.013	1											
2GPC-Bs.014	0.69	1										
2GPC-B.015	0.49	0.97	1									
2GPC-B.016	0.59	0.94	0.93	1								
2GPC-B.017	0.58	0.97	0.69	0.67	1							
2GPC-B.018	0.70	0.93	0.60	0.68	0.93	1						
2GPC-B.019	0.25	0.75	0.89	0.75	0.89	0.75	1					
2GPC-B.020	0.39	0.86	0.90	0.95	0.90	0.95	0.89	1				
2GPC-B.021	0.74	0.96	0.69	0.66	0.98	0.94	0.58	0.60	1			
2GPC-Bs.022	0.87	0.93	0.59	0.67	0.90	0.98	0.47	0.56	0.93	1		
2GPC-B.023	0.61	0.85	0.89	0.95	0.86	0.92	0.78	0.91	0.91	0.79	1	
2GPC-B.024	0.78	0.84	0.39	0.46	0.89	0.94	0.33	0.46	0.90	0.78	0.49	1
	2GPC-Bs.013	2GPC-Bs.014	2GPC-B.015	2GPC-B.016	2GPC-B.017	2GPC-B.018	2GPC-B.019	2GPC-B.020	2GPC-B.021	2GPC-Bs.022	2GPC-B.023	2GPC-B.024

Table 7S Pockets predicted by DrugPy for the TbSOD representative structure. Their class, sum of probes strength (S), initial cluster strength (S0), center-to-center cluster distance (CD) and maximum distance (MD) are described.

Pocket	Class	S	S0	CD	MD
3ESF-Ds.001	Druggable small	28	28	0	9.09
3ESF-Ds.002	Druggable small	24	24	0	7.58
3ESF-Ds.003	Druggable small	43	28	4.37	9.15
3ESF-Ds.004	Druggable small	38	24	4.54	9.29

Table 8S Fractional overlap of the DrugPy pockets of the TbSOD (PDB: 3ESF). The druggable sites are shown in red meshes, with their constituent probes shown as sticks.

Pocket	Fractional overlap:			
3ESF-Ds.001	1			
3ESF-Ds.002	0	1		
3ESF-Ds.003	0.52	0	1	
3ESF-Ds.004	0	0.99	0	1
	3ESF-Ds.001	3ESF-Ds.001	3ESF-Ds.001	3ESF-Ds.001

Table 9S Pockets predicted by DrugPy for the HsSOD2 representative structure. Their class, sum of probes strength (S), initial cluster strength (S0), center-to-center cluster distance (CD) and maximum distance (MD) are described.

Pocket	Class	S	S0	CD	MD
5T30-Ds.001	Druggable small	32	32	0	9.91
5T30-Ds.002	Druggable small	28	28	0	8.21
5T30-D.003	Druggable	43	32	4.87	11.32
5T30-Ds.004	Druggable small	35	32	3.65	9.91
5T30-D.005	Druggable	35	28	4.56	10.43
5T30-D.006	Druggable	33	28	4.69	11.11
5T30-Ds.007	Druggable small	32	28	3.6	8.42
5T30-D.008	Druggable	46	32	4.87	11.32
5T30-D.009	Druggable	40	28	4.69	11.11
5T30-D.010	Druggable	39	28	4.56	10.43
5T30-D.011	Druggable	37	28	5.58	11.11

Table 10S. Fractional overlap of the DrugPy pockets from HsSOD2 (PDB: 5T30).

Pocket	Fractional overlap										
5T30-Ds.001	1										
5T30-Ds.002	0	1									
5T30-D.003	0.91	0	1								
5T30-Ds.004	0.96	0	0.97	1							
5T30-D.005	0	0.55	0	0	1						
5T30-D.006	0	0.93	0	0	0.95	1					
5T30-Ds.007	0	0.94	0	0	0.94	0.94	1				
5T30-D.008	0.55	0	0.96	0.92	0	0	0	1			
5T30-D.009	0	0.51	0	0	0.96	0.55	0.51	0	1		
5T30-D.010	0	0.52	0	0	0.95	0.53	0.57	0	0.95	1	
5T30-D.011	0	0.59	0	0	0.91	0.95	0.94	0	0.95	0.96	1
	5T30-Ds.001	5T30-Ds.002	5T30-D.003	5T30-Ds.004	5T30-D.005	5T30-D.006	5T30-Ds.007	5T30-D.008	5T30-D.009	5T30-D.010	5T30-D.011

Table 11S Pockets predicted by DrugPy for the HsSOD3 representative structure. Their class, sum of probes strength (S), initial cluster strength (S0), center-to-center cluster distance (CD) and maximum distance (MD) are described.

Pocket	Class	S	S0	CD	MD
2JLP-Ds.001	Druggable small	17	17	0	8.35
2JLP-D.002	Druggable	27	17	4.46	12.05
2JLP-D.003	Druggable	25	17	5.95	13.18
2JLP-B.004	Borderline druggable	26	14	6.33	10.51
2JLP-B.005	Borderline druggable	22	14	6.97	10.45
2JLP-B.006	Borderline druggable	34	14	6.97	10.51

Table 12S Fractional overlap of the DrugPy pockets from HsSOD3 (PDB: 2JLP).

Site:	Fractional Overlap					
2JLP-Ds.001	1					
2JLP-D.002	0.55	1				
2JLP-D.003	0.75	0.75	1			
2JLP-B.004	0	0	0	1		
2JLP-B.005	0	0	0	1	1	
2JLP-B.006	0	0	0	1	0.53	1
	2JLP-Ds.001	2JLP-D.002	2JLP-D.003	2JLP-B.004	2JLP-B.005	2JLP-B.006

Table 13S Pockets predicted by DrugPy for the HsSOD1 representative structure. Their class, sum of probes strength (S), initial cluster strength (S0), center-to-center cluster distance (CD) and maximum distance (MD) are described.

Pocket	Class	S	S0	CD	MD
2C9V-Ds.001	Druggable small	20	20	0	9.43
2C9V-Ds.002	Druggable small	17	17	0	7.33
2C9V-Ds.003	Druggable small	16	16	0	7.1
2C9V-Bs.004	Borderline-druggable small	14	14	0	7.16
2C9V-D.005	Druggable	37	20	6.2	13.62
2C9V-D.006	Druggable	36	20	5.02	12.04
2C9V-D.007	Druggable	34	20	6.78	11.85
2C9V-D.008	Druggable	26	20	3.62	10.27
2C9V-D.009	Druggable	33	17	7.34	12.09
2C9V-D.010	Druggable	30	16	7.78	14.28
2C9V-D.011	Druggable	22	16	7.75	12.78
2C9V-D.012	Druggable	53	20	7.34	13.62
2C9V-D.013	Druggable	50	20	7.78	14.28
2C9V-D.014	Druggable	42	20	7.75	12.78

Table 14S Fractional overlap of the DrugPy pockets from HsSOD1 (PDB: 2C9V).

Pocket	Fractional overlap													
2C9V-Ds.001	1													
2C9V-Ds.002	0.36	1												
2C9V-Ds.003	0.75	0.02	1											
2C9V-Bs.004	0.04	0	0	1										
2C9V-D.005	0.73	0.55	0.24	0.01	1									
2C9V-D.006	0.92	0.15	0.62	0.01	0.92	1								
2C9V-D.007	0.66	0.14	0.26	0.36	0.66	0.66	1							
2C9V-D.008	1	0.19	0.34	0.01	1	1	1	1						
2C9V-D.009	0.54	0.56	0.45	0	0.9	0.64	0.54	0.54	1					
2C9V-D.010	0.42	0.01	0.52	0.45	0.42	0.54	0.55	0.42	0.52	1				
2C9V-D.011	0.53	0.00	0.76	0	0.53	1	0.53	0.53	0.76	0.76	1			
2C9V-D.012	0.74	0.42	0.43	0.00	0.94	0.5	0.74	0.74	0.79	0.43	0.64	1		
2C9V-D.013	0.69	0.11	0.46	0.26	0.69	0.75	0.94	0.69	0.51	0.72	0.69	0.75	1	
2C9V-D.014	0.93	0.13	0.56	0.01	0.93	1	0.93	0.62	0.56	0.93	1	1	1	1
	2C9V-Ds.001	2C9V-Ds.002	2C9V-Ds.003	2C9V-Bs.004	2C9V-D.005	2C9V-D.006	2C9V-D.007	2C9V-D.008	2C9V-D.009	2C9V-D.010	2C9V-D.011	2C9V-D.012	2C9V-D.013	2C9V-D.014

Table 15S Values of similarity (P-max > 0.6) calculated for TcSOD (PDB: 2GPC), TbSOD (PDB: 3ESF), LmSOD (PDB: 4F2N) and SOD2 (PDB: 5T30).

Pocket	Pmax											
3esf-001-Ds	0.87	0.6	0.71	0.7	0.83	0.6	0.63	0.82	0.72	0.62	0.33	0.8
3esf-002-Ds	0.79	0.57	0.81	0.74	0.91	0.65	0.61	0.79	0.78	0.6	0.33	0.86
3esf-003-Ds	0.56	0.42	0.75	0.62	0.71	0.61	0.48	0.61	0.63	0.49	0.28	0.74
3esf-004-Ds	0.59	0.44	0.79	0.65	0.74	0.62	0.5	0.64	0.67	0.51	0.3	0.77
4f2n-001-Ds	0.6	0.46	0.69	0.65	0.7	0.58	0.49	0.61	0.63	0.54	0.29	0.7
4f2n-002-Ds	0.61	0.46	0.69	0.65	0.71	0.58	0.48	0.61	0.64	0.54	0.3	0.71
4f2n-003-Ds	0.52	0.4	0.68	0.59	0.62	0.55	0.43	0.55	0.57	0.49	0.26	0.62
4f2n-004-D	0.56	0.42	0.71	0.59	0.65	0.53	0.44	0.57	0.59	0.49	0.27	0.65
4f2n-005-Ds	0.53	0.4	0.69	0.59	0.63	0.54	0.43	0.55	0.57	0.49	0.27	0.63
4f2n-006-Ds	0.61	0.46	0.69	0.65	0.71	0.58	0.48	0.61	0.64	0.54	0.3	0.71
4f2n-007-D	0.49	0.37	0.64	0.54	0.58	0.5	0.4	0.51	0.53	0.45	0.25	0.58
4f2n-008-D	0.53	0.4	0.69	0.59	0.63	0.54	0.43	0.55	0.57	0.49	0.27	0.63
5t30-001-Ds	0.47	0.38	0.62	0.57	0.57	0.56	0.42	0.5	0.54	0.47	0.25	0.58
5t30-002-Ds	0.68	0.54	0.56	0.6	0.61	0.52	0.58	0.61	0.63	0.6	0.35	0.59
5t30-003-D	0.43	0.35	0.57	0.54	0.53	0.55	0.39	0.47	0.51	0.44	0.24	0.54
5t30-004-Ds	0.44	0.36	0.59	0.54	0.54	0.55	0.4	0.48	0.51	0.45	0.25	0.55
5t30-005-D	0.44	0.36	0.59	0.54	0.54	0.55	0.4	0.48	0.51	0.45	0.25	0.55
5t30-006-D	0.49	0.39	0.64	0.58	0.58	0.56	0.42	0.51	0.57	0.49	0.27	0.6
5t30-007-Ds	0.57	0.48	0.62	0.66	0.68	0.64	0.52	0.61	0.67	0.54	0.32	0.66
5t30-008-D	0.4	0.33	0.54	0.5	0.5	0.54	0.37	0.45	0.48	0.41	0.23	0.52
5t30-009-D	0.4	0.33	0.54	0.5	0.5	0.54	0.37	0.45	0.48	0.41	0.23	0.52
5t30-010-D	0.44	0.36	0.59	0.54	0.54	0.55	0.4	0.48	0.51	0.45	0.25	0.55
5t30-011-D	0.42	0.34	0.57	0.52	0.52	0.54	0.38	0.46	0.51	0.43	0.24	0.54
	2gpc-001-Ds	2gpc-002-Bs	2gpc-003-Ds	2gpc-004-Bs	2gpc-005-Bs	2gpc-006-B	2gpc-007-Bs	2gpc-008-B	2gpc-009-Bs	2gpc-010-B	2gpc-011-Bs	2gpc-012-B

Table 15S Values of similarity (P-max > 0.6) calculated for TcSOD (PDB: 2GPC), TbSOD (PDB: 3ESF), LmSOD (PDB: 4F2N) and SOD2 (PDB: 5T30). (cont.)

Pocket	Pmax											
3esf-001-Ds	0.59	0.63	0.7	0.64	0.75	0.78	0.6	0.75	0.63	0.68	0.66	0.75
3esf-002-Ds	0.56	0.71	0.74	0.7	0.83	0.86	0.65	0.8	0.71	0.76	0.71	0.82
3esf-003-Ds	0.41	0.87	0.62	0.76	0.79	0.75	0.61	0.68	0.87	0.67	0.62	0.77
3esf-004-Ds	0.43	0.87	0.65	0.79	0.82	0.78	0.62	0.7	0.87	0.7	0.64	0.8
4f2n-001-Ds	0.46	0.62	0.65	0.63	0.68	0.69	0.58	0.63	0.62	0.64	0.6	0.67
4f2n-002-Ds	0.46	0.62	0.65	0.63	0.68	0.69	0.58	0.63	0.62	0.65	0.6	0.67
4f2n-003-Ds	0.4	0.67	0.59	0.66	0.65	0.64	0.55	0.57	0.67	0.58	0.55	0.64
4f2n-004-D	0.43	0.64	0.59	0.65	0.67	0.66	0.53	0.59	0.64	0.6	0.56	0.66
4f2n-005-Ds	0.4	0.67	0.59	0.66	0.65	0.64	0.54	0.57	0.67	0.59	0.56	0.65
4f2n-006-Ds	0.46	0.62	0.65	0.63	0.68	0.69	0.58	0.63	0.62	0.65	0.6	0.67
4f2n-007-D	0.38	0.69	0.54	0.62	0.6	0.6	0.5	0.53	0.69	0.55	0.52	0.6
4f2n-008-D	0.4	0.67	0.59	0.66	0.65	0.64	0.54	0.57	0.67	0.59	0.56	0.65
5t30-001-Ds	0.37	0.66	0.57	0.62	0.6	0.59	0.56	0.53	0.66	0.56	0.52	0.6
5t30-002-Ds	0.57	0.51	0.6	0.52	0.57	0.58	0.52	0.57	0.51	0.6	0.53	0.56
5t30-003-D	0.35	0.66	0.54	0.6	0.57	0.56	0.55	0.51	0.66	0.53	0.5	0.57
5t30-004-Ds	0.35	0.67	0.54	0.6	0.58	0.57	0.55	0.51	0.67	0.53	0.51	0.57
5t30-005-D	0.35	0.67	0.54	0.6	0.58	0.57	0.55	0.51	0.67	0.53	0.51	0.57
5t30-006-D	0.39	0.63	0.58	0.64	0.62	0.6	0.56	0.54	0.63	0.58	0.54	0.61
5t30-007-Ds	0.49	0.59	0.66	0.6	0.65	0.66	0.64	0.65	0.59	0.67	0.62	0.64
5t30-008-D	0.32	0.63	0.5	0.57	0.55	0.53	0.54	0.49	0.63	0.51	0.48	0.54
5t30-009-D	0.32	0.63	0.5	0.57	0.55	0.53	0.54	0.49	0.63	0.51	0.48	0.54
5t30-010-D	0.35	0.67	0.54	0.6	0.58	0.57	0.55	0.51	0.67	0.53	0.51	0.57
5t30-011-D	0.34	0.65	0.52	0.59	0.57	0.55	0.54	0.5	0.65	0.53	0.5	0.56
	2gpc-013-Bs	2gpc-014-Bs	2gpc-015-B	2gpc-016-B	2gpc-017-B	2gpc-018-B	2gpc-019-B	2gpc-020-B	2gpc-021-B	2gpc-022-Bs	2gpc-023-B	2gpc-024-B

Table 16S Values of similarity (P-max > 0.6) calculated for TbSOD (PDB: 3ESF), LmSOD (PDB: 4F2N) and HsSOD2 (PDB: 5T30)

Pocket	Pmax											
4f2n-001-Ds	0.64	0.7	0.58	0.61	1							
4f2n-002-Ds	0.64	0.7	0.58	0.62	0.98	1						
4f2n-003-Ds	0.56	0.61	0.62	0.65	0.85	0.84	1					
4f2n-004-D	0.59	0.65	0.6	0.63	0.91	0.89	0.86	1				
4f2n-005-Ds	0.57	0.62	0.62	0.65	0.84	0.85	0.98	0.85	1			
4f2n-006-Ds	0.64	0.7	0.58	0.62	0.98	1	0.84	0.89	0.85	1		
4f2n-007-D	0.53	0.57	0.64	0.65	0.78	0.77	0.91	0.86	0.9	0.77	1	
4f2n-008-D	0.57	0.62	0.62	0.65	0.84	0.85	0.98	0.85	1	0.85	0.9	1
5t30-001-Ds	0.52	0.56	0.62	0.63	0.63	0.63	0.7	0.63	0.7	0.63	0.67	0.7
5t30-002-Ds	0.66	0.64	0.49	0.53	0.59	0.6	0.52	0.54	0.53	0.6	0.48	0.53
5t30-003-D	0.48	0.52	0.65	0.63	0.58	0.58	0.66	0.58	0.66	0.58	0.66	0.66
5t30-004-Ds	0.5	0.53	0.66	0.64	0.59	0.59	0.66	0.59	0.66	0.59	0.67	0.66
5t30-005-D	0.5	0.53	0.66	0.64	0.59	0.59	0.66	0.59	0.66	0.59	0.67	0.66
5t30-006-D	0.54	0.58	0.58	0.61	0.65	0.66	0.7	0.66	0.71	0.66	0.65	0.71
5t30-007-Ds	0.65	0.7	0.59	0.62	0.64	0.64	0.58	0.58	0.59	0.64	0.54	0.59
5t30-008-D	0.46	0.49	0.63	0.61	0.54	0.54	0.62	0.55	0.62	0.54	0.62	0.62
5t30-009-D	0.46	0.49	0.63	0.61	0.54	0.54	0.62	0.55	0.62	0.54	0.62	0.62
5t30-010-D	0.5	0.53	0.66	0.64	0.59	0.59	0.66	0.59	0.66	0.59	0.67	0.66
5t30-011-D	0.48	0.52	0.65	0.63	0.57	0.57	0.64	0.57	0.65	0.57	0.65	0.65
	3esf-001-Ds	3esf-002-Ds	3esf-003-Ds	3esf-004-Ds	4f2n-001-Ds	4f2n-002-Ds	4f2n-003-Ds	4f2n-004-D	4f2n-005-Ds	4f2n-006-Ds	4f2n-007-D	4f2n-008-D

Table 17S Values of similarity (P-max > 0.6) calculated for the HsSOD3 (PDB: 2JLP) and HsSOD1 (PDB: 2C9V) pockets on PocketMatch.

