Artigo

Planejamento de Novos Compostos para a Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) de *Leishmania mexicana* a partir de Modelagem Molecular

Rodrigues, M. H. C.; da Costa, A. P. L.; Molfetta, F. A.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (2), 536-552. Data de publicação na Web: 17 de Abril de 2020

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

Design of New Compounds for Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Enzyme of *Leishmania mexicana* from Molecular Modeling

Abstract: Leishmaniosis is a disease caused by protozoans of the *Leishmania* genus, which is an endemic disease in more than 98 countries. Besides, leishmaniosis is among the so-called neglected tropical diseases, with little interest of clinical researches, there is no vaccine and therapeutic arsenal is very inadequate. The glycolytic pathway of protozoa responsible for the disease has been investigated as an attractive molecular target for design new drugs, and one of the enzymes that have aroused interest is the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Thus, the objective of this work was to find possible inhibitors for the GAPDH enzyme from *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) in order to improve the complementarity of lead compound. The search was made on PubChem, ZINC and SciFinder databases, and all analogues were then subjected to toxicity prediction. The docking calculations results with GAPDH enzyme showed important hydrogen bonds with the residues of amino acids Arg249, Ser224, Ser226, Thr167 and Thr226, showing the same interactions obtained in the literature data. Also, molecular docking of all these compounds was checked against human GAPDH enzyme, to minimize adverse reactions. From this, we selected the most promising ligand to Molecular Dynamics (MD) simulations, and, subsequently, the Root Mean Square Deviation (RMSD) values showed that system was stable and the value of binding free energy was favorable. Thus, the results obtained in this study to selected compound can be used to design new candidates to inhibitors of the GAPDH enzyme from *L. mexicana*.

Keywords: Leishmaniosis; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Molecular docking; Molecular dynamics.

Resumo

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo endêmica em mais de 98 países. Além disso, a leishmaniose está entre as chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas, havendo pouco interesse de pesquisa clínica, nenhuma vacina e um arsenal terapêutico bastante inadequado. A via glicolítica dos protozoários responsáveis pela doença tem sido investigada como um alvo atrativo para o planejamento novos fármacos, e uma das enzimas que vem despertando interesse é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Assim, este trabalho teve como objetivo encontrar possíveis inibidores para a enzima GAPDH de *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) a partir de um composto matriz, a fim de se aumentar sua complementariedade. A busca foi feita na base de dados dos servidores PubChem, ZINC e SciFinder, e todos os compostos análogos foram submetidos a uma predição de toxidez. Os compostos foram submetidos à etapa de docagem molecular com a enzima GAPDH e os resultados mostraram importantes ligações de hidrogênio com os resíduos Arg249, Ser224, Ser226, Thr167 e Thr226, mostrando as mesmas interações obtidas na literatura. Também foi feita uma docagem de todos os compostos na enzima da GAPDH humana, para minimizar reações adversas. Disto, foi selecionado o ligante mais promissor para a etapa de Dinâmica Molecular (DM) e, posteriormente, com o resultado obtido pelos valores da Raiz do Desvio Quadrático Médio (*Root Mean Square Deviation* – RMSD) verificou-se que o complexo apresentou estabilidade, e que o valor de energia livre de ligação foi favorável. Assim, os resultados obtidos neste estudo mostraram que o composto selecionado pode ser usado para o planejamento de novos candidatos a inibidores da enzima GAPDH de *L. mexicana*.

Palavras-chave: Leishmaniose; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Docagem molecular; Dinâmica molecular

* Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Modelagem Molecular, R. Augusto Corrêa, 0, CEP 60075-110, Belém-PA, Brasil.

fabioam@ufpa.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20200042](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200042)

Planejamento de Novos Compostos para a Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) de *Leishmania mexicana* a partir de Modelagem Molecular

Mariano H. C. Rodrigues, Ana P. L. da Costa, Fábio A. Molfetta*

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Modelagem Molecular, R. Augusto Corrêa, 0, CEP 60075-110, Belém-PA, Brasil.

*fabioam@ufpa.br

Recebido em 16 de Outubro de 2019. Aceito para publicação em 2 de Abril de 2020

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação da enzima e busca de ligantes

2.2. Métodos da docagem molecular

2.3. Métodos da dinâmica molecular (DM)

2.4. Cálculo de energia MMGB/MMPB

3. Resultados e discussão

3.1. Resultados da docagem molecular

3.2. Alinhamento enzimático

3.3. Resultados da dinâmica molecular e energia livre

4. Conclusão

1. Introdução

A Leishmaniose é uma doença parasitária de pele, mucosas e vísceras causada pelos protozoários da família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*, cuja transmissão ocorre pela picada do inseto flebotomíneo fêmea infectado.¹⁻⁴ A *Leishmania* possui dois ciclos de vida, sendo a forma amastigota intracelular encontrada em fagócitos mononucleados do mamífero hospedeiro, e a promastigota presente no intestino do vetor.^{5,6}

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são doenças parasitárias e bacterianas que permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento, representando um grande

desafio para a política de saúde global devido ao arsenal terapêutico limitado, pouco interesse de pesquisa clínica e falta de desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica.^{7,8} De acordo com a Organização Mundial de saúde (OMS), a Leishmaniose se encontra entre as 11 principais DTNs.⁹ Além disso, a Leishmaniose representa um sério problema de saúde mundial pelo seu amplo conjunto de manifestações clínicas potencialmente fatais.^{10, 11} Com elevadas taxas de incidência mundial, a leishmaniose é endêmica em mais de 98 países, sendo 15 milhões de pessoas infectadas e mais de 1 bilhão vivendo em áreas endêmicas sob o risco de infecção. Além disso, estima-se 1,6 milhões de novos casos por ano, associados a 70.000 mortes causadas pela doença.¹²

Empregados a partir de 1940, os antimoniais pentavalentes estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina são considerados como fármacos terapêuticos de primeira linha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose.¹³ Contudo, tais medicamentos têm demonstrado desenvolvimento de resistência, reações tóxicas e efeitos colaterais.¹⁴ No caso de resistência aos antimoniais, uma vez que estes têm exibido 60% de falha no tratamento, são empregados a anfotericina B e pentamidina como substâncias de segunda escolha.¹⁵ Os fármacos de segunda linha são mais eficazes que os antimoniais pentavalentes, porém preservam a alta toxidez, necessidade de administração parenteral e efeitos colaterais graves.^{16, 17}

