

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS BASEADOS EM FARMACÓFOROS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEÍNA PBP2a EM CEPAS DE MRSA

Luciane B. Silva^{1,2*}, Madson J. da Costa³, Lana P. S. Oliveira², Luciana S. Lima², Cleydson B. R. dos Santos^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade-Rede BIONORTE, UNIFAP, 68903-419, Macapá – Amapá, Brasil.

²Laboratório de Modelagem e Química Computacional, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, Macapá – Amapá, Brasil.

³Laboratório de Biotecnologia da Amazônia – LABTAM, Núcleo de Engenharia e Materiais Sustentáveis - NEMaS, Universidade do Estado do Amapá, 68900-070, Amapá, Brasil.

*luciaanebarros@hotmail.com

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*, ADME/Tox, Docking Molecular.

Introdução

A resistência antimicrobiana, especialmente em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), constitui um grande desafio para a saúde pública global, devido à dificuldade no tratamento das infecções causadas por essas cepas (ARANTES; CALDAS; ROSA; LELES *et al.*, 2023). A busca urgente por novas classes de antibióticos tem incentivado pesquisas e o desenvolvimento de estratégias inovadoras para a descoberta de compostos terapêuticos (OLIVEIRA; LIMA; SILVA; CRUZ *et al.*, 2023).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana é um sério problema de saúde pública, afetando especialmente pacientes hospitalizados, embora já seja observada também na comunidade (LIMA; BORGES; PARENTE; JÚNIOR *et al.*, 2015). Dessa forma, há necessidade de investigação em busca de novos compostos com potencial ação antimicrobiana e com baixa toxicidade celular, no intuito de combater cepas multirresistentes ((BOULEY; KUMARASIRI; PENG; OTERO; SONG; SUCKOW; SCHROEDER; WOLTER; LASTOCHKIN; ANTUNES, 2015). Portanto, a abordagem através de métodos de triagem *in silico*, selecionando previamente estruturas de bancos virtuais, auxilia na identificação de novos compostos promissores, além de economizar custos e mão de obra na testagem laboratorial (RAMOS; BORGES; DE SOUZA; ARAUJO *et al.*, 2022).

No processo de descoberta de medicamentos, a atividade farmacológica é avaliada por meio de medições independentes, visando prever os efeitos em diferentes sistemas celulares. A triagem de alto rendimento (HTS) é empregada para identificar potenciais candidatos, enquanto a fase de otimização de leads busca refinar os hits identificados pelo HTS, aumentando sua atividade. Dada a possibilidade de modificar a estrutura molecular dos fármacos, ensaios que forneçam dados terapêuticos relevantes são essenciais para maximizar sua eficácia (DOS SANTOS; BORGES; SILVA; DE LIMA *et al.*, 2022).

Pesquisas em busca da identificação de novas entidades químicas de origem natural, semi-sintética ou sintética a partir de estruturas químicas da biodiversidade para fins de bioprospecção de novos produtos com potencial antimicrobiano e baixa toxicidade se faz necessário contra bactérias multirresistentes (LIMA *et al.*, 2015; BOULEY *et al.*, 2015; DA SILVA, 2016). Este estudo utiliza Triagem Virtual Baseada em Farmacóforo Alvo e Ligante (TBVS) para identificar possíveis inibidores da proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a) de

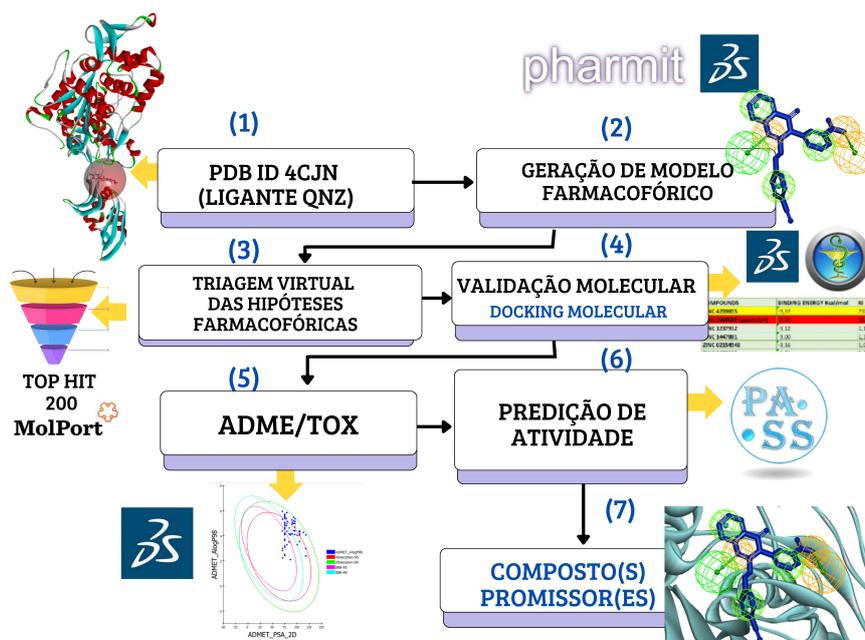
MRSA, com o objetivo de encontrar novos candidatos a antibióticos eficazes contra essas bactérias resistentes.