Pocket	P-max													
2jlp-001-Ds	0.48	0.26	0.45	0.26	0.41	0.39	0.4	0.48	0.45	0.48	0.43	0.32	0.32	0.39
2jlp-002-D	0.58	0.22	0.38	0.21	0.5	0.48	0.49	0.58	0.53	0.57	0.51	0.4	0.4	0.48
2jlp-003-D	0.55	0.19	0.34	0.18	0.53	0.52	0.52	0.55	0.56	0.51	0.55	0.45	0.44	0.52
2jlp-004-B	0.47	0.11	0.27	0.11	0.61	0.61	0.61	0.47	0.53	0.39	0.51	0.57	0.57	0.61
2jlp-005-B	0.51	0.12	0.29	0.12	0.64	0.61	0.64	0.51	0.58	0.43	0.55	0.56	0.56	0.61
2jlp-006-B	0.39	0.09	0.22	0.09	0.53	0.55	0.53	0.39	0.45	0.33	0.46	0.64	0.64	0.55
	2c9v-001-Ds	2c9v-002-Ds	2c9v-003-Ds	2c9v-004-Bs	2c9v-005-D	2c9v-006-D	2c9v-007-D	2c9v-008-D	2c9v-009-D	2c9v-010-D	2c9v-011-D	2c9v-012-D	2c9v-013-D	2c9v-014-D

01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

CAPÍTULO 2

Manuscrito 02 – Identificação de novos inibidores para a superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis* por ensaios de deslocamento térmico (Thermofluor) e rotinas de dinâmica molecular.

Capítulo em português formatado de acordo com as normas de tese para o programa PPGBiotec/UEFS. Material precursor de artigo submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

CAPÍTULO 2

Identificação de potenciais inibidores para a superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis* por ensaios de deslocamento térmico (Thermofluor) e rotinas de dinâmica molecular

Bruno Cruz de Souza¹, Marina Sena Mendes², Arianne Ferreira de Melo², Thamires Quadros Froes², Marcelo Santos Castilho², e Franco Henrique Andrade Leite^{1*}

¹ Laboratório de Modelagem Molecular, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

² Laboratório de Cristalografia e Macromoléculas, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil.

*Correspondência: fhenrique@uefs.br

ORCIDs (em ordem): 0000-0002-4163-5681, 0000-0001-7144-9989, 0000-0001-7144-9989, 0000-0001-7951-7560, 0000-0002-9563-5679, 0000-0003-3166-6051

RESUMO

A leishmaniose é uma grave ameaça à saúde global e à qualidade de vida de milhões de pessoas, perpetuando e agravando condições socioeconômicas desfavoráveis. A ausência de terapias efetivas e seguras para a doença reforça a urgência no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A enzima superóxido dismutase (SOD) do parasito apresenta-se como um alvo promissor para a interrupção do seu ciclo de vida por ser a primeira via de defesa ao estresse oxidativo. Nesse contexto, catálogos de compostos contendo potenciais moduladores alostéricos da SOD de *Leishmania* determinados por métodos computacionais e/ou compostos oriundos de produtos naturais foram avaliados frente à SOD de *Leishmania braziliensis* (LbSODB2) por meio de ensaios de deslocamento térmico (Thermofluor) e estudos de dinâmica molecular (DM) e cálculos MM/PBSA. Os compostos C04 e C11 apresentaram alta afinidade e relação dose-resposta frente a LbSODB2, com valores respectivos de K_b (constante de ligação) de 12 μM e 3,6 μM , respectivamente, e os resíduos GLU164 e ARG175 exercem papéis cruciais na estabilização dos ligantes na interface da enzima. O trabalho abre perspectivas para melhorias estruturais nos compostos de modo a aprimorar suas propriedades fármaco-similares em busca de novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose, Superóxido dismutase, Alostérico

ABSTRACT

Leishmaniasis remains not only a serious global public health concern, for affecting millions of people, but also as a socioeconomic burden on developing countries. The lack of effective and safe therapies for the disease reinforces the urgency of developing new therapeutic approaches. The parasite's superoxide dismutase (SOD) enzyme, as it is the first defense pathway against oxidative stress, is a promising target for the disease. In this context, product catalogs containing potential allosteric modulators of *Leishmania* SOD determined by computational methods and/or compounds derived from natural products were evaluated against *Leishmania braziliensis* SOD (LbSODB2) through thermal shift assays (Thermofluor), molecular dynamics (MD) studies, and MM/PBSA calculations. Compounds C04 and C11 showed high affinities and dose-response relationship against LbSODB2, with relative K_b (binding constant) values of 12 μM and 1.1 μM , respectively, and residues GLU164 and ARG175 play crucial roles in stabilizing the ligands at the enzyme interface. This work opens perspectives for structural improvements in the compounds in order to enhance their drug-like properties in search of new therapeutic alternatives for leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Superoxide dismutase, Allosterism

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose, parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, tem incidência de 700 mil a 1 milhão de casos anuais (WHO, 2024). É endêmica em todos os continentes exceto a Oceania, abrangendo primariamente países subdesenvolvidos e perpetuando ciclos de pobreza por conta do seu impacto social e econômico (VOLPEDO et al., 2022; WAMAI et al., 2020). A leishmaniose muco-cutânea, forma clínica mais comum da doença, pode causar ulcerações e desfigurações severas e tem a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* como agente etiológico mais difundido nas Américas (FERREIRA et al., 2022; MORAIS et al., 2022; PENA et al., 2020).

O repertório de fármacos para tratar pacientes com leishmaniose é limitado por uma série de problemas, como: efeitos adversos severos, altos custos e baixa adesão ao tratamento devido à necessidade de hospitalização e longos cronogramas de tratamento (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). Os protocolos de tratamento com maior chance de cura para a leishmaniose têm no mínimo 20 dias de duração, podendo se estender até 42 dias (GARZA-TOVAR et al., 2020), e, no Brasil, geram um custo por paciente que varia de US\$167,66 (com o uso de antimoniais) até US\$258,92 com o uso da miltefosina (CARVALHO et al., 2021). Somado a isso, o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos e recidivas pós-tratamento destacam a necessidade da descoberta de novos tratamentos (WIJNANT et al., 2022).

Uma forma de alcançar esse objetivo é explorar alvos e mecanismos exclusivos, validados e/ou essenciais para a sobrevivência do parasita. As enzimas superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) são o principal mecanismo de defesa dos parasitas frente ao estresse oxidativo (CHOI et al., 2021), constituindo assim um alvo viável para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antileishmania.

Estudos mostram que a diminuição da expressão da SOD reduz significativamente a virulência de *Leishmania* (GETACHEW; GEDAMU, 2012; SANTI; MURTA, 2022; TESSAROLLO et al., 2015; VERONICA et al., 2019), e inversamente, a superexpressão dos genes da SOD está associada à resistência a fármacos antimoniais em isolados clínicos (BAHRAMI et al., 2022). De maneira complementar ao volume do seu substrato (ion superóxido), a SOD é uma metaloenzima com sítio ativo de baixo volume (PERRY et al., 2010). O ion superóxido é atraído por um estreito canal interdimérico formado por distâncias de 2,7 a 2,9 Å entre os seus resíduos (MUÑOZ et al., 2005), o que dificulta a possibilidade de modulação por rotinas fármaco-receptor comuns. Neste contexto, a modulação alostérica da SOD seria favorecida não apenas pelas características da enzima, mas também como uma forma de priorizar regiões menos conservadas na isoforma, assim melhorando a seletividade.

A inibição da SOD em tripanossomatídeos é relatada com o uso de quelantes de metal como o tetratiomolibdato (DOÑATE et al., 2008), N-N'-dietilditiocarbamato (LUSHCHAK et al., 2005) e derivados de benzoftalazinas (SANZ et al., 2008), que carecem de seletividade e, portanto, não podem ser usados para tratar a leishmaniose.

Embora seja uma classe de enzimas também presente no hospedeiro, as SODs humana e tripanossomatídeos apresentam diferenças estruturais significativas e cofatores metálicos diferentes (ex.: SODs humanas com Cu-Zn ou Mn e os tripanossomatídeos com Fe) (MAURYA; NAMDEO, 2022; ROSA et al., 2021), justificando a possibilidade da inibição seletiva de SOD de parasitos.

Uma via para selecionar candidatos a inibidores alostéricos com perfil de seletividade para a isoforma do parasito é através do emprego de técnicas computacionais como dinâmica molecular e modelo farmacofórico. Estudos anteriores (SOUZA et al., 2021) resultaram na priorização de 10 compostos com capacidade de modulação alostérica da SOD de *Leishmania chagasi*. Com base nesses achados, esse artigo tem como proposta a avaliação de potenciais inibidores para a superóxido dismutase B2 de *Leishmania braziliensis* (LbSODB2) através de ensaios de deslocamento térmico (Thermofluor) (NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007) e de estudos de dinâmica molecular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CONJUNTO DE COMPOSTOS ANALISADOS FRENTE A LBSODB2

Inicialmente, 10 compostos sintéticos e oriundos do catálogo de moléculas Sigma-Aldrich® CPR depositados no banco ZINC (IRWIN et al., 2020), que obtiveram sobreposição (valor de QFIT, do inglês *query fit*) acima de 80% para um modelo farmacofórico da SOD de *Leishmania chagasi* previamente construído (SOUZA et al., 2021) foram adquiridos para testagem em LbSODB2 (Figura 1).

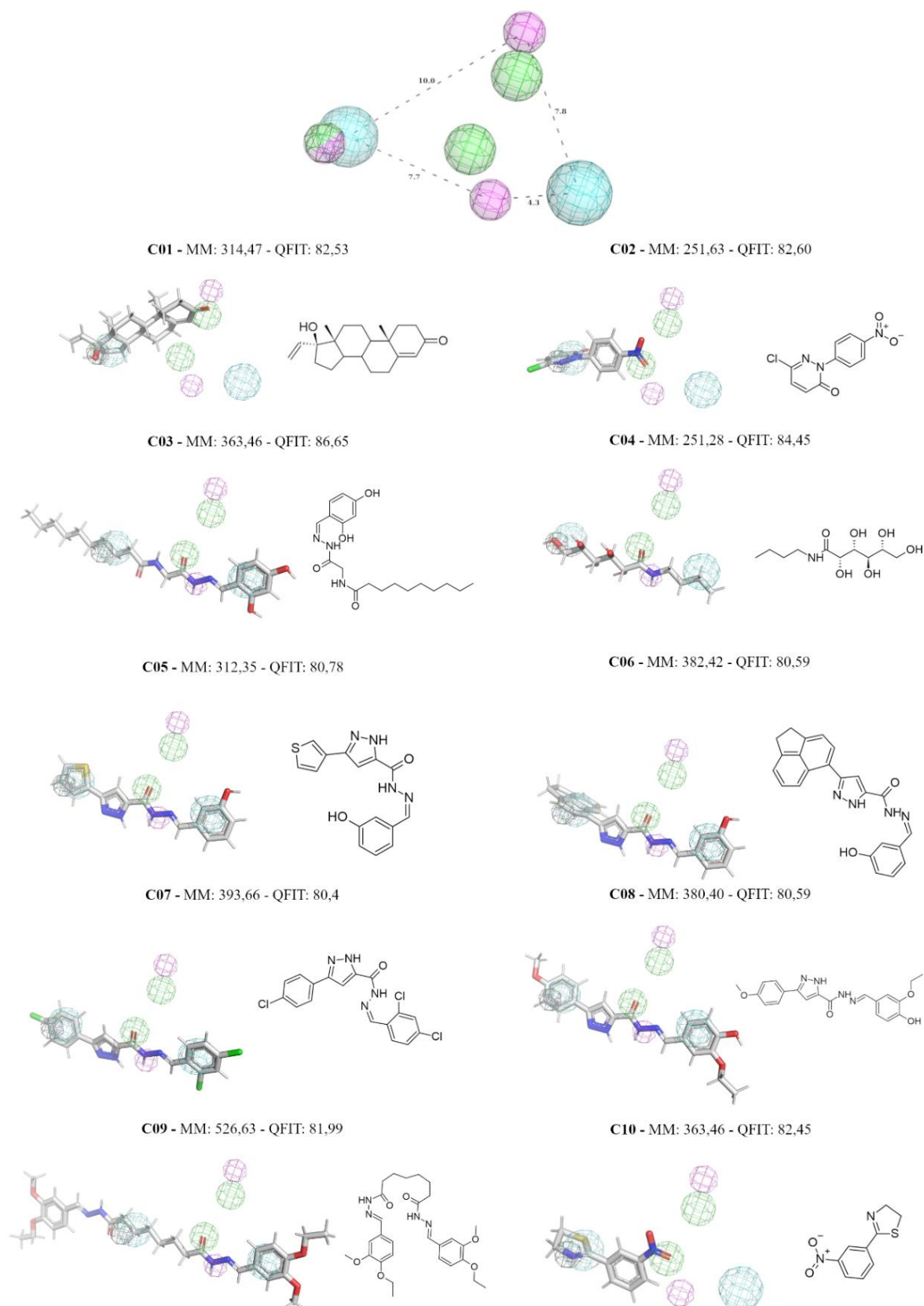


Figura 1: Compostos de origem sintética utilizados no estudo (C01-C10), junto aos seus valores de massa molecular (MM) e sobreposição ao modelo farmacofórico (QFIT). Características do modelo farmacofórico: hidrofóbico (ciano), doador (rosa) e aceitor (verde) de ligações de hidrogênio. Compostos são apresentados em cinza (carbono).

Adicionalmente, 03 compostos oriundos de produtos naturais cedidos por colaboradores foram avaliados computacionalmente frente a um sítio alostérico predito para superóxido dismutase de tripanossomatídeos (SOUZA et. al., 2025, no prelo)¹ através de acoplamento molecular frente a LbSODB2 realizado com o auxílio do programa gnina (MCNUTT et al., 2021).

Como até o momento não há depósito de estrutura cristalográfica de LbSODB2 em bancos de dados, a proteína foi modelada por homologia no servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018), tendo como modelo a superóxido dismutase de *Leishmania major* (99% de similaridade sequencial)¹. A análise do acoplamento dos compostos resultou na inclusão destes nas etapas posteriores, visto que apresentaram concomitantemente valores de energia (Vina) menores que -6,0 kcal/mol e valores de afinidade por aprendizado profundo por redes neurais convolucionais (CNN) acima de 4,5, correspondendo a constantes de dissociação previstas (K_d) na faixa micromolar (~30–100 μ M) (PUTRA, PURNAWAN PONTANA, 2023) (Figura 2).

¹ Corresponde ao capítulo 01 desta tese.

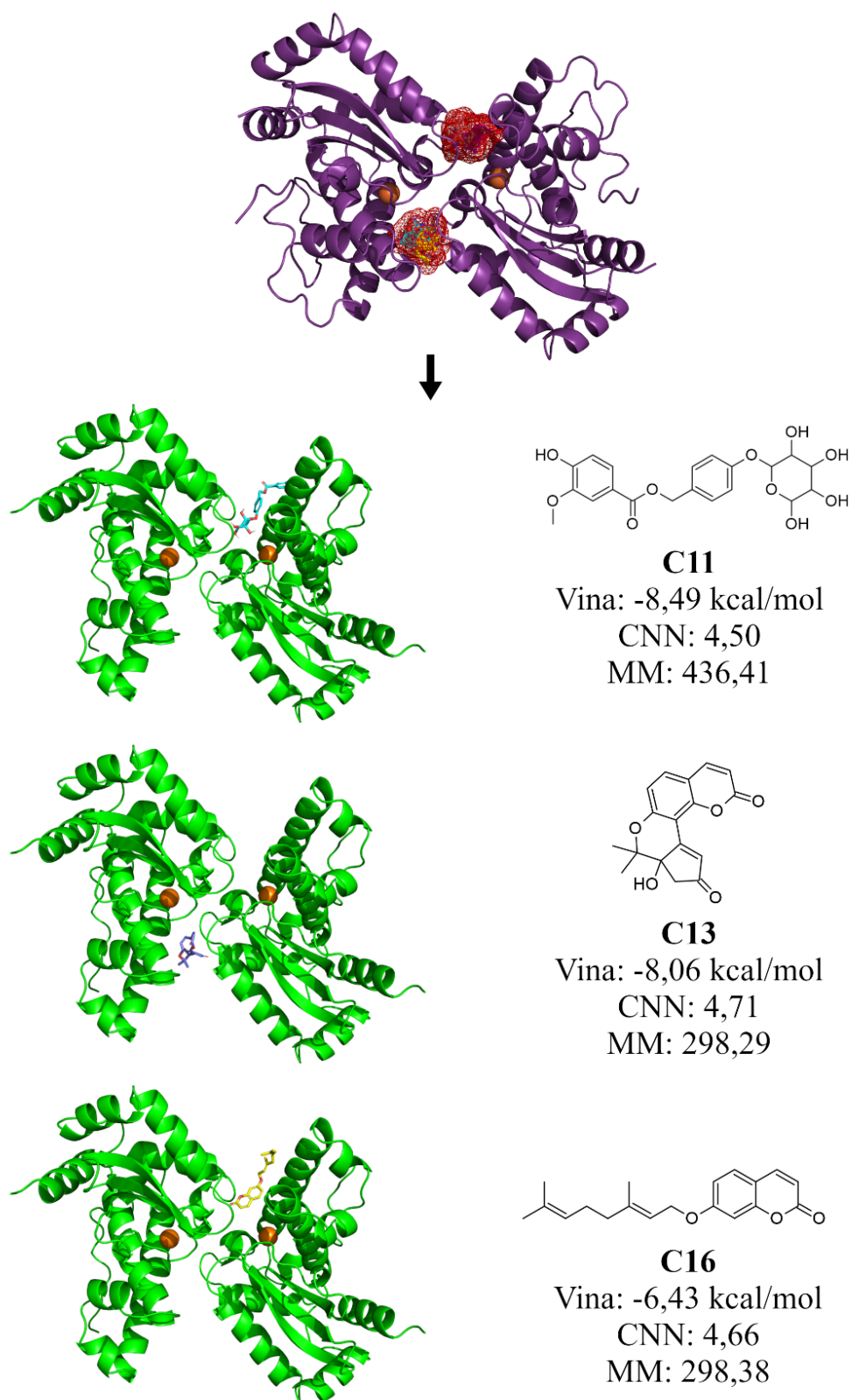


Figura 2: Compostos oriundos de produtos naturais (C11, C13 e C16) utilizados no estudo, junto as suas poses de acoplamento frente a LbSODB2 e aos respectivos valores de pontuação Vina, pontuação CNN (gnina) e massa molecular (MM). O sítio alostérico predito para tripanossomatídeos é apresentado em *mesh* vermelho, sobreposto a proteína em *cartoon* roxo.