Clinicamente, a doença se apresenta sob três formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco-cutânea (LCM) e leishmaniose visceral (LV), sendo a LC a forma mais comum da doença, com 700.000 a 1,2 milhões de casos por ano.^{18, 19} Dentre as espécies de Leishmaniose, a *L. mexicana* é responsável pela infecção cutânea crônica progressiva, não cicatrizante, causando lesões que podem persistir por meses ou anos.²⁰

A via glicolítica de *tripanossomatídeos* tem sido investigada para intervenção farmacêutica, visto que estes parasitos utilizam a glicólise como fonte principal de energia metabólica.²¹ Esta dependência vital da glicólise como fonte de energia dos protozoários tornam as enzimas glicolíticas promissores alvos para o planejamento de novos fármacos.²² Dentre as enzimas da via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) tem despertado grande interesse por realizar a catálise oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) na sexta reação glicolítica, que uma vez bloqueada impossibilita a manutenção energética dos protozoários.²³

Devido à necessidade de desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e seguros contra a leishmaniose, este trabalho teve por objetivo a descoberta de compostos capazes de

inibir a enzima GAPDH de *L. mexicana*. Para isso, foi feita uma busca de derivados de um composto matriz selecionado no estudo de Alves et al.,²⁴ a fim de se aumentar a complementariedade molecular e realizar análises de docagem, DM, cálculos do RMSD, gráficos de interação por resíduo e de energia livre, para selecionar o composto mais promissor para futuros ensaios biológicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação da enzima e busca de ligantes

A estrutura da enzima GAPDH de *L. mexicana* foi recuperada a partir do *Protein Data Bank* (PDB) com o código 1I32.²⁵ A estrutura foi pré-processada no programa Chimera²⁶ com a exclusão do ligante cristalográfico e das moléculas de água. Os servidores *PubChem*,²⁷ *ZINC*²⁸ e *SciFinder*²⁹ foram usados para a busca de novos derivados com características análogas ao composto matriz L18 (N-(3,4,5,6 – Tetrahidróxi-1-azohex-1-enil)(2-hidróxifenil) carboxamida) selecionado no estudo de Alves²⁴ (Figura 1) com similaridade de 95 % a 99 %.

Nesta busca também foi incluída uma restrição em relação à massa molar dos compostos, menor ou igual a 500 Daltons, segundo a regra de Lipinski,³⁰ devido à possibilidade da realização de posteriores modificações nas estruturas para tentar melhorar a atividade da molécula e, com isso, obter compostos com maiores chances de adquirirem perfis fármaco-similares.^{31, 32}

Devido à toxidez ser um dos fatores que mais contribuem para o declínio do desenvolvimento de novas entidades químicas,³³ os ligantes selecionados passaram por uma análise toxicofórica no servidor *Online Chemical Database*,³⁴ verificando a possível presença de grupos mutagênicos, genotóxicos e carcinogênicos.

Figura 1. Estrutura do composto matriz L18, obtido em estudo de Alves

2.2. Métodos da docagem molecular

A docagem molecular é um método utilizado para prever o modo de ligação de compostos no sítio ativo da proteína, sendo capaz de determinar as mudanças de conformação do ligante por meio de interação no alvo de maneira a formar um complexo (enzima-ligante).³⁵ Duas são as etapas que definem a docagem molecular: o algoritmo de busca e a função de pontuação. O algoritmo de busca compreende um conjunto de parâmetros que predizem as possíveis conformações e orientações do ligante no sítio ativo da macromolécula, e a função de pontuação é utilizada pelo programa para fornecer a classificação de compostos baseados na afinidade de ligação do complexo.³⁶ A docagem é largamente utilizada para a triagem virtual de moléculas candidatas a fármacos com promissora atividade contra determinado alvo.³⁷

A docagem foi realizada usando dois programas com algoritmos de busca e funções de pontuação diferentes: o programa DOCK 6.5,³⁸ que utiliza o algoritmo incremental; e o AutoDock Vina 1.1.2 (Vina),³⁹ que utiliza o algoritmo genético. Na docagem pelo programa Vina os ligantes foram preparados no programa Chimera²⁶ com adição de hidrogênios, seguida pela adição de cargas de Gasteiger no AutoDockTools (ADT) 1.5.6.^{40,41}

Na etapa seguinte, através do programa ADT foram adicionados hidrogênios polares e cargas de Kollman⁴² na cadeia A do alvo enzimático. Como os resíduos de aminoácidos Cys166 e His194 participam na catálise enzimática da enzima GAPDH,⁴³ estes foram selecionados como flexíveis, ao passo que as demais estruturas da macromolécula foram mantidas rígidas durante a simulação. A região para interação com o sítio ativo foi definida pelas grades de afinidade, com a dimensão de 40 x 40 x 40 Å e as seguintes coordenadas: x = 21,579; y = -15,703; z = 18,008.

Acerca da docagem utilizando o programa DOCK, seguiu-se o protocolo do preparo dos ligantes no programa Chimera, pela adição de hidrogênios e cargas do pelo método semi-empírico AM1-BCC.⁴⁴ A partir do alvo molecular preparado, foi gerada a superfície molecular de Connolly⁴⁵ pelo módulo dms, e posteriormente o programa SPHGEN⁴⁶ foi utilizado para geração de esferas complementares à superfície da enzima com raio de 8 Å do ligante. As esferas geradas foram englobadas por uma caixa tridimensional com

margem extra de 6 Å, com grades tridimensionais de 0,3 Å de resolução, a partir do módulo grid.⁴⁷

Os arquivos de saída dos programas de docagem foram submetidos a uma inspeção visual das interações no servidor *online* PoseViewWeb 1.97.0.⁴⁸ para verificar as interações entre a enzima GAPDH e os ligantes.