Material e Métodos

A estrutura cristalina da PBP2a de MRSA (PDB ID 4CJN) em complexo com o ligante quinazolinona (QNZ) foi utilizada como referência (template) para gerar modelos de hipóteses farmacofóricas. Esses modelos foram obtidos por meio das ferramentas PHARMIT na Hipótese 1 (HYP1) e Discovery Studio (DS) na Hipótese 2 (HYP 2) para investigar os compostos disponíveis na base de dados comercial da MolPort®, utilizado pela sua diversidade de estruturas, cerca de 8 milhões de compostos (OLIVEIRA; LIMA; SILVA; CRUZ *et al.*, 2023).

Os 200 compostos Top Hit foram priorizados com o uso de filtros no Pharmit para cada Hipótese. Para validar os compostos selecionados, foi utilizada a ferramenta LibDock do DS e Energia livre de ligação (ΔG) utilizando o software AutoDock 4.2® (versão 4.2.6, San Diego, Califórnia, CA, EUA) via PyRx(0.8.30), realizando a simulação de *docking molecular*, uma etapa fundamental para avaliar as interações entre ligante e proteína e identificar os compostos com maior afinidade pela PBP2a, refinando a seleção dos melhores candidatos a inibidores. Os dados das estruturas cristalinas de raios-X da Estrutura cristalina de PBP2a de MRSA em complexo com ligante quinazolinona, será obtido do Protein Data Bank (PDB ID: 4CJN). Além disso, os compostos foram filtrados com base em suas propriedades ADME/Tox, predição de atividade biológica e inspeção visual, ver Figura 1.

Figura 1. Fluxograma das etapas metodológicas



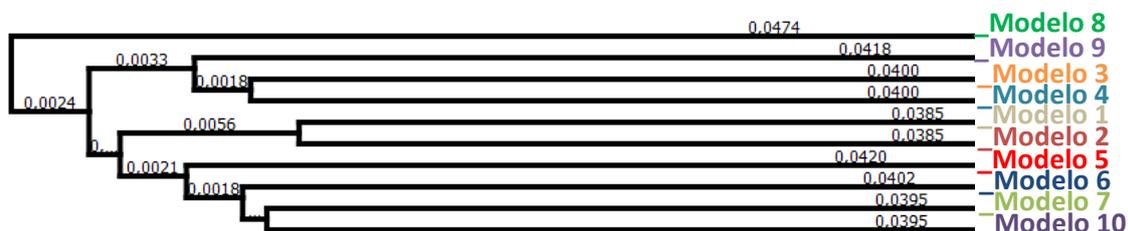
Fonte: Autoria Própria

Resultados e Discussão

Foram identificadas 200 estruturas promissoras para cada hipótese resultante da triagem virtual. A partir das predições ADME/Tox, 2 moléculas foram selecionadas na Hipótese 1 (PHARMIT), enquanto a Hipótese 2 (DS) resultou em 10 moléculas, com intervalo de RMSD entre 0.480476 e 1.288 Å.