2.2. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LbSODB2

Para a expressão de LbSODB2, células de *E. coli* BL21(DE3) contendo os plasmídeos pETM11-LbSODB2 gentilmente cedidos por Brito e colaboradores (2018) foram cultivadas a 37 °C/180 rpm em meio Luria-Bertani suplementado com 30 µg/mL de canamicina até o meio atingir uma densidade óptica de 0,6-0,9 (OD 600nm). Em seguida, 1mL de cloreto de ferro (II) e 1mM de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) foram adicionados à cultura para induzir a expressão de LbSODB2 enquanto o sistema era mantido na temperatura de 20°C. O meio foi centrifugado 16 horas depois (8.000 rpm, 4 ° C, 30 min) e depois ressuspensão em tampão PBS pH 7, suplementado com fluoreto de fenilmetanossulfonil 1mM. As células foram incubadas com 0,5 mg/mL de lisozima durante 30 minutos em banho de gelo e depois sonicadas em ciclos de 15 segundos, com intervalos de 30 s, 10 ciclos a 9 Watts. A fração solúvel foi clarificada por centrifugação (15.000 rpm, 20 min, 4 ° C) e depois filtrada em coluna HisTrap HP (GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão PBS suplementado com 20 mM de imidazol. A coluna foi lavada com 20 volumes de coluna de tampão PBS e depois foram utilizadas lavagens contínuas da coluna com concentrações crescentes de imidazol (variando de 50 a 500 mM).

A purificação do LbSODB2 foi monitorada medindo a absorbância a 280 nm e o nível de pureza da proteína foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 12% (SDS-PAGE). A fração contendo as enzimas foi dialisada em tampão PBS com filtros de centrifugação Amicon Ultra (10KDa MWCO, Milipore®), 4000 rpm a 4°C. As concentrações de proteína foram determinadas espectrofotometricamente utilizando um aparelho Nanodrop®. As enzimas foram submetidas à digestão com a protease TEV (Tobacco Etch Virus) (1 mg por 20 mg de enzima), a uma temperatura de 4°C durante 12 horas. Após a proteólise, as enzimas foram submetidas novamente à coluna His-Trap para separação da enzima clivada, não clivada e da protease TEV. A coluna foi pré-equilibrada com tampão PBS e depois as enzimas clivadas foram eluídas com o mesmo tampão.

As alíquotas referentes ao LbSODB2 clivado foram concentradas (dispositivos 10KDa MWCO Amicon Ultra, Millipore) a 10 mg/mL e armazenadas em glicerol 30% a -80 °C.

2.3. ENSAIOS DE DESLOCAMENTO TÉRMICO (THERMOFLUOR)

Ensaio de concentração única: O efeito dos compostos na estabilidade térmica de LbSODB2 foi avaliado inicialmente em uma concentração única (100 µM, diluído em DMSO); e um volume equivalente de DMSO (5% v/v) foi utilizado como controle negativo. 5 µM de LbSODB2 foram diluídos em uma mistura de tampão PBS (pH 7,0) e SYPRO Orange® (diluição 1:100, 5% v/v) por poço, completando os 20µL de cada poço reacional. O sistema foi montado em uma placa transparente

de 96 poços (Loccus®) e selada com strip-caps planos (Greiner Bio-One®). A placa foi então lida em um protocolo de curva de derretimento variando de 25 a 85 °C em incrementos de 1 °C por 30 segundos em um sistema BioRad® CFX 96 Touch Real-Time PCR. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os valores expressos como mediana e amplitude interquartil.

Ensaio de concentração-resposta: Os compostos que obtiveram uma diferença de temperatura de fusão do LbSODB2 positivo ($\Delta T_m > 0^\circ\text{C}$) nos ensaios de concentração única foram submetidos a um ensaio de resposta à concentração em triplicatas em 10 concentrações diferentes (400 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3 μM , 1,5 μM , 0,5 μM), seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

2.4. ANÁLISE DE DADOS E DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (K_d) DOS COMPOSTOS

Os resultados de fluorescência dos ensaios de concentração única e de concentração-resposta foram exportados do software BioRad® CFX Manager v3.1 e tratados por ajuste não linear das curvas obtidas a uma função sigmoideal de Boltzmann, através do software GraphPad Prism 8 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts EUA, www.graphpad.com). Para determinar a constante de dissociação (K_d) dos compostos frente a LbSODB2, os valores de fluorescência foram tratados no servidor Thermott (GEDGAUDAS et al., 2022), cujo cálculo se baseia em uma derivação da equação de van 't Hoff para a determinação do K_d :

$$\Delta T_m \approx \frac{R \cdot T_m^2}{\Delta H} \ln \left(1 + \frac{[L_t]}{K_d} \right)$$

Onde R é a constante dos gases, T_m é a temperatura de fusão da proteína sem o ligante, ΔH é a mudança de entalpia da proteína em T_m , L_t é a concentração total do ligante e K_d é a constante de dissociação.

2.5. ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR

Os compostos que apresentaram relação dose-resposta frente a LbSODB2 foram submetidos a estudos de dinâmica molecular (DM) ao modelo por homologia para a proteína previamente citado. A protonação da proteína foi corrigida para pH de catálise (pH = 7,0) no servidor PDB2PQR (JURRUS et al., 2018), e a topologia dos compostos foi gerada no servidor Bio2Byte ACPYPE (KAGAMI et al., 2023) com base nas coordenadas obtidas a partir de acoplamento molecular dos compostos no programa gnina (MCNUTT et al., 2021). Os sistemas foram gerados no software GROMACS 2020.2, utilizando o campo de força AMBER99SB-ILDN, em caixas dodecaédricas,

solvatadas com águas TIP3P e neutralizadas com íons Na/Cl. Posteriormente, os sistemas foram submetidos a uma etapa de minimização de energia (1000 ciclos de *steepest-descent*, com energia máxima tolerada de 1000 kJ/mol/nm), seguidos de duas etapas de equilíbrio contínuas: a primeira com volume e temperatura constantes (NVT, 300K), e uma segunda com pressão e temperatura constantes (NPT, 300K, 1 BAR), ambas com 100ps de duração. Por fim, os sistemas foram submetidos a etapa produtiva com duração de 100ns, em ambiente isobárico-isotérmico com constantes de $T = 300\text{K}$ e pressão = 1 bar.

2.6. ITENS DE AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS DE DM

Como métricas de avaliação do desempenho dos complexos, o desvio quadrático médio (RMSD), a flutuação quadrática média por resíduo (RMSF), a energia total do sistema e o raio de giro dos sistemas foram extraídos através dos módulos específicos do programa GROMACS.

Adicionalmente, as ligações de hidrogênio com tempo de permanência acima de 10% do tempo total das trajetórias foram exportadas e analisadas no software HbMap2Grace (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/>). Na mesma configuração uma corrida sem ligantes (apo) de LbSOB2 também foi realizada para comparar o movimento e as interações dos resíduos do sítio ativo e do sítio alostérico com os sistemas com ligantes.

As trajetórias de DM dos complexos de SOD também foram submetidas a análises de contribuição entálpica e decomposição de energia de ligação pelo método MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*), através do programa gmx_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

O modelo de solvatação Poisson-Boltzmann (com solvatação implícita *Generalized Born*) foi utilizado, com uma taxa de amostragem de 1 quadro a cada 2 nanosegundos; extraídos a partir dos 25ns iniciais de estabilização dos sistemas. Para cada quadro selecionado da trajetória, a energia total foi calculada como a soma das energias potenciais entre as moléculas envolvidas, energia de van der Waals, eletrostática, além das energias de solvatação polar e apolar. Por fim, os valores médios e os desvios padrão das energias livres de ligação foram calculados com base nas diferenças entre as contribuições dos ligantes, da proteína e dos complexos.

Para cada trajetória, três subsistemas foram considerados: um subsistema contendo apenas proteína, outro contendo apenas o ligante e um terceiro contendo o complexo ligante-proteína. A contribuição entálpica total dos sistemas (ΔTOTAL) foi calculada através da soma da variação de energia de interação no vácuo entre todos os subsistemas (ΔGGAS) com a variação da energia de solvatação entre todos os subsistemas (ΔGSOLV), conforme exemplificado na fórmula a seguir:

$$\Delta\text{TOTAL} = \Delta\text{GGAS} + \Delta\text{GSOLV}$$

Por sua vez, $\Delta GGAS$ é obtida através da soma dos componentes covalentes e não covalentes; sendo os componentes covalentes as energias de distanciamento das ligações químicas (BOND), de flexão entre átomos (ANGLE) e de tensão torcional em ângulos diedros (DIHED). Já os componentes não covalentes correspondem as energias de interações de van der Waals (VDWAALS) e a energia eletrostática de interações coloumbianas (EEL). A fórmula a seguir demonstra o cálculo do $\Delta GGAS$:

$$\Delta GGAS = (\Delta BOND + \Delta ANGLE + \Delta DIHED) + \Delta VDWAAALS + \Delta EEL$$

Para $\Delta GSOLV$, as contribuições polares e não polares são contabilizadas, como a energia de solvatação polar *Generalized Born* (ΔEGB); e a energia de solvatação não polar da área de superfície acessível ao solvente ($\Delta SURF$), conforme a seguinte fórmula:

$$\Delta GSOLV = \Delta EGB + \Delta SURF$$

A integração das variáveis acima descritas possibilitaram obter uma estimativa da estabilidade do complexo ligante-proteína com uma abordagem multifatorial, resultando na caracterização de ligantes com potencial de interação frente a LbSODB2.

2.7. CARACTERIZAÇÃO FARMACOCINÉTICA E TOXICOLÓGICA DOS MODULADORES DE SOD

Os compostos priorizados nas etapas posteriores foram encaminhados para avaliação de toxicidade através do servidor ADMETlab 3.0 (FU et al., 2024). As propriedades farmacocinéticas (absorção gastrointestinal, metabolismo pelas principais isoformas do citocromo P450 e perfil de excreção) dos moduladores de SOD foram analisadas com base nos modelos preditivos validados da plataforma. Adicionalmente, as avaliações de toxicidade incluíram a avaliação do potencial mutagênico (teste de Ames), carcinogenicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS POTENCIAIS MODULADORES ALOSTÉRICOS DE LbSODB2 POR DESLOCAMENTO TÉRMICO

Com base nas características limitantes da LbSODB2 para o seu uso em ensaios convencionais de inibição, os estudos de deslocamento térmico (TSA, do inglês *Thermal shift assay*) mostram-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos inibidores para a enzima, devido a sua eficácia comprovada na caracterização de interações proteína-ligante, pois fornecem uma abordagem rápida, de baixo custo e de alto rendimento para avaliar a capacidade de modulação dos ligantes (REDHEAD et al., 2017).

Adicionalmente, o TSA é adequado para identificar moduladores alostéricos pois a sensibilidade do ensaio detecta mudanças na estabilidade térmica da proteína causadas pela ligação do ligante em qualquer sítio, inclusive sem necessitar da presença de substrato (BHAYANI; BALLICORA, 2022). Ligantes alostéricos para uma diversidade de sistemas já foram caracterizados por TSA, confirmando a robustez do método para a modalidade de inibição (KOPRA et al., 2022; MAANE et al., 2023; WILHELM et al., 2012).

Ainda na perspectiva da abordagem racional para a descoberta de inibidores alostéricos para LbSODB2, o uso de bibliotecas diversas (compostos sintéticos e oriundos de produtos naturais) buscou maximizar as chances da descoberta de novos inibidores, tendo em vista tanto a afinidade e especificidade já previstas para o sítio alostérico da enzima em compostos em bibliotecas de síntese, também acolhendo moléculas bioativas e a sua diversidade de quimiotipos exclusivos dos produtos naturais.

Os resultados encontrados com base nessa abordagem são descritos a seguir, sendo discernidos com base na origem dos compostos.

3.1.1. Compostos de origem sintética (C01-C10)

A Figura 3 ilustra a mediana e amplitude interquartil de deslocamento térmico dos compostos do catálogo I frente a LbSODB2.

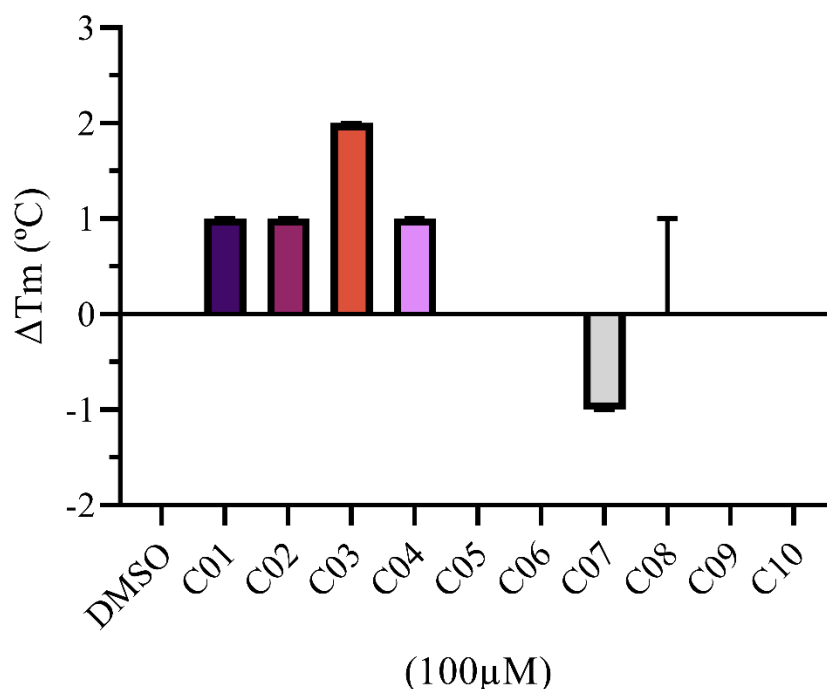


Figura 3: Gráfico de mediana e amplitude interquartil das triplicatas do ensaio de concentração única (100 μ M) para compostos sintéticos (C01-C10) frente a LbSODB2. Compostos com ΔT_m médio > 0°C são representados em barras coloridas.

Os compostos C05, C06, C08, C09 e C10 apresentaram $\Delta T_m \leq 0$, e, portanto, foram excluídos das etapas posteriores. Já os compostos que apresentaram $\Delta T_m > 0,0^\circ\text{C}$ (C01, C02, C03, C04) foram encaminhados para o teste de concentração-resposta frente a LbSODB2.

Com o objetivo de melhor caracterizar a atividade dos compostos frente a LbSODB2 e analisar os efeitos dependentes da concentração nos sistemas, os compostos foram avaliados numa escala de 10 concentrações (2 concentrações superiores a 100 μ M e 7 concentrações inferiores a 100 μ M), mantendo a mesma rotina de ensaio definida anteriormente e igualmente em triplicatas.

Dentre os quatro compostos selecionados na etapa de concentração única, apenas C04 possibilitou deslocamento térmico (ΔT_m) positivo em LbSODB2 em função do aumento da sua concentração, apresentando pico de $\Delta T_m = 2,8^\circ\text{C}$ na concentração de 400 μ M. Tal comportamento indica que a interação de C04 frente a LbSODB2 favorece a estabilidade da enzima e retarda o seu processo de desnovelamento (Figura 4). O comportamento dos demais compostos selecionados não apresenta um padrão dose-resposta constante, apresentando variações significativas (vide material suplementar).

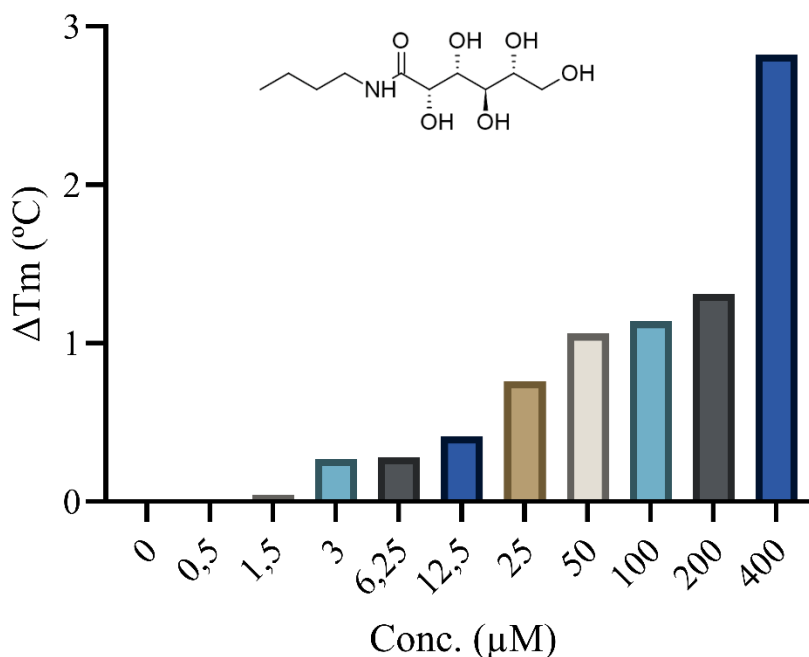


Figura 4: Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C04 frente a LbSODB2.