Como a enzima GAPDH também atua na via glicolítica humana buscou-se por inibidores provavelmente seletivos em relação à isoforma do parasito para minimizar as reações adversas.⁴⁹ Dessa forma, os ligantes selecionados após a inspeção visual foram docados na enzima GAPDH humana (PDB:1U8F) com os programas DOCK 6.5 e Vina 1.1.2, a fim de selecionar moléculas provavelmente capazes de modular apenas a atividade da enzima GAPDH de *L. mexicana*.

2.3. Métodos da dinâmica molecular (DM)

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica computacional amplamente utilizada para estudar as estruturas de equilíbrio e as interações dinâmicas dos sistemas biológicos. A técnica fornece informações adicionais sobre variações dependentes do tempo e mudanças conformacionais dos complexos (enzima-inibidor) que podem estar relacionadas às suas funcionalidades.⁵⁰

Os cálculos de DM foram realizados utilizando o programa AMBER 12⁵¹ e o ligante selecionado teve sua carga do potencial eletrostático calculada pelo programa Gaussian 03,⁵² aplicando-se o método Hartree-Fock (HF)⁵³ e o conjunto de base de valência dividida 6-31G*. Na simulação de DM, utilizou-se o campo de força AMBER ff99SB⁵⁴ para a parametrização dos aminoácidos da enzima, enquanto que o campo de força ff99SB em conjunto com o campo de força AMBER geral (GAFF)⁵⁵ foi aplicado para o ligante do estudo. Os parâmetros de campo de força foram gerados usando o módulo Antechamber,⁵⁶ e a estrutura da enzima foi construída a partir de sua sequência de aminoácidos usando o módulo Leap, presente no programa AMBER 12.

No passo seguinte, gerou-se uma caixa cúbica de 1728 Å³, com moléculas de água TIP3P,⁵⁷ com posterior adição de seis contra-íons cloreto para neutralizar o sistema. O complexo enzima-ligante passou por 55.000 ciclos de minimização, a fim de minimizar o efeito de contato ou da sobreposição de átomos entre as moléculas do sistema. Na primeira etapa deste procedimento

foram realizados 25.000 passos de minimização, onde 10.000 passos foram efetuados com o método *steepest descent* e os outros 15.000 com o método de gradientes conjugados. Além disso, a minimização seguiu três etapas adicionais simuladas em 10.000 passos de minimização cada, empregando-se os dois métodos descritos.

O sistema minimizado foi gradualmente aquecido até 298K no conjunto NVT pelo algoritmo de Langevin,⁵⁸ com átomos restringidos por uma constante de força igual a 25 kcal/mol.Å². As condições periódicas de contorno usando o método PME (*Particle Mesh Ewald*)⁵⁹ foram empregadas para interações eletrostáticas de longo alcance, empregando-se um raio de corte de 9 Å. As etapas de minimização e aquecimento foram realizadas com o módulo SANDER⁶⁰, também incluso no pacote AMBER 12. As ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas pelo algoritmo SHAKE.⁶¹ As equações de movimento foram integradas a cada 2 fs usando o algoritmo Verlet.⁶² Dessa forma, empregando-se os métodos descritos, seguiu-se a simulação do complexo enzima-ligante em 10 ns no conjunto NPT sob a temperatura de 298 K. Nas simulações de DM, as medidas dos valores do RMSD foram utilizadas para estabelecer o desvio médio entre os átomos da proteína, em resposta às variações conformacionais do complexo enzima-ligante. Em adição, foi empregada uma análise quantitativa das flutuações estruturais dos resíduos aminoácidos da enzima através do gráfico do fator-B.

2.4. Cálculo de energia MMGB/MMPB

Neste estudo, os cálculos da energia livre de ligação na etapa de DM foram realizados pelos métodos MM-PBSA (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) e MM-GBSA (*Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*),⁶³ contidos no pacote AmberTools do programa AMBER 12. Os métodos MM-PBSA e MM-GBSA são ferramentas computacionais eficientes, altamente capazes de prever a energia livre dos complexos simulados.⁶⁴

As equações que descrevem os cálculos de energia são:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S, \quad (1)$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{int}} + \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdw}}, \quad (2)$$

$$\Delta E_{\text{int}} = \Delta E_{\text{ligação}} + \Delta E_{\text{ângulo}} + \Delta E_{\text{torção}}, \quad (3)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{(PB/GB)}} + \Delta G_{\text{n-polar}} \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{n-polar}} = \gamma \cdot \text{SASA} \quad (5)$$

Da Equação (1), ΔE_{MM} se refere à energia obtida pela Mecânica Molecular, ΔG_{sol} é a energia livre de solvatação, ΔH é a entalpia e $T\Delta S$ é o termo entrópico. Na Equação (2) o termo ΔE_{MM} é resultado das contribuições individuais de energia interna (ΔE_{int}), eletrostática (E_{ele}) e de Van der Waals (ΔE_{vdw}). Da mesma maneira, a Equação (3) explicita o somatório que compõe a energia interna, sendo as contribuições de ligação ($\Delta E_{\text{ligação}}$), ângulo ($\Delta E_{\text{ângulo}}$) e o ângulo de torção ($\Delta E_{\text{torção}}$). Da Equação (4), a energia de livre de solvatação é separada em energia livre polar ($\Delta G_{\text{PB/GB}}$) e não polar ($\Delta G_{\text{n-polar}}$), sendo que a contribuição eletrostática polar para a energia livre de solvatação pode ser calculada pelo método de Poisson-Boltzmann (PB) ou pelo métodos da aproximação generalizada de Born (GB), ao passo que a energia não polar é estimada pelo produto entre a tensão superficial γ e a área acessível do solvente (SASA),⁶⁵ conforme a Equação (5).⁶⁶

3. Resultados e discussão

3.1. Resultados da docagem molecular

Primeiramente, foi feita a redocagem do ligante cristalográfico da enzima recuperada do PDB (código 1I32) nos programas Vina 1.1.2 e DOCK 6.5 para a seleção do programa de docagem.

Na Figura 2 são mostrados os resultados da redocagem do ligante cristalográfico realizadas nos programas Vina e Dock. Por meio da redocagem pode-se observar que a conformação predita pelo programa Vina apresentou o ligante mais próximo da região catalítica do sítio ativo da enzima formada pelos resíduos Cys166 e His194.⁴³ Portanto, dessa maneira utilizou-se o Vina para a realização da docagem do conjunto de moléculas.

Após a seleção do programa melhor parametrizado para a enzima em estudo, foram selecionados oito compostos análogos ao composto matriz, com similaridade de 95 % a 99 %, nos servidores *PubChem*, *ZINC* e *SciFinder* (Tabelas 1 e 2). Constatou-se que nenhum composto apresentou toxidez pela análise no servidor *Online Chemical Database*.

Figura 2. Região catalítica do sítio ativo da enzima GAPDH de *L. mexicana* formada pelos resíduos Cys166 e His194 (destacados em vermelho) e em amarelo o ligante cristalográfico. Conformações obtidas pelos programas Vina (verde) e DOCK (azul) para o ligante cristalográfico (A). Conformação obtida pelo programa Vina do ligante cristalográfico próximo aos resíduos Cys166 e His194 (B)

Tabela 1. Compostos selecionados através da busca no banco de dados

Ligante	Código	Servidor
LIG1	ST50994409	PubChem
LIG2	CHEMBL3091866	PubChem
LIG3	CHEMBL3091905	PubChem
LIG4	CHEMBL3544856	PubChem
LIG5	1099823-32-1	SciFinder
LIG6	ST50984670	PubChem
LIG7	STK369980	PubChem
LIG8	ZINC4763716	ZINC

Na docagem realizada com os ligantes selecionados foi feito um ranqueamento de acordo com os valores de energia de afinidade de ligação obtidos pelo programa Vina (Tabela 3). A partir destes valores, foram selecionados os melhores ligantes (menor energia) para avaliar as interações entre os resíduos da enzima do parasito e do ligante.

Foi feita uma inspeção visual dos resultados da docagem no servidor online PoseViewWeb 1.97.0, levando-se em conta o número de ligações de hidrogênio e os resíduos com os quais eles interagiram (Figura 3). Neste trabalho, utilizou-se como critério de prioridade os resíduos que estão envolvidos no mecanismo catalítico da enzima de *L. mexicana* (Cys166 e His194).⁴³ Desta forma, os ligantes selecionados a partir do ranqueamento para a etapa posterior

de docagem na enzima GAPDH humana foram LIG6, LIG7 e LIG8.

Foi possível observar que os ligantes selecionados interagiram com a enzima através de ligações de hidrogênio com os resíduos Ser165, Cys166, Thr167, His194, Ser224, Thr226, Ser247 e Arg249. Cabe destacar que os resíduos Cys166 e His194 estão envolvidos na catálise da GAPDH, sendo que a Arg249 faz parte do sítio de ligação do fosfato do substrato, e a Ser224 faz parte de uma alça de reposicionamento do local de ligação do fosfato inorgânico.⁶⁷ Além disso, os resíduos Ser224 e Ser247 correspondem na enzima humana aos resíduos Leu195 e Asp198 e podem ser explorados na busca por compostos seletivos para a enzima GAPDH de *L. mexicana*. Já os resíduos Thr167, Ser224, Thr226, Ser247 e Arg249 são responsáveis pela estabilização do complexo enzima-inibidor.⁶⁸

Tabela 2. Estrutura dos compostos obtidos através dos servidores *PubChem*, *ZINC* e *SciFinder* (A) LIG1, (B) LIG2, (C) LIG3, (D) LIG4, (E) LIG5, (F) LIG6, (G) LIG7e (H) LIG8

Tabela 3. Valores de energia de afinidade obtidos no programa de docagem Vina

Ligantes	Energia de afinidade (Kcal/mol)
LIG8	-7,0
LIG7	-6,9
LIG6	-6,8
LIG5	-6,8
LIG3	-6,6
LIG2	-6,4
LIG1	-6,4
LIG4	-6,3

Figura 3. Interações previstas na docagem com a enzima GAPDH de *L. mexicana* dos ligantes (A) Composto matriz L18, (B) LIG6, (C) LIG7 e (D) LIG8, respectivamente, no programa Vina. As linhas pretas tracejadas são mostradas as ligações de hidrogênio e, em verde, as interações hidrofóbicas. Imagens obtidas através do servidor PoseView Web 1.97.0

O resíduo de aminoácido His194 atua como uma base e também está envolvido na catálise da GAPDH, sendo este resíduo responsável por ativar a Cys166, além de facilitar a formação do intermediário tetraédrico.⁶⁹

Pode-se destacar que o LIG6, que apresentou o maior número de interações com a enzima do parasito, difere do composto matriz L18 na formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Cys166.

Em vista a proporcionar seletividade, pois a enzima GAPDH também está presente em humanos, buscou-se por inibidores específicos para a isoforma do parasito. Desta maneira, os ligantes selecionados após a inspeção visual foram docados na enzima GAPDH humana (1U8F), com o programa Vina 1.1.2, para verificar as possíveis interações entre esta enzima e os ligantes. O LIG6 foi o que apresentou menos interações (duas ligações de hidrogênio com os resíduos Ser98 e

Gly15 e uma interação hidrofóbica com o Thr99) na enzima humana (Figura 4). Dessa forma, a partir desses resultados este ligante foi o escolhido para ser submetido à etapa da DM.

3.2. Alinhamento enzimático

A partir do alinhamento das sequências primárias das enzimas GAPDH de *L. mexicana* e GAPDH humana (Figura 5) foi possível analisar que alguns resíduos do sítio ativo que podem ser explorados na busca por ligantes seletivos pela enzima do parasito. Os resíduos são: Asp210, Gly213, Ser224 e Ser247, que na enzima humana são substituídos por Ala209, Ala232, Leu195 e Asp198, respectivamente. Uma substituição das duas serinas na enzima do parasito por duas alaninas elimina a capacidade da enzima de humanos em fazer ligações de hidrogênio nestas posições com possíveis ligantes.