Com base nesses dados, o composto C04 foi selecionado para as etapas de predição de energia de ligação com base em dados termodinâmicos. Devido ao seu perfil promissor, buscou-se explorar melhor seu potencial inibitório e possíveis atividades biológicas previamente descritas. Para isso, consultas foram realizadas em bases de dados amplamente utilizadas na área, como ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o objetivo de identificar registros de atividade biológica em outros organismos ou alvos moleculares. No entanto, não foram encontrados dados relevantes nessas plataformas.

Adicionalmente, análises de similaridade estrutural em moléculas bioativas foram conduzidas por meio da ferramenta SwissSimilarity (<http://www.swisssimilarity.ch>), visando identificar compostos análogos com atividades antiparasitárias reportadas, mas não foram encontrados resultados significativos que pudessem subsidiar uma interpretação mais aprofundada. Esses achados reforçam a relevância de investigar o composto C04 como um potencial inibidor alostérico inédito para LbSODB2.

3.1.2. Compostos oriundos de produtos naturais (C11, C13 e C16)

Por apresentarem valores de pontuação Vina e CNN favoráveis para a modulação alostérica predita, os compostos C11, C13 e C16 foram selecionados para a caracterização *in vitro* frente a LbSODB2, utilizando a mesma rotina de teste para dose única utilizado anteriormente. Os testes

demonstraram que apenas o composto C11 apresentou variação de $\Delta T_m > 0,0^\circ\text{C}$ frente a LbSODB2 na concentração de $100\mu\text{M}$ (Figura 5), portanto sendo priorizado para a etapa posterior de concentração-resposta.

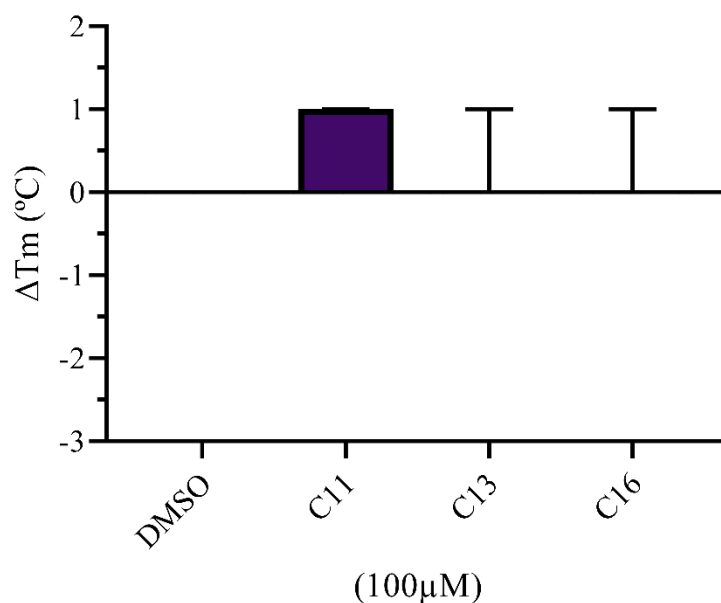


Figura 5: Gráfico de mediana e amplitude interquartil das triplicatas do ensaio de concentração única ($100\mu\text{M}$) para compostos do catálogo II frente a LbSODB2. Compostos com ΔT_m médio $> 0^\circ\text{C}$ são representados em barras coloridas.

O ensaio de dose resposta do composto C11 revelou que ao aumento da sua concentração em cinco pontos ($0,5\mu\text{M}$; $1,5\mu\text{M}$; $3\mu\text{M}$; $12,5\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$), houve deslocamento térmico (ΔT_m) positivo em LbSODB2, apresentando pico de $\Delta T_m = 3^\circ\text{C}$ em $50\mu\text{M}$ (Figura 6).

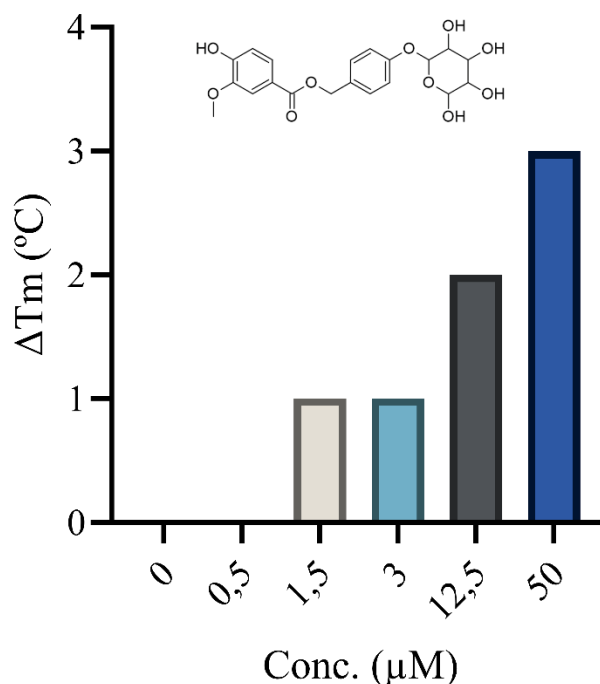


Figura 6: Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (5 concentrações; 0 - 50 μM) para o composto C11 frente a LbSODB2.

A molécula C11, identificada no catálogo de produtos naturais, também apresentou potencial promissor como inibidora da LbSODB2. De maneira similar ao realizado para o composto sintético C04, buscas em bases de dados reconhecidas, como ChEMBL e PubChem, não retornaram nenhuma informação relevante de atividade para C11. Complementarmente, as análises de similaridade estrutural com a ferramenta SwissSimilarity também não encontraram resultados significativos de atividade antiparasitária em compostos similares. Os dados destacam a necessidade de igualmente aprofundar a investigação da molécula C11, ressaltando seu potencial inexplorado e sua originalidade no contexto da inibição da LbSODB2 com um composto bioativo.

3.2. ESTIMATIVA DE CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO POR DESLOCAMENTO TÉRMICO (THERMOTT)

Embora o TSA forneça informações valiosas sobre a mudança da temperatura de fusão (ΔT_m) da proteína na presença ou ausência de ligantes, o ensaio por si só não quantifica diretamente a afinidade de ligação entre o ligante e a proteína. Assim, o cálculo da constante de dissociação (K_d) é uma etapa adicional que busca melhor caracterizar as interações. O valor de K_d fornece uma medida quantitativa da afinidade de ligação ligante-proteína, indicando a concentração de ligante necessária para ocupar 50% dos sítios de ligação da proteína. Ao ajustar os deslocamentos de ΔT_m em

concentrações variáveis de ligante a uma curva de ligação, os dados qualitativos de TSA passam a ter parâmetro quantitativo, garantindo uma compreensão mais profunda das interações ligante-proteína e sua relevância fisiológica.

Os valores de fluorescência encontrados nos ensaios de concentração-resposta para C04 e C11, junto as variáveis de ensaio (temperatura inicial = 25°C, número de resíduos da LbSODB2 = 208) foram submetidos no servidor Thermott, que estima o K_d com base em uma adaptação da equação de van 't Hoff (Figura 7).

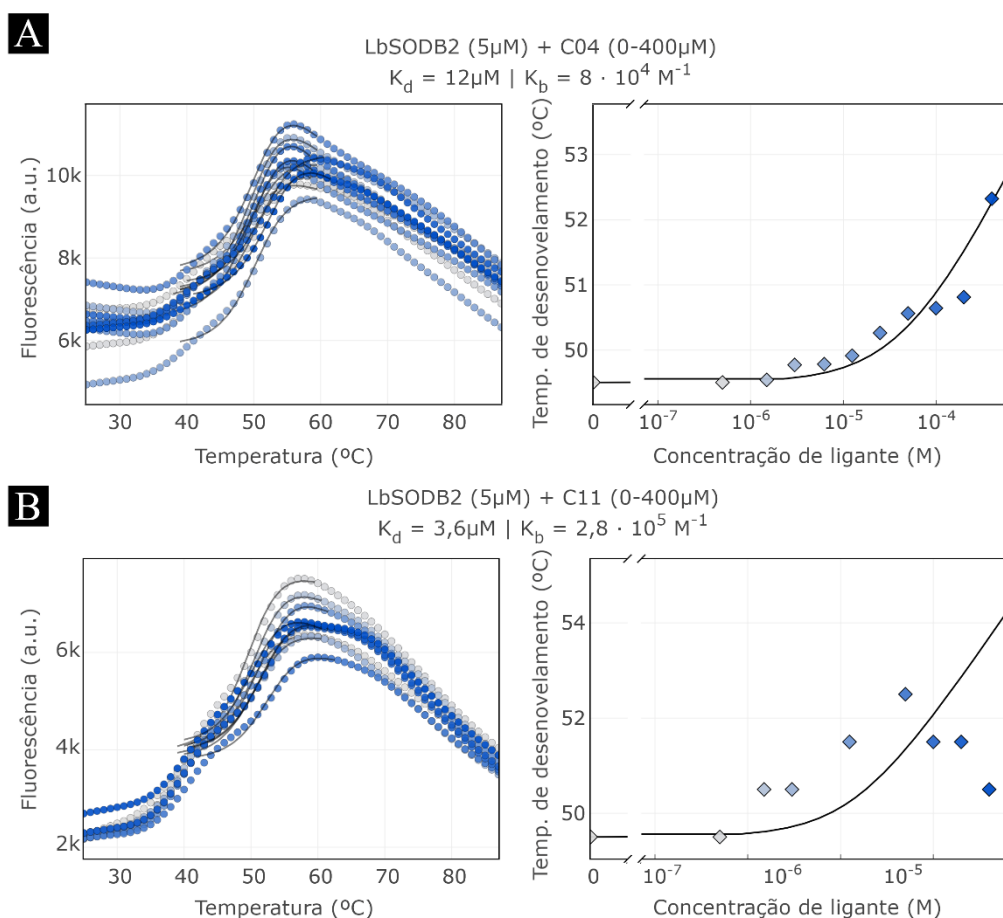


Figura 7: Gráfico de deslocamento térmico para os compostos [A] C04 e [B] C11 frente a LbSODB2, obtido no servidor Thermott, junto aos seus respectivos valores de constante de dissociação (K_d) e constante de ligação (K_b). A esquerda: gráficos de fluorescência dos poços analisados vs temperatura, a direita: gráficos de concentração de ligante versus temperatura de desenovelamento (°C).

Para o composto C04, foi estimada K_d de 12μM, enquanto que para o composto C11 foi estimada K_d de 3,6μM. Para inibidores alostéricos, esses valores são promissores, pois os sítios alostéricos frequentemente exibem afinidades de ligação mais fracas em comparação aos sítios ortostéricos devido à sua menor conservação e maior flexibilidade em comparação

(CHRISTOPOULOS, 2002; WOOTTEN; CHRISTOPOULOS; SEXTON, 2013). O valor de K_d na faixa micromolar baixa (1–10 μM) é considerado favorável para inibidores alostéricos, pois reflete um equilíbrio entre a ligação efetiva e a capacidade de modular a função da proteína sem inibi-la completamente (CHANGEUX; CHRISTOPOULOS, 2016; KENAKIN, 2012). No entanto, aparentemente há um limite para a atividade de C11 frente a LbSODB2. Observa-se que quando a concentração de C11 ultrapassa 100 μM , sua capacidade de deslocamento térmico começa a cair. Esse padrão pode ser justificado por sua capacidade de formar ligações de hidrogênio internas, promovendo assim sua agregação quando em concentrações mais altas. Apesar dessas observações, o composto foi mantido para as etapas posteriores, pois é um composto de origem natural, cuja diversidade e esqueleto químico é promissor para otimizações e testes futuros. C04, com um K_d de 12 μM , embora mais fraco, ainda se encontra dentro de uma faixa aceitável para interações alostéricas e pode ser otimizado para melhor de perfil de modulação. Ambos compostos apresentam potencial como inibidores alostéricos, sendo C11 particularmente notável por sua maior afinidade de ligação.

3.3. ROTINAS DE DINÂMICA MOLECULAR

Os estudos de dinâmica molecular (DM) são um próximo passo crucial neste estudo para analisar o comportamento dinâmico da enzima e suas interações com os compostos C04 e C11 em nível atômico.

Enquanto os ensaios de deslocamento térmico (TSA) e os cálculos de K_d revelam afinidade de ligação, as rotinas de DM oferecem uma compreensão mais profunda dos aspectos estruturais da interação ligante-macromolécula ao longo do tempo, incluindo os resíduos envolvidos nas ligações e as suas mudanças conformacionais induzidas. Adicionalmente, as simulações de DM podem corroborar com valores obtidos experimentalmente, demonstrando que as afinidades de ligação observadas são consistentes com os padrões de estabilidade e interação vistos nas simulações.

Numa perspectiva alinhada as particularidades de modulação da LbSOB2, outros estudos relatam o sucesso do uso da DM na investigação do mecanismo de ligantes alostéricos que bloqueiam a conformação ativa da proteína, ou bloqueiam o acesso do substrato ao sítio catalítico, em corroboração com dados experimentais (KAILASAM NATESAN; KUPPANNAGOUNDER PITCHAIMUTHU, 2024; SARATHKUMAR; LAKSHMI, 2019).

Com base nessas informações, três sistemas de dinâmica molecular (DM) foram construídos para LbSODB2: um sistema APO, sistema C04-LbSODB2 e sistema C11-LbSODB2. Após a conclusão das DMs, a clusterização dos sistemas agrupou suas conformações semelhantes e as estruturas representativas de cada sistema são apresentadas na Figura 8.

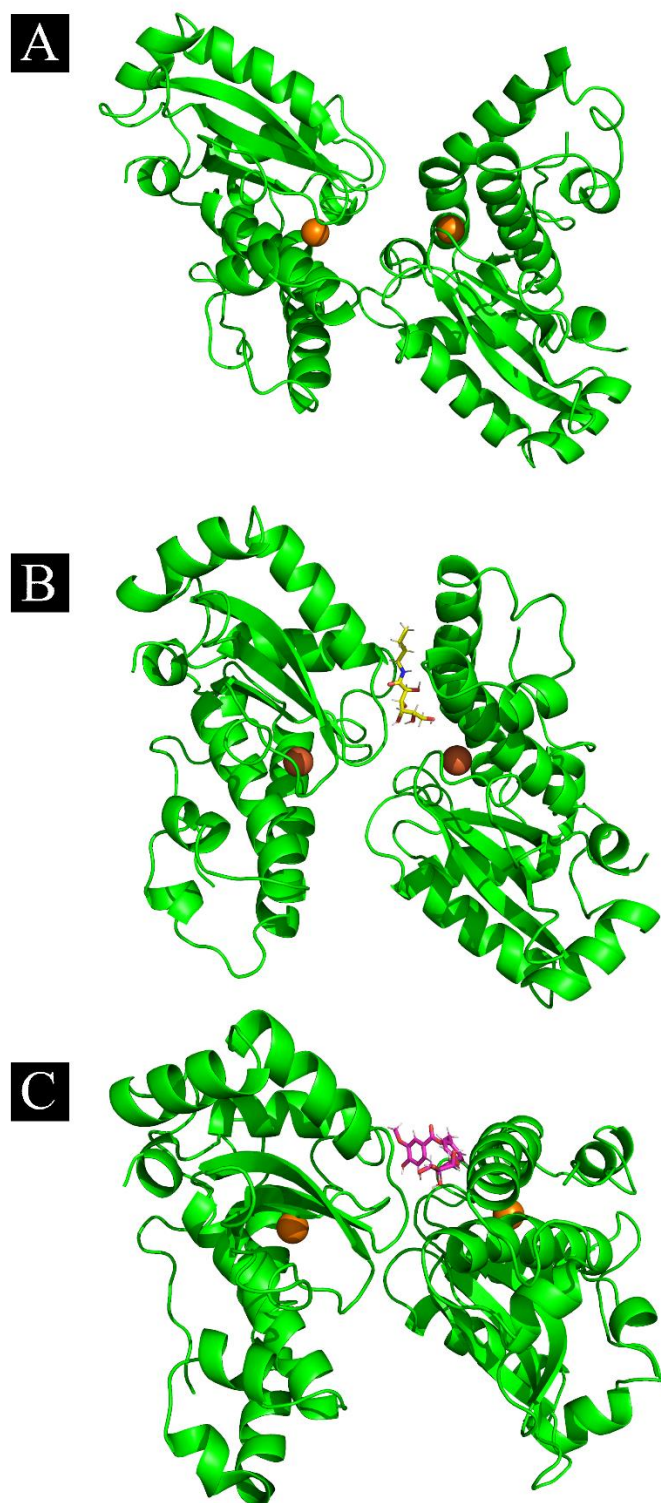


Figura 8: Estruturas representativas dos sistemas de DM para [A] LbSODB2 APO ($t = 36,50$ ps); [B] C04-LbSODB2 ($t = 88,70$ ps); e [C] C11-LbSODB2 (54.65 ps). LbSODB2 é apresentada em formato *cartoon* e C04/C11 são representados em *sticks* (C04 = carbonos em cor amarela; C11 = carbonos em cor púrpura).

Uma análise de RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*, Raiz do desvio quadrático médio) foi realizada para os três sistemas, com o propósito de avaliar a estabilidade através da diferença média entre as posições atômicas durante a trajetória. O sistema APO apresentou uma média de RMSD de $0,557 \pm 0,065$ nm, o sistema C04-LbSODB2 apresentou um valor médio de RMSD de $0,422 \pm 0,086$ nm e o sistema C11-LbSODB2 apresentou um valor médio de RMSD de $0,621 \pm 0,096$ nm. A Figura 9 apresenta um gráfico da variação do RMSD durante a trajetória para os três sistemas.

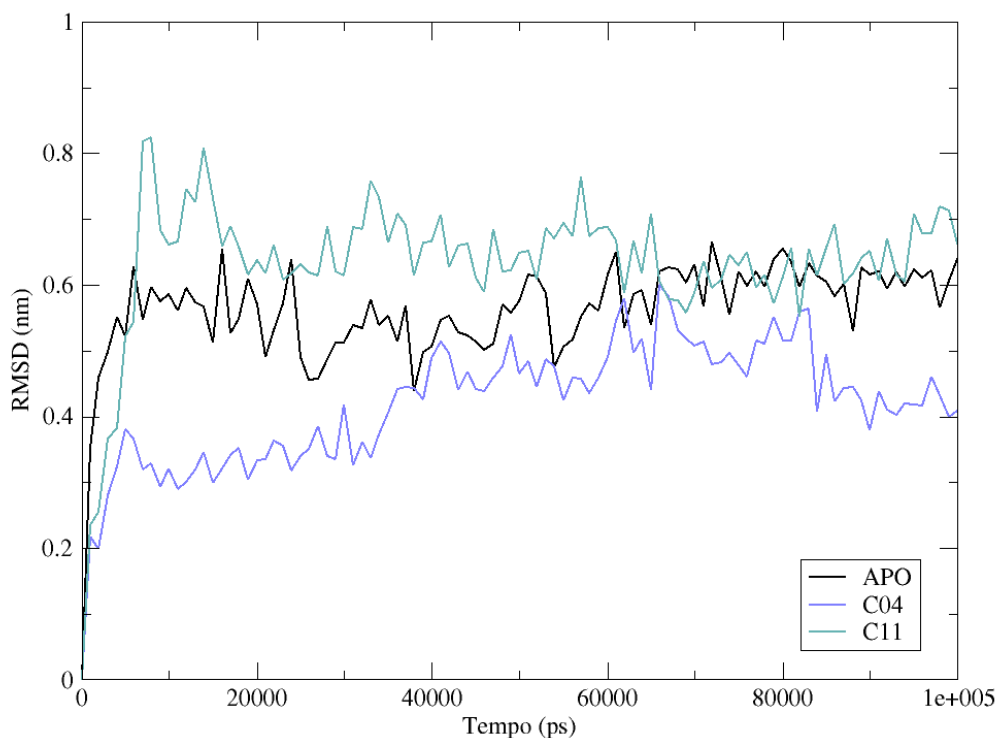


Figura 9: Gráfico de RMSD para os sistemas APO, C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2 durante o tempo de simulação das DMs (10000ps = 100ns).

Quando comparados, o sistema com C04 apresentou valor de RMSD menor que a estrutura em sua forma APO, sugerindo uma menor variação conformacional em LbSODB2 (e consequentemente menor flexibilidade estrutural) através de interações contribuem para a estabilização da proteína. Por outro lado, o sistema com C11 apresentou um valor médio de RMSD o maior entre os sistemas analisados. Esse aumento no RMSD sugere que a presença do ligante induziu uma maior variação conformacional na proteína ao longo da simulação, possivelmente devido a interações mais dinâmicas entre o ligante e a proteína.

Adicionalmente, o RMSF (do inglês *Root Mean Square Fluctuation*, Flutuação quadrática média) dos sistemas também foi calculado, a fim de avaliar as flutuações locais dos resíduos ao longo das simulações e identificar regiões com movimento, na perspectiva de correlação com as interações realizadas pelos ligantes.

O sistema APO apresentou uma média de RMSF de $0,159 \pm 0,077$ nm; enquanto o sistema com o ligante C04 apresentou uma média de $0,183 \pm 0,081$ nm e o sistema com o ligante C11, por sua vez, apresentou uma média de $0,154 \pm 0,068$ nm. Um gráfico que apresenta a variação do RMSF ao longo da trajetória para os três sistemas é apresentado na Figura 10.

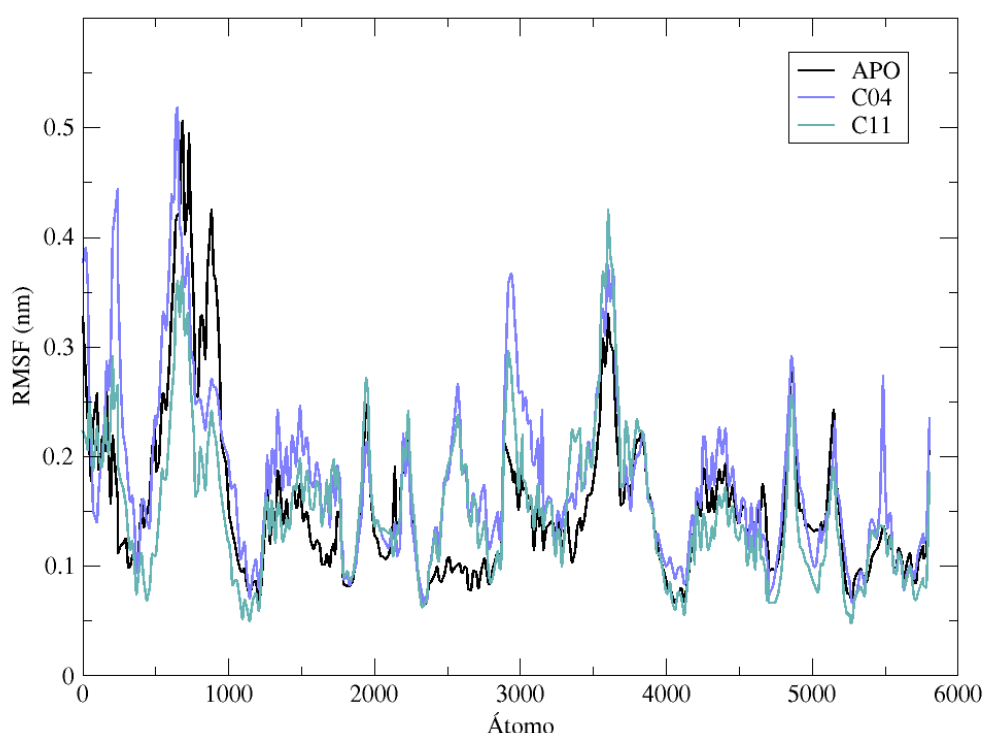


Figura 10: Gráfico de RMSF para os sistemas APO, C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2 durante o tempo de simulação das DMs (10000ps = 100ns).

O resultado reflete uma variação moderada nas flutuações dos resíduos da proteína tanto na presença quanto na ausência de ligantes, com a variação entre os sistemas ocorrendo na terceira casa decimal, logo, sem muito significado estatístico. Existe uma uniformidade de aumento da flutuação nos três sistemas para as regiões de alça, correspondendo às faixas de átomos 500-1000 e 3500-4000. Porém, na região constituída de alfa-hélice e alça correspondente à faixa de átomos 2400-2800, há uma discrepância entre a flutuação do sistema APO ($\pm 0,1$ nm) quando comparado aos sistemas de

complexo, que apresentam pico de RMSF de 0.25nm. Tal diferença é justificada pela região estar diretamente associada a área de interface da LbSODB2 onde ocorrem as interações com os ligantes, demonstrando que a presença do ligante interfere em ± 22 resíduos da região. A Figura 11 apresenta a região de interface em LbSODB2, que apresenta discrepância de RMSF resultante das interações realizadas nos complexos.

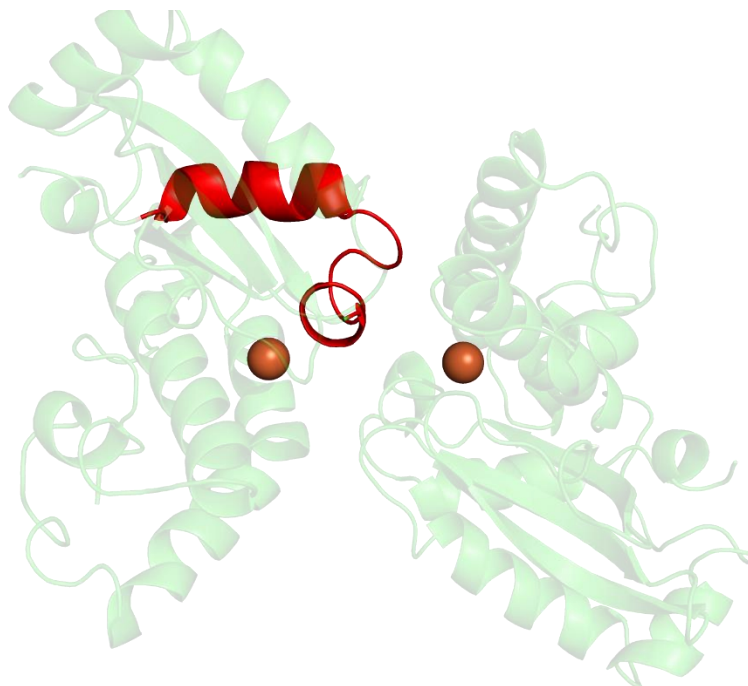


Figura 11: Estrutura representativa do sistema APO de C04-LbSODB2, com a região correspondente à faixa de átomos 2400-2800 destacada em vermelho.

Por fim, a energia total do sistema foi calculada para avaliar a viabilidade dos sistemas com base nas contribuições potenciais e cinéticas. O sistema APO apresentou uma energia total média de $-5,971 \times 10^5 \pm 1,082$ kJ/mol; enquanto o sistema com o ligante C04 exibiu uma energia total média de $-5,965 \times 10^5 \pm 1,096$ kJ/mol e o sistema com o ligante C11 apresentou uma energia total média de $-5,962 \times 10^5 \pm 1,037$ kJ/mol. O gráfico de energia da Figura 12 sumariza a energia dos sistemas durante as trajetórias.

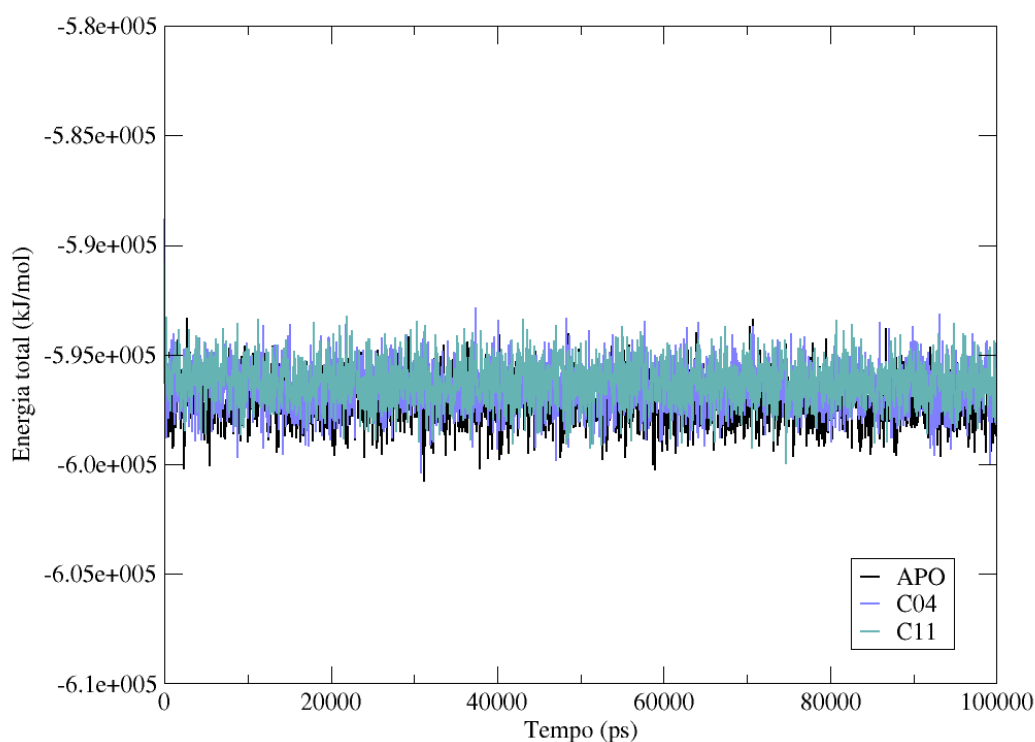


Figura 12: Gráfico de energia para os sistemas APO, C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2 durante o tempo de simulação das DMs (10000ps = 100ns).

Não há uma variação energética estatisticamente relevante entre os sistemas APO e complexos de LbSODB2. Esses resultados indicam que ambos os ligantes, C04 e C11, mantiveram a estabilidade energética dos sistemas e que as interações entre a proteína e os ligantes foram energeticamente favoráveis.

De modo a avaliar quantitativamente as interações que estabilizam os complexos de C04 e C11, as interações de hidrogênio entre ligantes e LbSODB2 durante as trajetórias foram contabilizadas. A presença e permanência dessas interações ao longo da DM também caracteriza o perfil de interação desses compostos, além de possibilitar o reconhecimento de resíduos-chave para as interações dos complexos. A seguir, são apresentadas as principais interações de hidrogênio observadas para os complexos, primeiramente para o ligante C04 (Tabela 1) e C11 (Tabela 2), com ênfase nos resíduos mais envolvidos (permanência acima de 10% do tempo total de DM, equivalente a 1000ps ou 10ns):

Tabela 1: Listagem das ligações de hidrogênio no composto C04-LbSOB2 durante a rotina de DM, discriminadas em átomo doador e aceptor, contagem de aparições e porcentagem de permanência.

Doador	Aceptor	Contagem	Porcentagem
TYR36 OH	C04 O4	154	15,38%
HIS165 NE2	C04 O2	435	43,46%
HIS165 NE2	C04 O4	382	38,16%
TYR167 OH	C04 O2	404	40,36%
TYR167 OH	C04 O3	110	10,99%
ARG175 NE	C04 O	669	66,83%
ARG175 NH2	C04 O	696	69,53%
ARG175 NH2	C04 O3	314	31,37%
C04 O1	LYS31 O	381	38,06%
C04 O2	GLU164 OE1	180	17,98%
C04 O2	GLU164 OE2	559	55,84%
C04 O3	GLU164 OE1	613	61,24%
C04 O3	GLU164 OE2	985	98,40%
C04 O4	GLU164 OE1	121	12,09%
C04 O4	GLU164 OE2	466	46,55%
C04 O5	ASN173 OD1	353	35,26%

No sistema com o ligante C04, os resíduos que mais se destacaram nas interações de hidrogênio são GLU164 (aceptor), HIS165 (doador), TYR167 (doador) e ARG175 (doador). GLU164 destaca-se por apresentar 6 possibilidades de interação, com uma delas permanecendo em quase toda duração da DM (98,4%), o que evidencia a importância desse resíduo para a estabilização do complexo. Em uma escala ainda maior de porcentagem de permanência das interações está o complexo C11-LbSODB2, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Listagem das ligações de hidrogênio no composto C11-LbSOB2 durante a rotina de DM, discriminadas em átomo doador e acceptor, contagem de aparições e porcentagem de permanência.

Doador	Aceptor	Contagem	Porcentagem
TYR36 OH	C11 O1	196	19,58%
HIS165 NE2	C11 O	451	45,05%
HIS165 NE2	C11 O2	916	91,51%
ARG175 NH1	C11 O3	463	46,25%
ARG175 NH2	C11 O3	544	54,35%
C11 O2	GLU164 OE1	516	51,55%
C11 O2	GLU164 OE2	576	57,54%
C11 O3	GLU164 OE1	826	82,52%
C11 O3	GLU164 OE2	868	86,71%
C11 O4	HIS120 O	617	61,64%
C11 O5	LYS31 O	870	86,91%

No complexo com o ligante C11, LYS31, GLU164, HIS165 e ARG175 foram os principais resíduos envolvidos nas interações de hidrogênio. Nesse complexo, HIS165 também se destaca, com 2 possibilidades de interação, e uma destas também permanecendo por quase toda a trajetória de DM (91,51%). Embora o número de ocorrência de interações de hidrogênio em C11 seja menor, as permanências das interações são maiores comparadas ao composto C04, como por exemplo GLU164 e LYS31 compondo 3 possibilidades de interação aparecendo em mais de 80% da trajetória total da DM.

As enzimas ferro-superóxido dismutases têm como sítio ativo a coordenação do íon ferro a três histidinas e um ácido aspártico (COOPER et al., 1995). Nos mapeamentos de interações de hidrogênio para os sistemas com C04 e C11, o resíduo catalítico HIS165 ranqueia entre as interações com maior permanência, sendo este uma das histidinas essenciais para a catálise do íon superóxido (Figura 13).

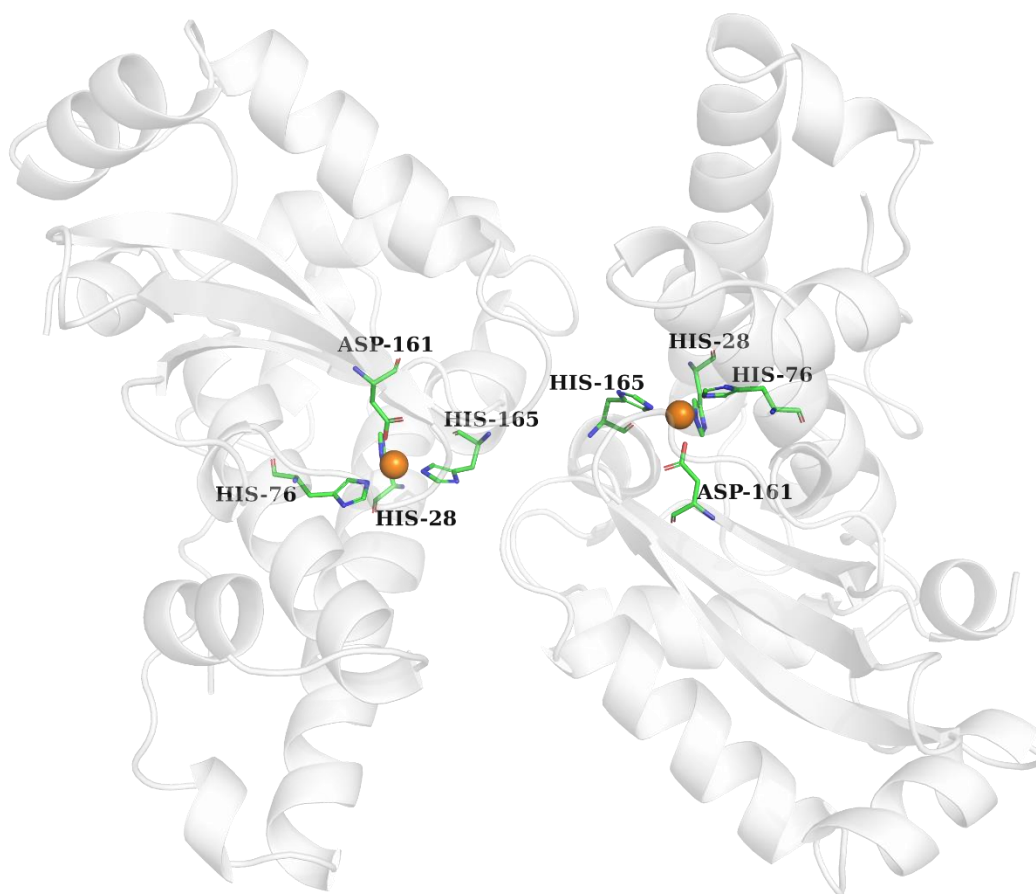


Figura 13: Sítio ativo da LbSODB2 (representada em forma *cartoon*, cor branca). Os resíduos do sítio ativo estão representados em *sticks* de cor verde (carbono). Os íons ferro são representados por esferas laranja.