Figura 4. Interações previstas na docagem com a enzima GAPDH humana com o LIG6 a partir da docagem no programa Vina. As linhas pretas tracejadas são mostradas as ligações de hidrogênio e, em verde, as interações hidrofóbicas. Imagens obtidas através do servidor PoseView Web 1.97.0

1132:A PDBID CHAIN S	1	10	20	30	40	50
1U8F:P PDBID CHAIN S	1	10	20	30	40	50
consensus>50						
1132:A PDBID CHAIN S	60	70	80	90	100	110
1U8F:P PDBID CHAIN S	60	70	80	90	100	110
consensus>50						
1132:A PDBID CHAIN S	120	130	140	150	160	170
1U8F:P PDBID CHAIN S	120	130	140	150	160	170
consensus>50						
1132:A PDBID CHAIN S	180	190	200	210	220	230
1U8F:P PDBID CHAIN S	180	190	200	210	220	230
consensus>50						
1132:A PDBID CHAIN S	240	250	260	270	280	290
1U8F:P PDBID CHAIN S	240	250	260	270	280	290
consensus>50						
1132:A PDBID CHAIN S	300	310	320	330	340	350
1U8F:P PDBID CHAIN S	300	310	320	330	340	350
consensus>50						
1132:A PDBID CHAIN S	360					
1U8F:P PDBID CHAIN S	360					
consensus>50						

Figura 5. Alinhamento enzimático das sequências primárias de aminoácidos da GAPDH de *L.mexicana* com a enzima GAPDH humana gerado através do servidor ESPrpt 3.0. Os resíduos de aminoácidos não-correspondentes entre as enzimas estão em vermelho com fundo branco. As interações do LIG6 com os resíduos na enzima humana correspondem aos marcados com ponto azul. Os resíduos do sítio ativo das duas enzimas correspondem aos marcados em ciano e alguns resíduos importantes envolvidos na docagem são marcados em asterisco verde

Os resultados da docagem nas duas enzimas mostraram que os ligantes selecionados interagiram tanto com a enzima GAPDH de *L. mexicana* quanto com a humana (Figuras 3 e 4). Embora as duas enzimas apresentem apenas cerca de 50 % de identidade,^{25,70} o local do sítio ativo é bem conservado nas duas espécies, o que dificulta o planejamento de inibidores seletivos.⁷¹ Entretanto, o direcionamento no planejamento de fármacos para a enzima GAPDH dos tripanossomatídeos conta com a dependência quase exclusiva na função dessa enzima na produção de ATP, sendo considerada como potencial alvo para novos agentes quimioterápicos.⁷²

3.3. Resultados da dinâmica molecular e energia livre

Por meio da análise dos gráficos de RMSD e fator-B, foi possível verificar a estabilidade e o equilíbrio do complexo-LIG6, bem como a flexibilidade da enzima.⁷³ A estabilidade estrutural do sistema foi analisada através dos valores do RMSD em função do tempo de simulação (Figura 6). Para o sistema avaliado no programa AMBER, observou-se que os valores de RMSD são menores que 2,5 Å, demonstrando poucas mudanças conformacionais na estrutura do complexo. Pela Figura 7, é possível ver o gráfico do fator-B.

Figura 6. Representação gráfica do RMSD em função do tempo de simulação da trajetória do complexo formado pelo ligante LIG6 ($1,99 \pm 0,29$ Å) e a enzima GAPDH do parasito

Figura 7. Gráfico do fator-B da enzima GAPDH

Os resultados da análise do fator-B mostram as flutuações estruturais dos resíduos da enzima ao longo da dinâmica molecular. O alto valor do fator-B encontrado para os resíduos de aminoácidos Pro70 e Ser71 se devem ao fato de que pertencem a uma região de alça, compreendida entre os resíduos 66-76, que faz parte do domínio N-terminal e é encontrada apenas na GAPDH da família *Trypanosomatidae* (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana*).⁴³

Já os resíduos Leu208 e Lys209 pertencem à alça próxima ao sítio ativo da enzima,²⁵ e isso explica seu alto valor com relação ao fator-B. Dentre os resíduos destacados, a Ser358 apresentou um comportamento de grande flexibilidade ao longo da DM, resultando no enorme valor obtido pelo fator-B. Isso pode ser explicado por este resíduo se localizar na parte terminal da cadeia, apresentando uma grande mobilidade. As alterações estruturais mais importantes na enzima GAPDH envolvem os segmentos da cadeia que abrangem os resíduos 195-222 (destacados na Figura 8, em laranja), correspondentes a regiões da alça e destacam a importância no processo de reconhecimento molecular e na inibição da enzima. Essa modificação na estrutura tridimensional na enzima GAPDH de *L. mexicana* está de acordo com o trabalho de Suresh e colaboradores, no qual os movimentos enzimáticos ampliam uma cavidade no local de ligação para acomodar o inibidor.²⁵

Por meio dos resultados da DM foi possível prever os valores de energia livre de interação

entre os ligantes e a enzima através de métodos como o MM-GBSA, que tem sido utilizado com sucesso na reprodução de resultados experimentais.⁶⁵ A energia livre total calculada pelo método MM-GBSA, utilizando os últimos 2ns de dinâmica molecular, para o complexo enzima-LIG6 foi de $-12,45 \pm 5,38$ kcal.mol⁻¹, demonstrando que a formação do complexo é favorável. Este resultado foi comparado com a energia obtida no estudo por Alves,²⁴ no qual o ligante (L18) apresentou um valor de $-11,39 \pm 4,53$ kcal.mol⁻¹, mostrando a maior estabilidade do complexo.

A análise do gráfico de energia de interação por resíduo (Figura 9) revela que os resíduos que contribuem mais significativamente para a energia total de interação e, portanto, para a estabilização do complexo são a Pro136, Ser165, Cys166, Thr167, His194, Thr226, Gly227 e Arg249. Nesse aspecto, foi observado que o LIG6 diferiu do L18 na DM pela formação da ligação com o resíduo Arg249.²⁴

Com exceção do resíduo de aminoácido Pro136, todos os outros resíduos citados estão envolvidos em importantes interações obtidas na docagem molecular. No gráfico de energia de interação por resíduo os valores positivos correspondem às interações desfavoráveis, enquanto que os valores negativos correspondem às interações favoráveis, ou seja, aquelas que contribuem para a estabilização do ligante no complexo.^{74, 75}

Figura 8. Instantes da dinâmica molecular: (a) 2ns e (b) 10ns. É mostrada em laranja, a alça do sítio ativo da enzima GAPDH de *L. mexicana* que compreende os resíduos 195-222 e em vermelho, o ligante complexado

Figura 9. Representação gráfica da energia de interação por resíduo para o complexo formado pelo ligante LIG6. Nesta, destacou-se apenas a parte que mostrou alguma interação

Os resíduos Ser165, Thr167, Thr226, Gly227 e Ser247 estão relacionados ao subsítio de ligação do fosfato inorgânico e as interações com eles são consideradas importantes para o processo de reconhecimento molecular.^{67, 68, 76} Além disso, interação com a Cys166 apresenta uma importante função na orientação favorável para se completar o ciclo da reação.⁷⁷

Assim, por meio da estabilidade dos valores de RMSD, das interações encontradas, tanto na docagem quanto na DM, e do valor de energia livre de ligação favorável para o composto LIG6, obtido a partir do composto matriz, pode-se sugerir que essa molécula é uma candidata promissora para o planejamento de novos compostos no combate a leishmaniose.