Embora o conceito de alosterismo infere um sítio distinto ao catalítico, a interação entre o modulador alostérico e um resíduo catalítico pode induzir ou estabilizar uma conformação inativa da enzima, levando a mudanças estruturais que interrompem o ciclo de catálise, impedindo a rotatividade do substrato ou dificultando seu acesso ao sítio catalítico (HALILOGLU; HACISULEYMAN; ERMAN, 2022). Adicionalmente, a ideia de alosterismo através da reorganização da rede de resíduos de uma enzima ressalta a importância da interferência tanto em resíduos externos como em resíduos catalíticos (SAMANTA et al., 2023). Assim, ambos compostos demonstram perfil de interação favoráveis a interferência do ciclo de catálise da LbSODB2.

3.4. CÁLCULO DA CONTRIBUIÇÃO ENTÁLPICA PARA AS ENERGIAS DE LIGAÇÃO ATRAVÉS DO MM/PBSA

Os cálculos com MM/PBSA (do inglês *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*, Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann) permitem avaliar a afinidade de um ligante por uma macromolécula, levando em conta interações eletrostáticas, de van der Waals, além de efeitos de solvatação e energias polares e apolares (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021). Ao aplicar o MM/PBSA pós-simulação de DM, pode-se extrair uma estimativa mais precisa e termodinamicamente relevante das energias de ligação do ligante, ajudando a identificar as principais interações estabilizadoras, detectar contribuições energéticas desfavoráveis e refinar as estratégias de otimização do ligante.

As variáveis do MM/PBSA permitem a estimativa da energia livre de ligação dos complexos. No entanto, para ambas rotinas de DM de C04-LbSODB2 e C11-LbSODB2, o desvio padrão da energia de interação (σ_{IE}) excedeu 15 kJ/mol, o que torna a entropia de interação ($-T\Delta S$) altamente tendenciosa e não confiável (EKBERG; RYDE, 2021) pois valores de σ_{IE} acima desse limite requerem um número impraticável de amostras para convergir os cálculos de entropia. Dadas essas limitações, apenas as contribuições entálpicas (ΔH) foram consideradas neste estudo.

Para a fase produtiva de C04-LbSODB2 (25ns-100ns), a média da contribuição entálpica total (Δ_{TOTAL}) foi de $-35,74 \pm 5,34$ kcal/mol. Dentre os seus constituintes, Δ_{GGAS} teve variação negativa de $-74,04 \pm 8,52$ kcal/mol, demonstrando energia de interação favorável mesmo após a dedução da contribuição da energia de solvatação do complexo (Δ_{GSOLV} ; $+38,30 \pm 5,53$ kcal/mol) (Figura 14).

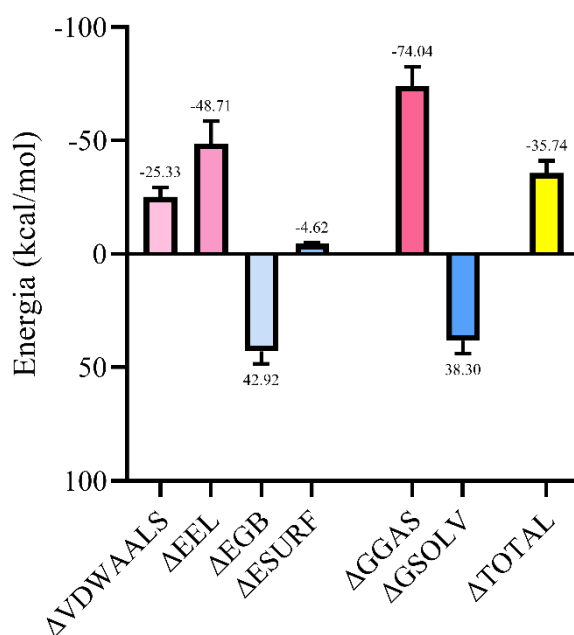


Figura 14: Gráfico de análise MM/PBSA para o complexo C04-LbSODB2. Δ GGAS e seus constituintes estão representados em rosa, Δ GSOLV e seus constituintes apresentados em azul, e a energia entrópica total (Δ TOTAL) em amarelo.

Adicionalmente, a análise de contribuição por resíduo por MM/PBSA revela quais resíduos contribuem mais para a entalpia, assim complementando a análise de ligação de hidrogênio das DMs ao identificar resíduos cruciais para estabilizar interações além das ligações de hidrogênio, como forças de van der Waals e efeitos eletrostáticos. Destacar os principais resíduos envolvidos pode refinar a interpretação do mecanismo de interação com LbSODB2 (Figura 15).

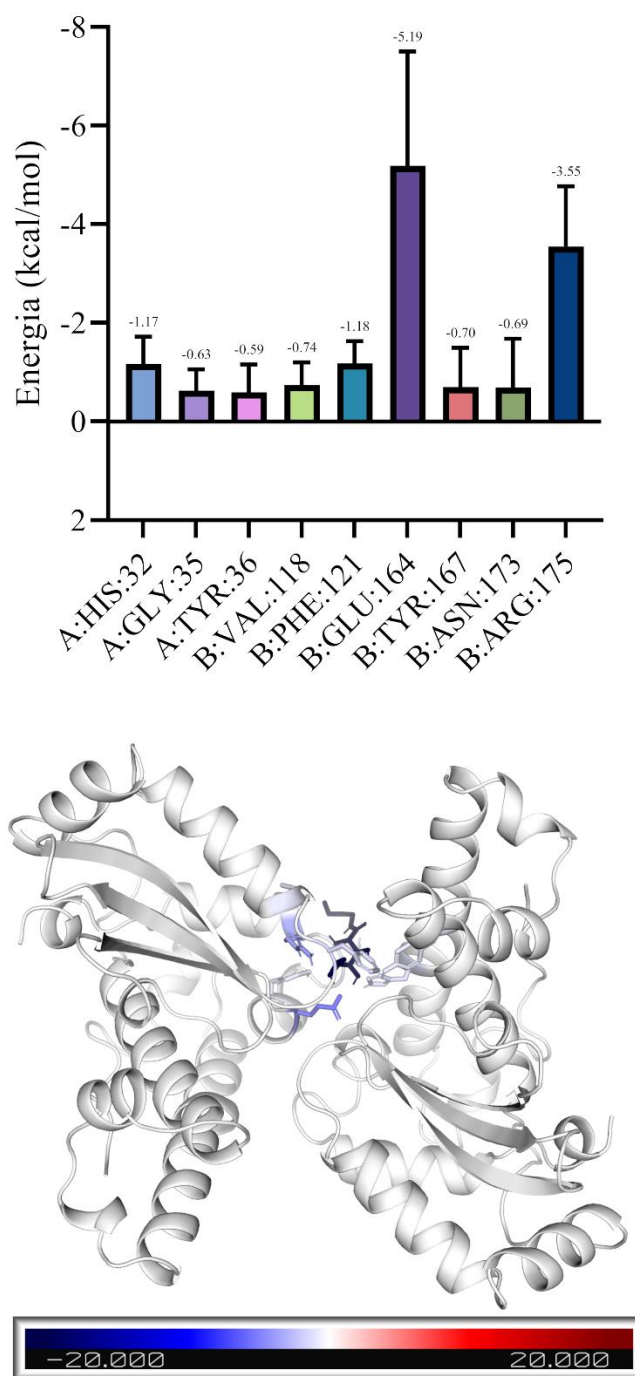


Figura 15: Gráfico de contribuição entálpica (ΔH) por resíduo para o complexo C04-LbSODB2 e representação 3D dos resíduos envolvidos coloridos com base na contribuição energética.

As contribuições entálpicas do complexo C04-LbSODB2 mais significativas foram observadas para GLU:164 ($-5,19 \pm 2,31$ kcal/mol) e ARG:175 ($-3,55 \pm 1,22$ kcal/mol), provavelmente por meio de interações eletrostáticas, pois se tratam de resíduos carregados. Conforme previamente

analisado, esses resíduos também estão entre os principais aceptores/doadores de ligações de hidrogênio, sugerindo seus papéis essenciais na estabilização do complexo.

Além disso, resíduos adicionais como HIS:32 ($-1,17 \pm 0,55$ kcal/mol) e VAL:118 ($-0,74 \pm 0,46$ kcal/mol) se destacam por contribuir favoravelmente por meio de interações de van der Waals.

Para o complexo C11-LbSODB2, a média da contribuição total da entalpia (ΔT_{TOTAL}) foi de $-51,00 \pm 5,84$ kcal/mol. Entre seus componentes, o ΔG_{GAS} apresentou uma variação negativa de $-101,67 \pm 10,04$ kcal/mol, igualmente indicando uma interação energética favorável após a dedução da energia de solvatação do complexo (ΔG_{SOLV} ; $+50,68 \pm 6,52$ kcal/mol) (Figura 16).

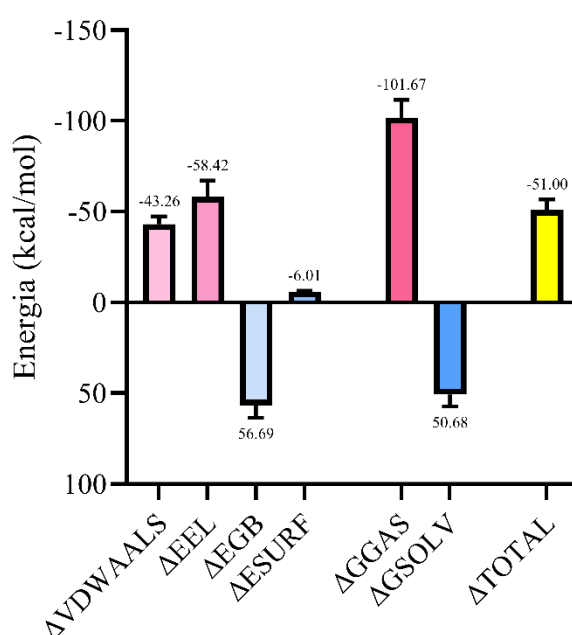


Figura 16: Gráfico de análise MM/PBSA para o complexo C11-LbSODB2. ΔG_{GAS} e seus constituintes estão representados em rosa, ΔG_{SOLV} e seus constituintes apresentados em azul, e a energia entrópica total (ΔT_{TOTAL}) em amarelo.

A análise de decomposição de energia por resíduo para C11-LbSODB2 também destaca o resíduo GLU:164 ($-5,91 \pm 1,86$ kcal/mol), sendo esse o resíduo de maior contribuição em ambos os sistemas, juntamente ao resíduo LYS:31 ($-3,98 \pm 0,73$ kcal/mol) que também possui perfil de contribuição por meio de interações eletrostáticas. Adicionalmente, duas histidinas. HIS:32 ($-3,17 \pm 0,39$ kcal/mol) e HIS:165 ($-3,50 \pm 0,75$ kcal/mol) também contribuem com interações de caráter polar (Figura 17).

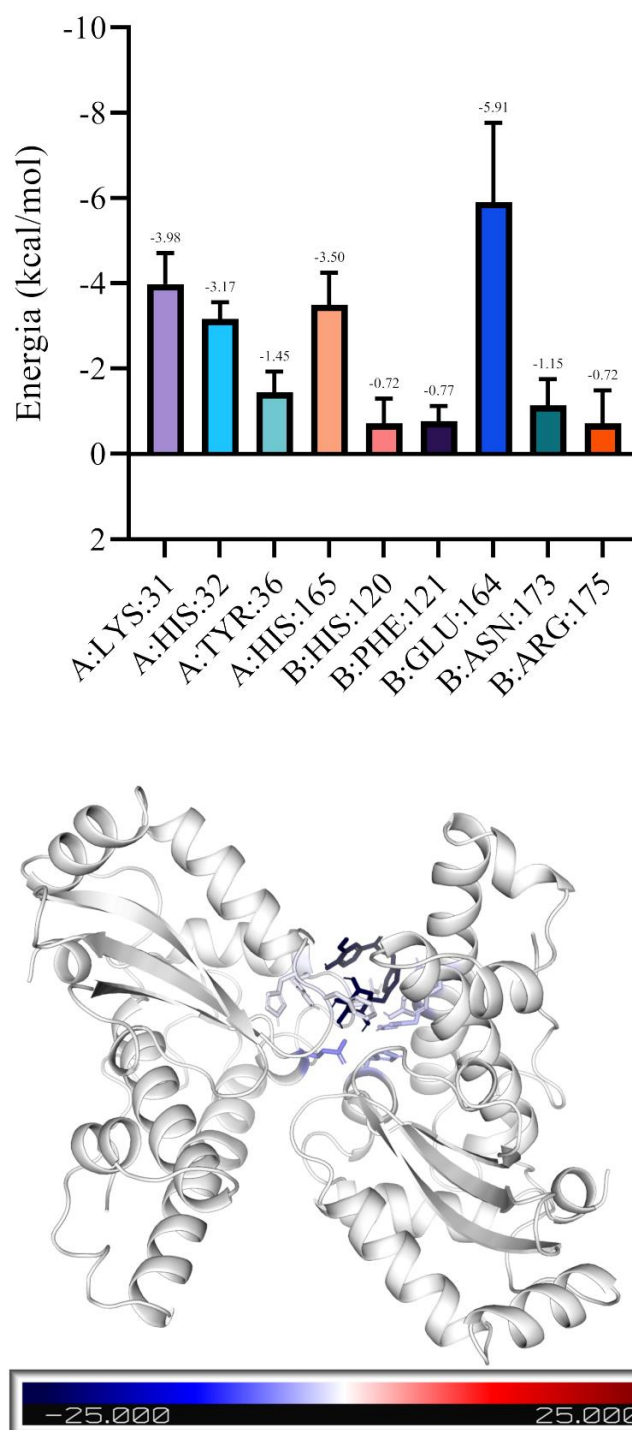


Figura 17: Gráfico de contribuição entálpica (ΔH) por resíduo para o complexo C11-LbSODB2 e representação 3D dos resíduos envolvidos coloridos com base na contribuição energética.

3.5. AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA E DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS C04 E C11

Como parte da avaliação dos dois compostos priorizados, a avaliação das suas propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) é crucial para entender seus perfis farmacocinéticos e de segurança. Embora as análises detalhadas *in vitro* e *in silico* buscam

detalhar o potencial de modulação frente a LbSODB2, o comportamento dos compostos dentro dos sistemas biológicos é igualmente importante durante a busca de potenciais fármacos. Com esse propósito, C04 e C11 foram submetidos ao servidor ADMETlab 3.0 (FU et al., 2024) para análise de descritores moleculares e predição de características farmacocinéticas e de toxicidade. A Tabela 3 apresenta de forma sumarizada os resultados da análise.

Tabela 3: Listagem comparativa dos principais marcadores ADMET calculados para C04 e C11 no servidor ADMETlab.

Parâmetro	C04	C11
Propriedades fármaco-similares (QED)	0,261 (Abaixo do ideal)	0,398 (Abaixo do ideal)
Alertas estruturais	Nenhum alerta	ALARM NMR: 3, Quelante: 1
Permeabilidade Caco-2	-5,151 (Baixa)	-6,198 (Baixa)
Volume de distribuição (VDss)	-0,288 (Subótimo)	-0,392 (Subótimo)
Inibição citocromo P450	Baixo risco geral	Alta inibição para CYP2C8
Mutagenicidade AMES	Alta (0,823)	Moderada (0,503)
Sensibilização da Pele	Alta (0,999)	Baixa (0,063)
Carcinogenicidade	Baixa (0,064)	Moderada (0,415)
Irritação Ocular	Moderado (0,456)	Baixo (0,219)
Toxicidade Respiratória	Baixa (0,014)	Baixa (0,07)
Hepatotoxicidade	Moderada (0,508)	Baixa (0,082)
Nefrotoxicidade	Alta (0,859)	Baixa (0,087)
Ototoxicidade	Alta (0,897)	Alta (0,791)
Hematotoxicidade	Moderada (0,329)	Negligível (0,011)
Genotoxicidade	Alta (0,779)	Baixa (0,036)

Os dados de ADMET revelam que tanto C04 A quanto C11 apresentam limitações para o desenvolvimento farmacêutico, mas com perfis diferentes.

C04 apresenta uma pontuação de propriedades fármaco-similares (do inglês, *drug-likeness*) abaixo do intervalo atrativo para fármacos, indicando menor probabilidade de sucesso como candidato. Apesar de não apresentar alertas estruturais, exibe uma permeabilidade intestinal baixa e distribuição sistêmica subótima, o que limita sua eficácia farmacocinética. No entanto, o maior desafio do C04 está em seu perfil de toxicidade. Ele apresenta alta probabilidade de mutagenicidade, genotoxicidade e nefrotoxicidade, além de alto risco de sensibilização dérmica e ototoxicidade.

C11 também apresenta uma pontuação de propriedades fármaco-similares abaixo do intervalo atrativo para fármacos, e apresenta alertas estruturais relacionados à possibilidade de reatividade e comportamento quelante. A permeabilidade intestinal e biodisponibilidade são ainda mais baixas que C04, com uma distribuição sistêmica igualmente limitada. Além disso, há uma preocupação específica com a alta probabilidade de inibição da enzima CYP2C8, o que pode levar a interações medicamentosas indesejadas. Embora o C11 demonstre menor probabilidade de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em comparação ao C04, ele ainda apresenta moderado risco carcinogênico e alta ototoxicidade. Esses fatores de toxicidade, embora menos graves, limitam sua aplicação.