4. Conclusão

A busca por novos compostos bioativos, por meio de um composto matriz, no qual ocorreu um aumento da complementariedade mostrou-se uma estratégia eficaz para o processo de planejamento de inibidores, possibilitando a identificação de um possível composto capaz de atuar na enzima GAPDH de *L. mexicana*.

Por meio dos resultados da docagem molecular foi selecionado um ligante através do valor de energia de afinidade e por apresentar importantes interações entre os resíduos de aminoácidos (Ser165, Cys166, Thr167, His194, Ser224, Thr226,

Ser247 e Arg249) da enzima GAPDH e o ligante. Estes resíduos estão envolvidos no mecanismo catalítico da enzima e na estabilização do complexo formado. Cabe destacar que os resíduos Ser224 e Ser247 podem ser explorados na busca por compostos seletivos para a enzima GAPDH de *L. mexicana*.

Na etapa de DM observou-se a estabilidade obtida pelo complexo por meio dos valores de RMSD, do gráfico de fator-B e avaliada as interações dos resíduos de aminoácidos. A energia livre total de interação do complexo (enzima-LIG6) obtida apresentou um valor favorável.

Por meio do gráfico de energia por interação de resíduo, identificou-se que os mesmos resíduos importantes envolvidos na docagem (Ser165, Cys166, Thr167, His194, Ser224, Thr226, Ser247 e Arg249) contribuíram para a estabilização do complexo.

Desta maneira, os resultados obtidos poderão servir como ponto de partida para a obtenção de moléculas mais promissoras, orientando o planejamento de novos candidatos a inibidores para a região do sítio ativo da enzima GAPDH de *L. mexicana*.

Referências

- Leon, B.; Lopez-Bravo, M.; Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* **2007**, 26, 519. [CrossRef] [PubMed]