Com base nesses resultados, C11 apresenta um perfil levemente mais favorável para futuros ajustes, considerando sua menor toxicidade geral em comparação a C04. No entanto, melhorias significativas seriam necessárias, especialmente no aumento da permeabilidade e na redução de alertas estruturais e riscos toxicológicos. O composto C04, embora tenha uma química medicinal mais limpa, enfrenta desafios mais significativos em termos de segurança.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, com o propósito da descoberta de novos inibidores alostéricos para a enzima SODB2 de *Leishmania braziliensis* (LbSODB2), a enzima foi clonada, expressa e purificada com sucesso, permitindo a realização de ensaios de deslocamento térmico com possíveis inibidores alostéricos sintéticos e naturais.

Esses ensaios resultaram na priorização de dois compostos promissores: C04, de origem sintética, e C11, de origem natural. Os resultados obtidos a partir das curvas de deslocamento térmico e dos valores de constante de ligação (K_b) demonstraram o potencial significativo dos compostos

frente à enzima LbSODB2. Esse potencial foi corroborado pelas análises de dinâmica molecular e de MM/PBSA, que reforçaram a afinidade e estabilidade das interações dos compostos com a enzima.

Por outro lado, a avaliação ADMET apontou limitações relevantes no uso dos compostos como candidatos diretos a fármacos, destacando gargalos relacionados à toxicidade e à biodisponibilidade. Essas análises, no entanto, abrem perspectivas para melhorias estruturais nos compostos, visando otimizar suas propriedades farmacológicas para futuros testes e aplicações como candidatos viáveis de tratamento para a leishmaniose. Assim, este estudo contribui para a identificação de potenciais inibidores da LbSODB2, representando um passo inicial promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antileishmania.

REFERÊNCIAS

- BAHRAMI, A. et al. Overexpression of Iron Super Oxide Dismutases A/B Genes Are Associated with Antimony Resistance of *Leishmania tropica* Clinical Isolates. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 17, n. 4, p. 473–482, 2022.
- BHAYANI, J. A.; BALLICORA, M. A. Determination of dissociation constants of protein ligands by thermal shift assay. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 590, p. 1–6, 29 jan. 2022.
- BRITO, C. C. B. et al. Molecular Cloning and Biochemical Characterization of Iron Superoxide Dismutase from *Leishmania braziliensis*. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 8, p. 595–600, ago. 2018.
- CARVALHO, J. D. P. et al. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e04542020, 2021.
- CHANGEUX, J.-P.; CHRISTOPOULOS, A. Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1084–1102, 25 ago. 2016.
- CHOI, H. L. et al. The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009181, 18 fev. 2021.
- CHRISTOPOULOS, A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 198–210, mar. 2002.
- COOPER, J. B. et al. X-ray structure analysis of the iron-dependent superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis* at 2.0 Angstroms resolution reveals novel dimer-dimer interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, n. 4, p. 531–544, 3 mar. 1995.

DOÑATE, F. et al. Identification of biomarkers for the antiangiogenic and antitumour activity of the superoxide dismutase 1 (SOD1) inhibitor tetrathiomolybdate (ATN-224). **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 4, p. 776–783, fev. 2008.

EKBERG, V.; RYDE, U. On the Use of Interaction Entropy and Related Methods to Estimate Binding Entropies. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 8, p. 5379–5391, 10 ago. 2021.

FERREIRA, L. C. et al. Comparison between Colorimetric In Situ Hybridization, Histopathology, and Immunohistochemistry for the Diagnosis of New World Cutaneous Leishmaniasis in Human Skin Samples. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 11, p. 344, 1 nov. 2022.

FU, L. et al. ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W422–W431, 5 jul. 2024.

GARZA-TOVAR, T. F. et al. An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Faculty Reviews**, v. 9, p. 28, 22 dez. 2020.

GEDGAUDAS, M. et al. Thermott: A comprehensive online tool for protein–ligand binding constant determination. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2076–2079, 1 ago. 2022.

GETACHEW, F.; GEDAMU, L. Leishmania donovani mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 42–51, 1 maio 2012.

HALILOGLU, T.; HACISULEYMAN, A.; ERMAN, B. Prediction of allosteric communication pathways in proteins. **Bioinformatics**, v. 38, n. 14, p. 3590–3599, 11 jul. 2022.

IRWIN, J. J. et al. ZINC20—A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 12, p. 6065–6073, 28 dez. 2020.

KAILASAM NATESAN, V.; KUPPANNAGOUNDER PITCHAIMUTHU, E. Structure-based drug design and molecular dynamics studies of an allosteric modulator targeting the protein–protein interaction site of PDK1. **Journal of Molecular Modeling**, v. 30, n. 2, p. 51, 26 jan. 2024.

KENAKIN, T. P. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 6, p. 1659–1669, mar. 2012.

KOPRA, K. et al. Thermal Shift Assay for Small GTPase Stability Screening: Evaluation and Suitability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7095, jan. 2022.

LUSHCHAK, V. et al. Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 4, p. 1739–1744, 30 dez. 2005.

MAANE, M. et al. Characterization of ligand-induced thermal stability of the human organic cation transporter 2 (OCT2). **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 16 mar. 2023.

MAURYA, R.; NAMDEO, M. Superoxide Dismutase: A Key Enzyme for the Survival of Intracellular Pathogens in Host. Em: AHMAD, R. (Ed.). **Biochemistry**. [s.l.] IntechOpen, 2022. v. 28.

MCNUTT, A. T. et al. GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. **Journal of Cheminformatics**, v. 13, n. 1, p. 43, 9 jun. 2021.

MORAIS, R. C. S. D. et al. Clinical-therapeutic follow-up of patients with American cutaneous leishmaniasis caused by different *Leishmania* spp. in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 240, p. 108338, set. 2022.

MUÑOZ, I. G. et al. The crystal structure of an eukaryotic iron superoxide dismutase suggests intersubunit cooperation during catalysis. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 14, n. 2, p. 387–394, fev. 2005.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, set. 2007.

PENA, H. P. et al. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 10, p. 1168–1181, out. 2020.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 245–262, fev. 2010.

PUTRA, PURNAWAN PONTANA. Deep Learning Docking with GNINA Software. 2023.

REDHEAD, M. et al. Thermal Shift as an Entropy-Driven Effect. **Biochemistry**, v. 56, n. 47, p. 6187–6199, 28 nov. 2017.

ROSA, A. C. et al. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1844, 25 mar. 2021.

SAMANTA, R. et al. Emergence of allostery through reorganization of protein residue network architecture. **The Journal of Chemical Physics**, v. 158, n. 8, p. 085104, 28 fev. 2023.

SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210401, 2022.

SANZ, A. M. et al. Efficient Inhibition of Iron Superoxide Dismutase and of Trypanosoma cruzi Growth by Benzo[g]phthalazine Derivatives Functionalized with One or Two Imidazole Rings. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1962–1966, 1 mar. 2008.

SARATHKUMAR, B.; LAKSHMI, B. S. In silico investigations on the binding efficacy and allosteric mechanism of six different natural product compounds towards PTP1B inhibition through docking and molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Modeling**, v. 25, n. 9, p. 272, 26 ago. 2019.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, maio 2021.

SOUZA, B. C. DE et al. Identification of potential *Leishmania chagasi* superoxide dismutase allosteric modulators by structure-based computational approaches: homology modelling, molecular dynamics and pharmacophore-based virtual screening. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 18, p. 7000–7016, 12 dez. 2021.

TESSAROLLO, N. G. et al. Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. **Parasitology International**, v. 64, n. 2, p. 125–129, 1 abr. 2015.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 12 out. 2021.

VERONICA, J. et al. Iron superoxide dismutase contributes to miltefosine resistance in *Leishmania donovani*. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 17, p. 3488–3503, 2019.

VOLPEDO, G. et al. Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 32, 2 mar. 2022.

WAMAI, R. G. et al. Visceral leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, p. e3, 2020.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WHO, W. H. O. **Leishmaniasis**. Overview. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 mar. 2024.

WIJNANT, G.-J. et al. Tackling Drug Resistance and Other Causes of Treatment Failure in Leishmaniasis. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, p. 837460, 12 maio 2022.

WILHELM, A. et al. 2-(3-Oxo-1,3-diphenylpropyl)malonic acids as potent allosteric ligands of the PIF pocket of phosphoinositide-dependent kinase-1: development and prodrug concept. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9817–9830, 26 nov. 2012.

WOOTEN, D.; CHRISTOPOULOS, A.; SEXTON, P. M. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 8, p. 630–644, ago. 2013.

MATERIAL SUPLEMENTAR

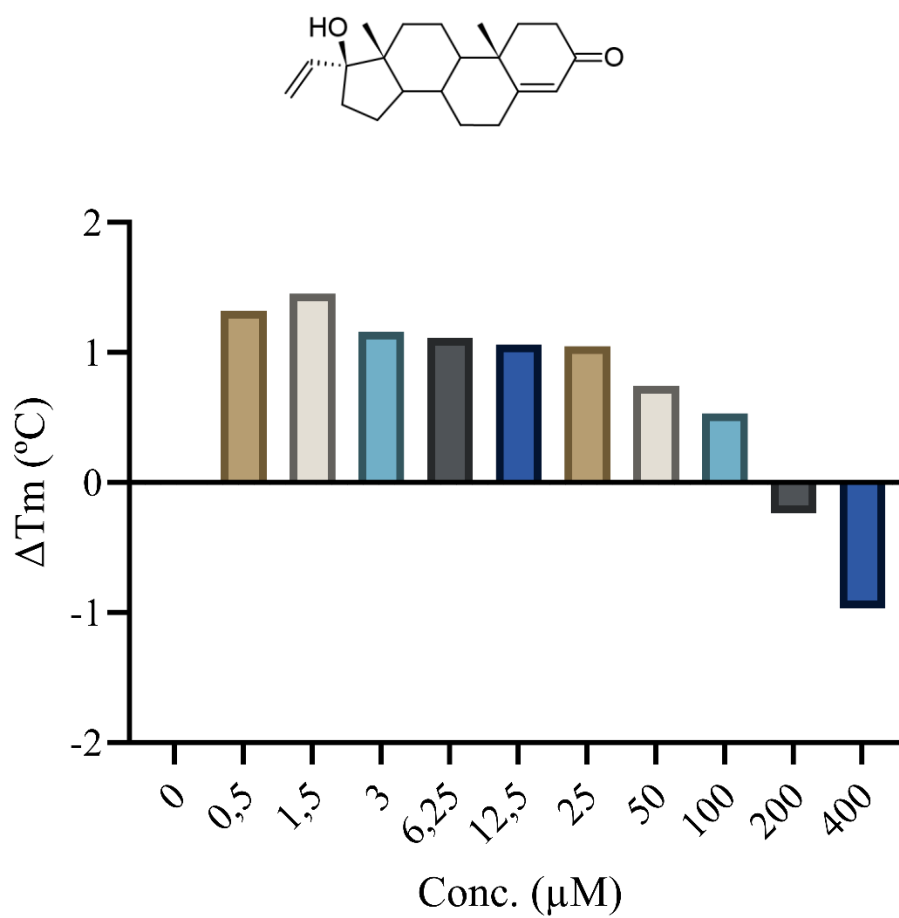


Figura 1S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C01 frente a LbSODB2.

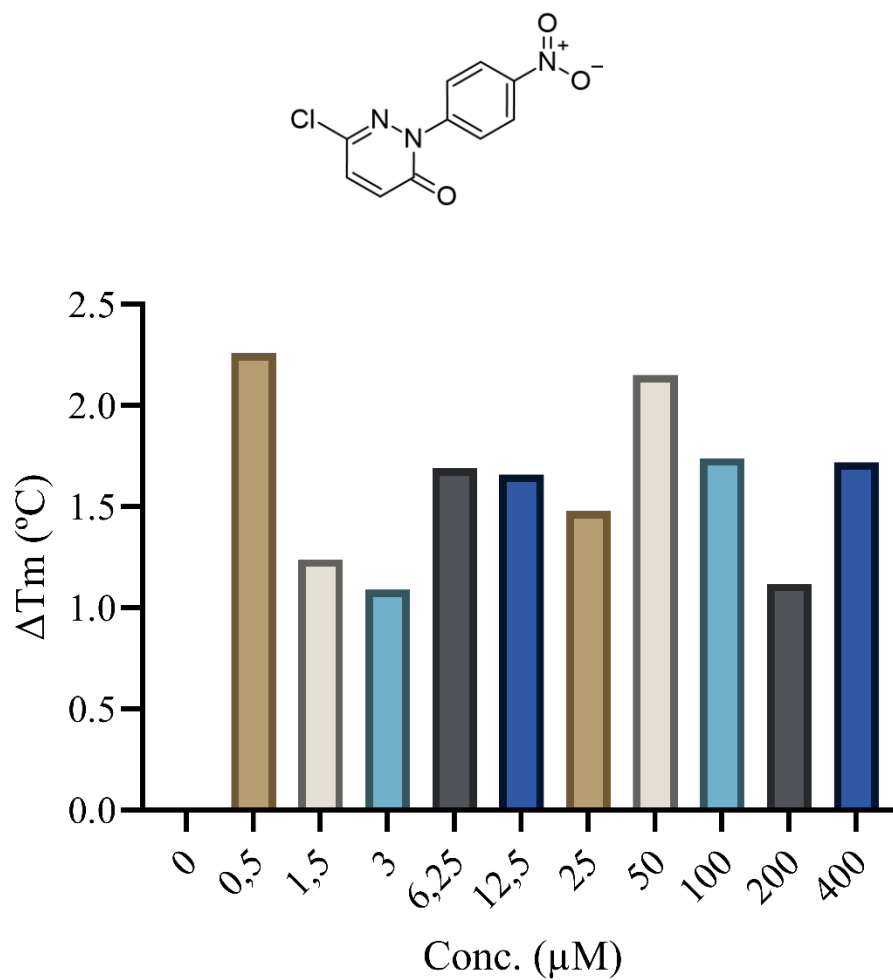


Figura 2S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μ M) para o composto C02 frente a LbSODB2.

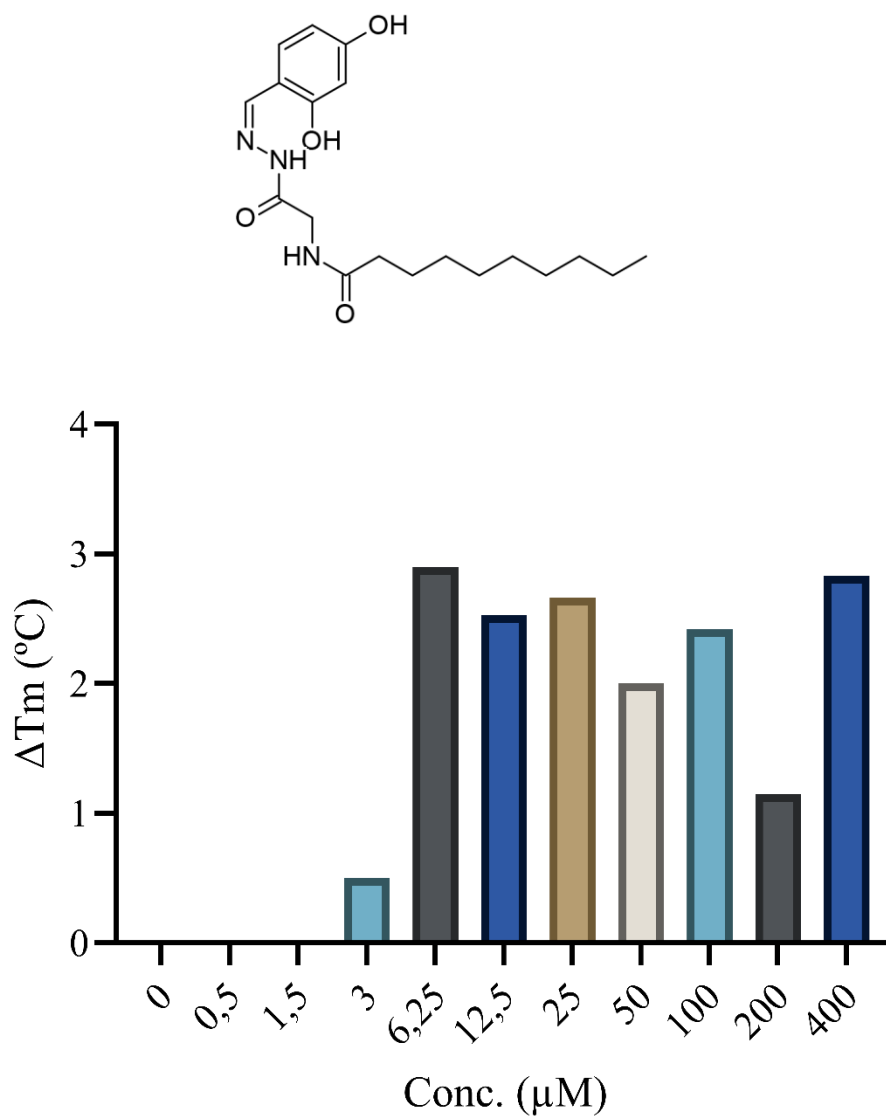


Figura 3S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C03 frente a LbSODB2.