- ² Bussotti, G.; Gouzelou, E.; Boite, M. C.; Kherachi, I.; Harrat, Z.; Eddaikra, N.; Mottram, J. C.; Antoniou, M.; Christodoulou, V.; Bali, A.; Guerfali, F. Z.; Laouini, D.; Mukhtar, M.; Dumetz, F.; Dujardin, J. C.; Smirlis, D.; Lechat, P.; Pescher, P.; El Hamouchi, A.; Lemrani, M.; Chicharro, C.; Llanes-Acevedo, I. P.; Botana, L.; Cruz, I.; Moreno, J.; Jeddi, F.; Aoun, K.; Bouratbine, A.; Cupolillo, E.; Spath, G. F. Leishmania Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification. *Mbio* **2018**, *9*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Kalantari, M.; Motazedian, M. H.; Asgari, Q.; Mohammadpour, I.; Soltani, A.; Azizi, K. Co-detection and isolation of Leishmania and Crithidia among naturally infected Tatera indica (Rodentia: Muridae) in Fars province, southern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2018**, *8*, 279. [[CrossRef](#)]
- ⁴ Srisuton, P.; Phumee, A.; Sunantaraporn, S.; Boonserm, R.; Sor-suwan, S.; Brownell, N.; Pengsakul, T.; Siriya-satien, P. Detection of Leishmania and Trypanosoma DNA in Field-Caught Sand Flies from Endemic and Non-Endemic Areas of Leishmaniasis in Southern Thailand. *Insects* **2019**, *10*, 238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Barrett, M. P.; Croft, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin* **2012**, *104*, 175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Fernandez-Prada, C.; Sharma, M.; Plourde, M.; Bresson, E.; Roy, G.; Leprohon, P.; Ouellette, M. High-throughput Cos-Seq screen with intracellular Leishmania infantum for the discovery of novel drug-resistance mechanisms. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance* **2018**, *8*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Chami, G. F.; Bundy, D. A. P. More medicines alone cannot ensure the treatment of neglected tropical diseases. *Lancet Infectious Diseases* **2019**, *19*, E330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Scariot, D. B.; Volpato, H.; Fernandes, N. D.; Soares, E. F. P.; Ueda-Nakamura, T.; Dias, B. P.; Din, Z. U.; Rodrigues, E.; Rubira, A. F.; Borges, O.; Sousa, M. D.; Nakamura, C. V. Activity and Cell-Death Pathway in Leishmania infantum Induced by Sugiol: Vectorization Using Yeast Cell Wall Particles Obtained From Saccharomyces cerevisiae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2019**, *9*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Akinsolu, F. T.; Nemieboka, P. O.; Njuguna, D. W.; Ahadji, M. N.; Dezso, D.; Varga, O. Emerging Resistance of Neglected Tropical Diseases: A Scoping Review of the Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2019**, *16*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Figueira, C. P.; Carvalhal, D. G. F.; Almeida, R. A.; Hermida, M. d. E.-R.; Touchard, D.; Robert, P.; Pierres, A.; Bongrand, P.; dos-Santos, W. L. C. Leishmania infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Afrin, F.; Khan, I.; Hemeg, H. A. Leishmania-Host Interactions-An Epigenetic Paradigm. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Yorek, M. S.; Poudel, B.; Mazgaen, L.; Pope, R. M.; Wilson, M. E.; Gurung, P. Leishmania major degrades murine CXCL1-An immune evasion strategy. *Plos Neglected Tropical Diseases* **2019**, *13*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Figueiredo, K. A.; Figueiredo, J. F. S.; Costa, R. K. M.; Alves, M. M. M.; Magalhaes, J. L.; Carvalho, A. L. M.; Lima, F. C. A. Prospecting Biochemical Targets for in silico Study for Antileishmania Chemotherapy. *Revista Virtual De Quimica* **2018**, *10*, 1485. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Ribeiro, J. B. P.; Miranda-Vilela, A. L.; Amorim, A. A. S.; Garcia, R. D.; Moreira, J. R.; Gomes, C. M.; Takano, G. H. S.; de Oliveira, G. M. F.; Lima, A. V.; da Silva, I. C. R.; Sampaio, R. N. R. Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (Sb-V) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (L.) amazonensis in C57BL6 mice. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2019**, *26*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Afrin, F.; Chouhan, G.; Islamuddin, M.; Want, M. Y.; Ozbak, H. A.; Hemeg, H. A. Cinnamomum cassia exhibits antileishmanial activity against Leishmania donovani infection in vitro and in vivo. *Plos Neglected Tropical Diseases* **2019**, *13*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Kariyawasam, R.; Challa, P.; Lau, R.; Boggild, A. K. Susceptibility testing of Leishmania spp. against amphotericin B and fluconazole using the Sensititre (TM) YeastOne (TM) YO9 platform. *Bmc Infectious Diseases* **2019**, *19*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ¹⁷ Rolon, M.; Lima, A. P. D.; Coronel, C.; Vega, M. C.; Pandolfi, E.; de Arias, A. R. The efficacy of new 2,5-dihydroxybenzyl derivatives against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Journal of Infection in Developing Countries* **2019**, *13*, 565-+. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Dorsey, B. M.; Cass, C. L.; Cedeno, D. L.; Vallejo, R.; Jones, M. A. Effects of Specific Electric Field Stimulation on the Release and Activity of Secreted Acid Phosphatases from *Leishmania tarentolae* and Implications for Therapy. *Pathogens* **2018**, *7*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Negrao, F.; Giorgio, S.; Eberlin, M. N.; Yates, III Comparative Proteomic Analysis of Murine Cutaneous Lesions Induced by *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. *Acs Infectious Diseases* **2019**, *5*, 1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Hurrell, B. P.; Schuster, S.; Grun, E.; Coutaz, M.; Williams, R. A.; Held, W.; Malissen, B.; Malissen, M.; Yousefi, S.; Simon, H. U.; Muller, A. J.; Tacchini-Cottier, F. Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *Plos Pathogens* **2015**, *11*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Oppendoes, F. R.; Butenko, A.; Flegontov, P.; Yurchenko, V.; Lukes, J. Comparative Metabolism of Free-living Bodo saltans and Parasitic Trypanosomatids. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2016**, *63*, 657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Kalel, V. C.; Maser, P.; Sattler, M.; Erdmann, R.; Popowicz, G. M. Come, sweet death: targeting glycosomal protein import for antitrypanosomal drug development. *Current Opinion in Microbiology* **2018**, *46*, 116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Gomez, S.; Querol-Garcia, J.; Sanchez-Barron, G.; Subias, M.; Gonzalez-Alsina, A.; Franco-Hidalgo, V.; Alberti, S.; de Cordoba, S. R.; Fernandez, F. J.; Vega, M. C. The Antimicrobials Anacardic Acid and Curcumin Are Not-Competitive Inhibitors of Gram-Positive Bacteria Pathogenic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by a Mechanism Unrelated to Human C5a Anaphylatoxin Binding. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Alves, K. M. A. C.; F.J.B.; Honorio, K. M.; Molfetta, F. A. Design of Inhibitors for Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Enzyme of *Leishmania mexicana* *Medicinal Chemistry* **2019**, *15*, 1. [[Link](#)]
- ²⁵ Suresh, S.; Bressi, J. C.; Kennedy, K. J.; Verlinde, C.; Gelb, M. H.; Hol, W. G. J. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *309*, 423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Alvarez, L. H.; Gomes, D. E. B.; Gonzalez, J. E. H.; Pascutti, P. G. Dissecting a novel allosteric mechanism of cruzain: A computer-aided approach. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**, *45*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Wagner, A. B. SciFinder Scholar 2006: An empirical analysis of research topic query processing. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2006**, *46*, 767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Chuprina, A.; Lukin, O.; Demoiseaux, R.; Buzko, A.; Shivanyuk, A. Drug- and Lead-likeness, Target Class, and Molecular Diversity Analysis of 7.9 Million Commercially Available Organic Compounds Provided by 29 Suppliers. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2010**, *50*, 470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Rishton, G. M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ McKim, J. M. Building a Tiered Approach to In Vitro Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with In Vivo Relevance. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2010**, *13*, 188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Korner, R.; Pandey, A. K.; Rupp, M.; Teetz, W.; Brandmaier, S.; Abdelaziz, A.; Prokopenko, V. V.; Tanchuk, V. Y.; Todeschini, R.; Varnek, A.; Marcou, G.; Ertl, P.; Potemkin, V.; Grishina, M.; Gasteiger, J.; Schwab, C.; Baskin, II; Palyulin, V. A.; Radchenko, E. V.; Welsh, W. J.; Kholodovych, V.; Chekmarev, D.; Cherkasov, A.; Aires-de-Sousa, J.; Zhang, Q. Y.; Bender, A.; Nigsch, F.; Patiny, L.; Williams, A.; Tkachenko, V.; Tetko, I. V. Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2011**, *25*, 533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³⁵ da Costa, A. A. F.; Alves, C. N.; Cardoso, F. J. B.; Molfetta, F. A. Molecular Modeling Study of Acrylamides Derivatives as Inhibitors of the NS3/NS2B Serine Proteases of the Dengue Virus. *Revista Virtual De Quimica* **2017**, *9*, 2272. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Borges, A.; Casoti, R.; Silva, M.; da Cunha, N. L.; Pissurno, A. P. D.; Kawano, D. F.; de Laurentiz, R. D. COX Inhibition Profiles and Molecular Docking Studies of the Lignan Hinokinin and Some Synthetic Derivatives. *Molecular Informatics* **2018**, *37*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Dhevaraj, J.; Gopalakrishnan, M.; Pazhamalai, S. Synthesis, characterization, molecular docking, ADME and biological evaluation of 3-(4-(tetrazol-1-yl)phenyl)-5-phenyl-1H-pyrazoles. *Journal of Molecular Structure* **2019**, *1193*, 450. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Lang, P. T.; Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Pettersen, E. F.; Meng, E. C.; Thomas, V.; Rizzo, R. C.; Case, D. A.; James, T. L.; Kuntz, I. D. DOCK 6: Combining techniques to model RNA-small molecule complexes. *Rna-a Publication of the Rna Society* **2009**, *15*, 1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Trott, O.; Olson, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 2010, 455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30*, 2785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S.; Weiner, P. A new force-field for molecular mechanical simulation of nucleic-acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 765. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Souza, D. H. F.; Garratt, R. C.; Araujo, A. P. U.; Guimaraes, B. G.; Jesus, W. D. P.; Michels, P. A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *Febs Letters* **1998**, *424*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry* **2002**, *23*, 1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Connolly, M. L. The molecular-surface package. *Journal of Molecular Graphics* **1993**, *11*, 139. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **1982**, *161*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 505. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Stierand, K.; Rarey, M. PoseView: Visualization of protein-ligand interactions in 2D. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2014**, *247*, 1. [[Link](#)]
- ⁴⁹ Park, J. B.; Park, H.; Son, J.; Ha, S. J.; Cho, H. S. Structural Study of Monomethyl Fumarate-Bound Human GAPDH. *Molecules and Cells* **2019**, *42*, 597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Ganesan, A.; Coote, M. L.; Barakat, K. Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Frisch, G. W. T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople Gaussian 03, Revision A.1. In *Gaussian*: Pittsburgh PA, 2003. [[Link](#)]