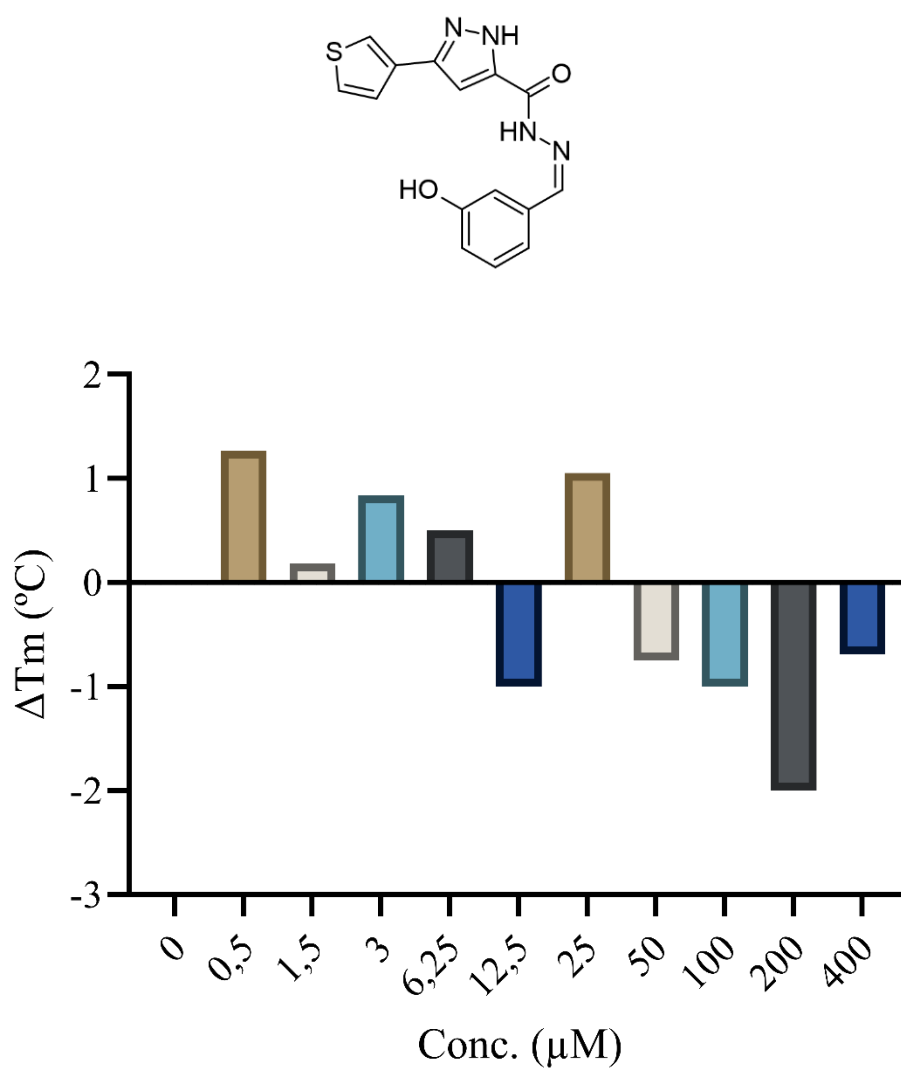


Figura 4S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C05 frente a LbSODB2.

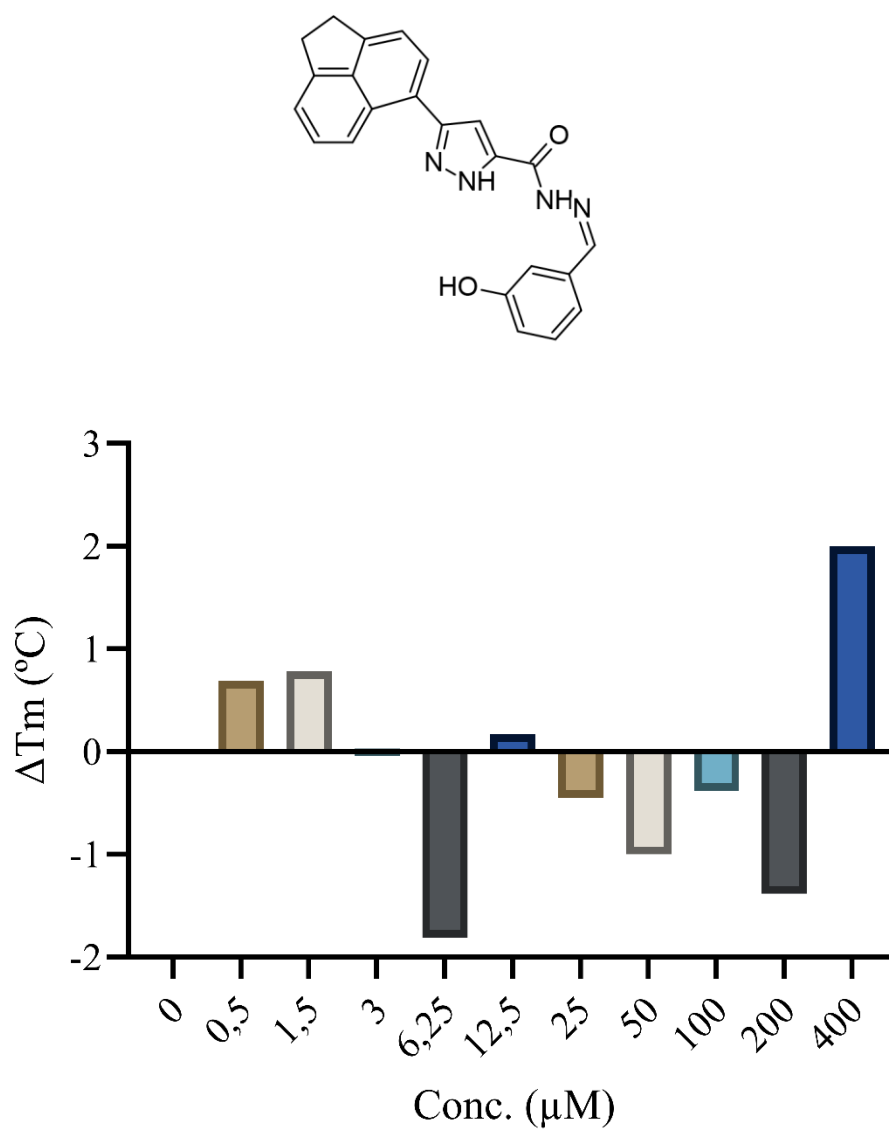


Figura 5S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C06 frente a LbSODB2.

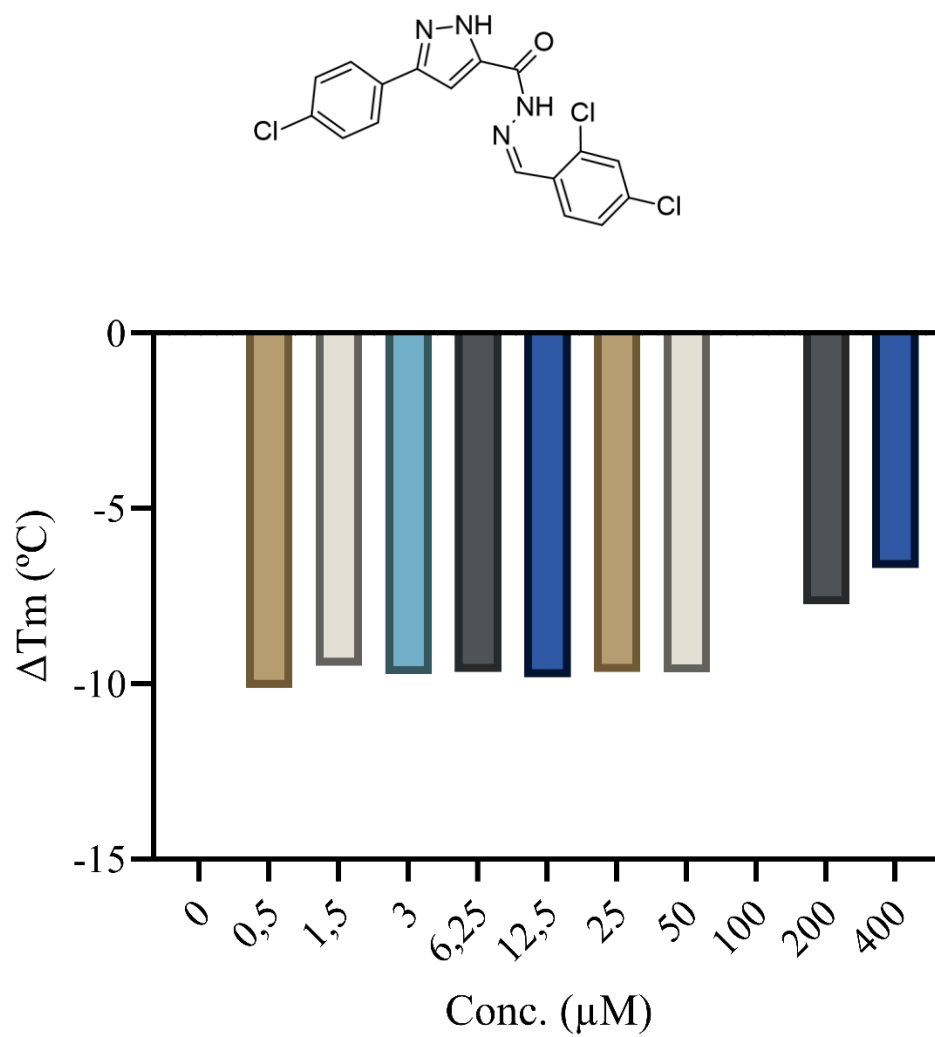


Figura 6S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μ M) para o composto C07 frente a LbSODB2.

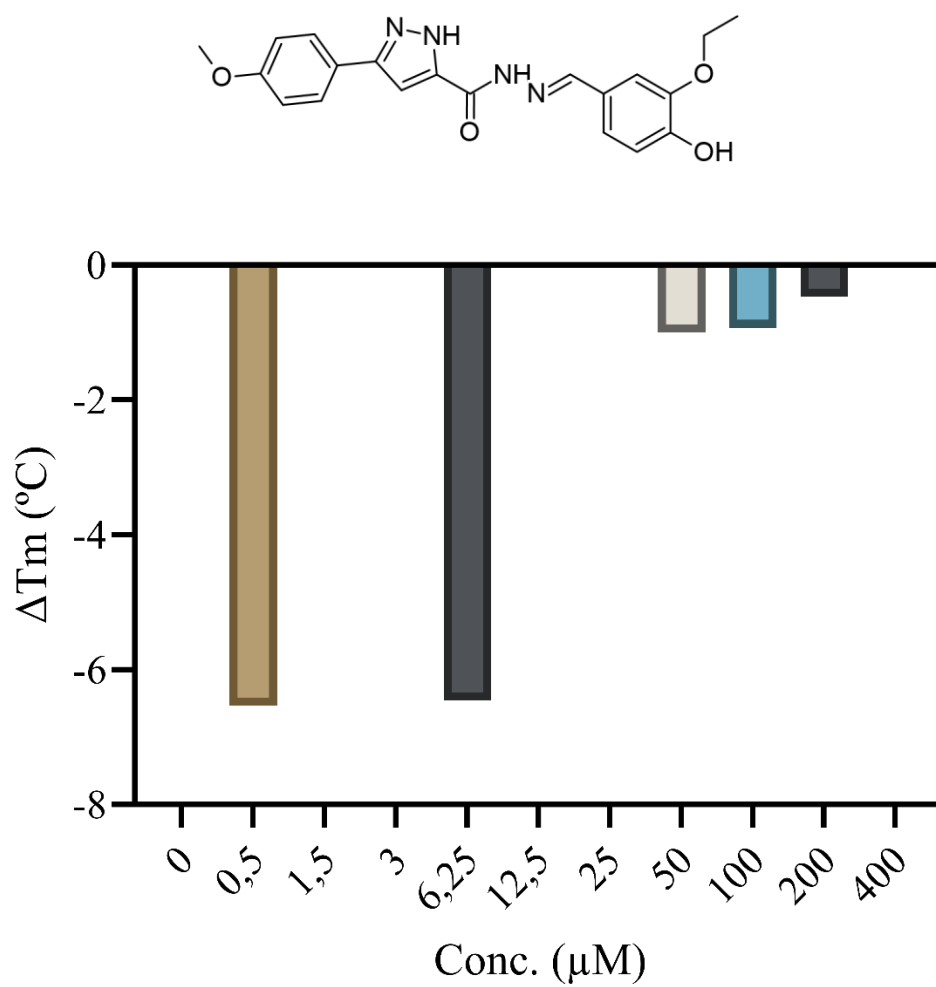


Figura 7S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C08 frente a LbSODB2.

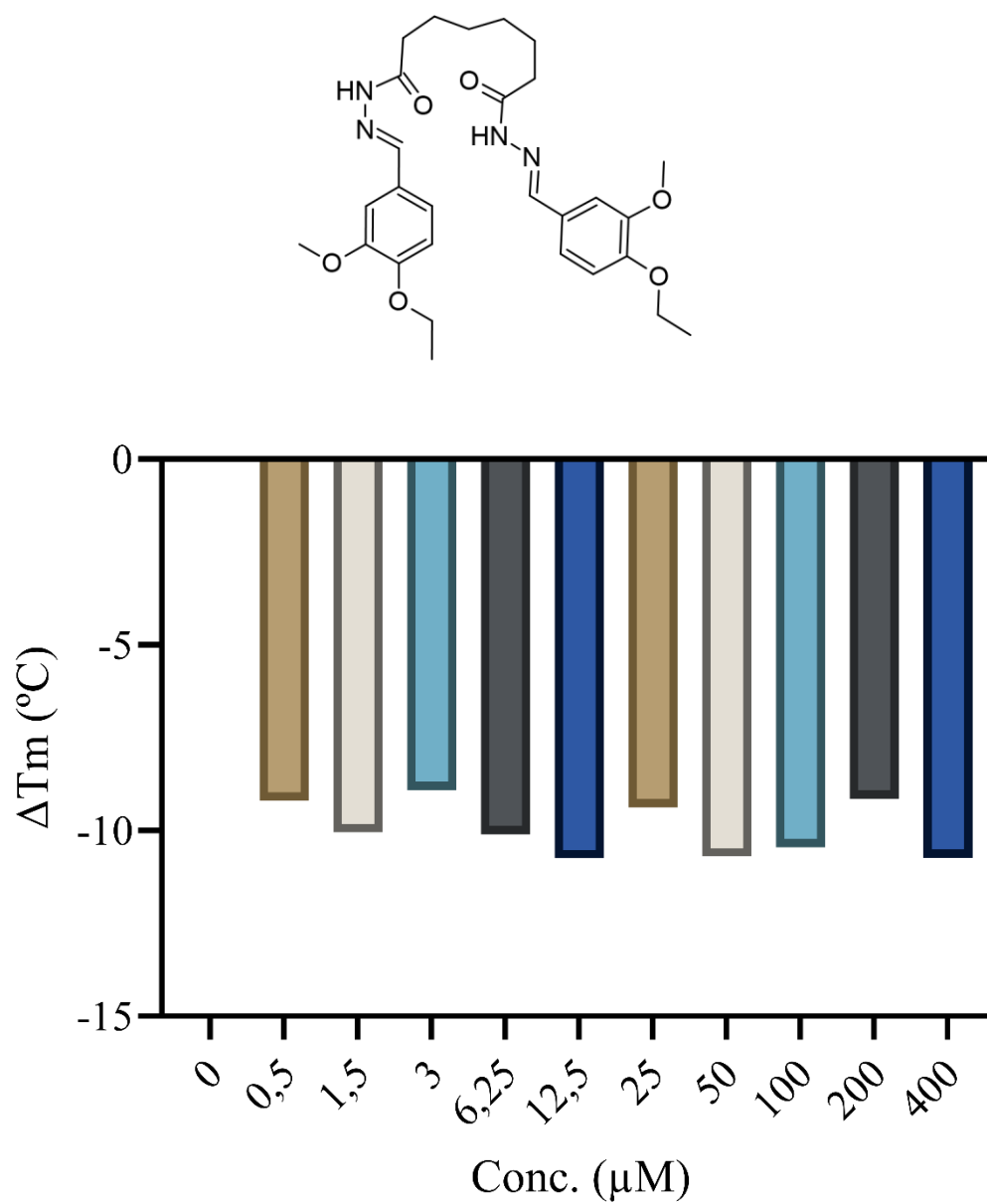


Figura 8S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C09 frente a LbSODB2.

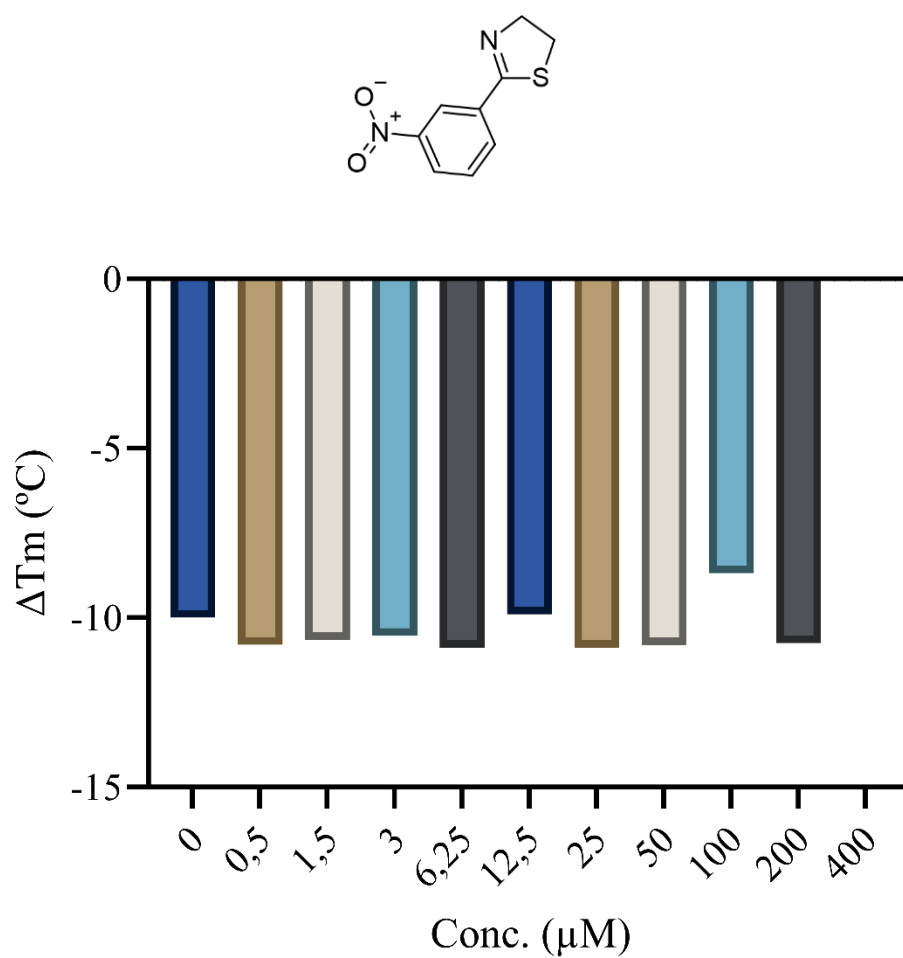


Figura 9S. Gráfico da média da variação de ΔT_m no ensaio de concentração resposta (10 concentrações; 0 - 400 μM) para o composto C10 frente a LbSODB2.