- ⁵³ Roothaan, C. C. J. Self-consistent field theory for open shells of electronic systems. *Reviews of Modern Physics* **1960**, 32, 179. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁴ Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2006**, 65, 712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Wang, J. M.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, 25, 1157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Wang, J. M.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2006**, 25, 247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics* **1983**, 79, 926. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁸ Loncharich, R. J.; Brooks, B. R.; Pastor, R. W. Langevin dynamics of peptides - the frictional dependence of isomerization rates of n-acetylalanyl-n'-methylamide. *Biopolymers* **1992**, 32, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh ewald - an n.log(n) method for ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, 10089. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁰ Case, D. A.; Cheatham III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B. Amber 12. University of California, San Francisco, San Francisco, CA, 2012. [[Link](#)]
- ⁶¹ Ryckaert, J. P.; Cicciotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **1977**, 23, 327. [[CrossRef](#)]
- ⁶² Verlet, L. Computer experiments on classical fluids .2. Equilibrium correlation functions. *Physical Review* **1968**, 165, 201-+. [[CrossRef](#)]
- ⁶³ Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S. H.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E. Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of Chemical Research* **2000**, 33, 889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Chen, F.; Sun, H. Y.; Wang, J. M.; Zhu, F.; Liu, H.; Wang, Z.; Lei, T. L.; Li, Y. Y.; Hou, T. J. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 8. Predicting binding free energies and poses of protein-RNA complexes. *Rna* **2018**, 24, 1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Hou, T. J.; Wang, J. M.; Li, Y. Y.; Wang, W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, 51, 69. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁶ Sun, H. Y.; Duan, L. L.; Chen, F.; Liu, H.; Wang, Z.; Pan, P. C.; Zhu, F.; Zhang, J. Z. H.; Hou, T. J. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy calculation approaches. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, 20, 14450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Kim, H. D.; Feil, I. K.; Verlinde, C.; Petra, P. H.; Hol, W. G. J. Crystal-structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from leishmania-mexicana - implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic-phosphate binding-site. *Biochemistry* **1995**, 34, 14975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Reis, M.; Alves, C. N.; Lameira, J.; Tunon, I.; Marti, S.; Moliner, V. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi elucidated via the QM/MM approach. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15, 3772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Talfournier, F.; Colloc'h, N.; Mornon, J. P.; Branlant, G. Comparative study of the catalytic domain of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from bacteria and archaea via essential cysteine probes and site-directed mutagenesis. *European Journal of Biochemistry* **1998**, 252, 447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Jenkins, J. L.; Tanner, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2006**, 62, 290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Fothergill-Gilmore, L. A.; Michels, P. A. M. Evolution of glycolysis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **1993**, 59, 105. [[CrossRef](#)]
- ⁷² Querol-Garcia, J.; Fernandez, F. J.; Marin, A. V.; Gomez, S.; Fulla, D.; Melchor-Tafur, C.; Franco-Hidalgo, V.; Albert, S.; Juanhuix, J.; de Cordoba, S. R.; Regueiro, J. R.; Vega, M. C. Crystal Structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from the Gram-Positive Bacterial Pathogen A.

vaginae, an Immuno-evasive Factor that Interacts with the Human C5a Anaphylatoxin. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷³ Kuzmanic, A.; Zagrovic, B. Determination of Ensemble-Average Pairwise Root Mean-Square Deviation from Experimental B-Factors. *Biophysical Journal* **2010**, *98*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁴ Silva, N. D.; Lameira, J.; Alves, C. N. A quantum mechanical/molecular mechanical study of the aspartic protease plasmepsin IV complexed with allophenylnorstatine-based inhibitor. *Chemical Physics Letters* **2011**, *509*, 861. [[CrossRef](#)]

⁷⁵ Lima, A. H.; Lameira, J.; Alves, C. N. Protein-ligand interaction of *T. cruzi* trans-sialidase inhibitors: a docking and QM/MM MD study. *Structural Chemistry* **2012**, *23*, 147. [[CrossRef](#)]

⁷⁶ Ladame, S.; Castilho, M. S.; Silva, C.; Denier, C.; Hannaert, V.; Perie, J.; Oliva, G.; Willson, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-D-glyceric acid - Selective inhibition by structure-based design. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 4574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁷ Castilho, M. S.; Pavao, F.; Oliva, G.; Ladame, S.; Willson, M.; Perie, J. Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the thioacyl intermediate for the *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed reaction, from its crystal structure. *Biochemistry* **2003**, *42*, 7143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]