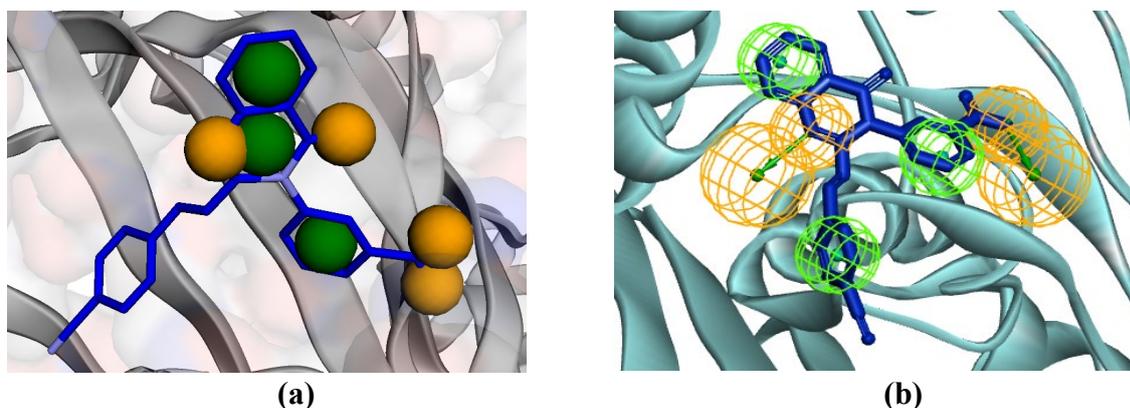
Para validação do modelo farmacofórico obtido pelo DS, foi utilizado o protocolo de “geração de farmacóforo de interação” para cada proteína alvo, QNZ (PDB ID: 4CJN), co-cristalizada com QNZ, foi validado internamente por meio da geração de 10 modelos de farmacóforo (ver Figura 2).

Figura 2. Validação da Hipótese Farmacofórica 2 (HYP2) obtida do Discovery Studio (BIOVIA, 2017)



Fonte: Autoria Própria

Figura 3. Representação dos modelos de farmacóforo. (a) Modelo obtido do Pharmit PB_MODEL1(HHHAA) com sete características farmacofóricas; (b) Modelo obtido do DS SB_MODEL1 (HHHAA) com sete características farmacofóricas. A cor verde apresenta a característica Hidrofóbica (HYD) e em laranja apresenta aceitadores de ligações de hidrogênio (HBA).



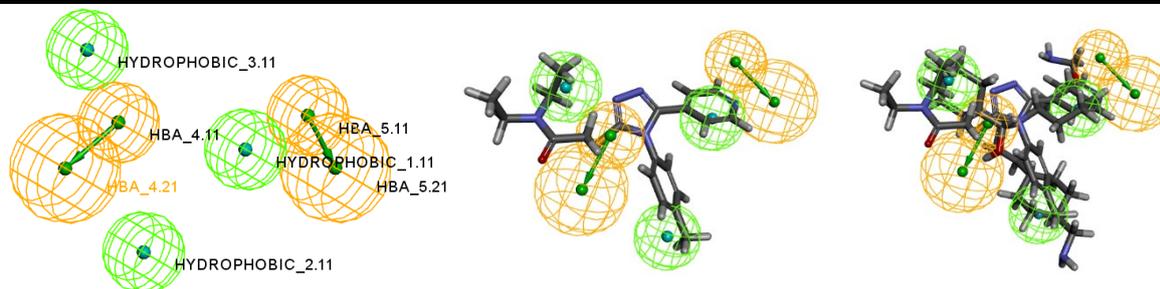
Fonte: Autoria Própria

Tabela 1- Características Farmacofóricas para HYP 1 (Hipótese 1) obtidas no PHARMIT.

| | X | Y | Z | RADIUS |
|---------------|--------|--------|---------|--------|
| HYDROPHOBIC_1 | 9.548 | 0.817 | -70.749 | |
| HYDROPHOBIC_2 | 9.348 | -0.748 | -66.781 | |
| HYDROPHOBIC_3 | 10.036 | 2.663 | -72.219 | |
| HBA_1 | 8.891 | 0.163 | -71.816 | 1.0 |
| HBA_2 | 9.288 | 2.326 | -64.774 | |
| HBA_3 | 9.282 | 0.564 | -63.401 | |
| HBA_4 | 10.921 | 1.931 | -68.745 | |

As características Farmacofóricas da Hipótese 1 (HYP 1) e Hipótese 2 (HYP 2) mostram uma disposição estratégica de características hidrofóbicos e aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), essenciais para o reconhecimento molecular e interação com o alvo biológico (OLIVEIRA; LIMA; SILVA; CRUZ *et al.*, 2023), ver Tabela 1 e 2.

Tabela 2- Características Farmacofóricas para HYP 2 (Hipótese 2) obtidas no DS.

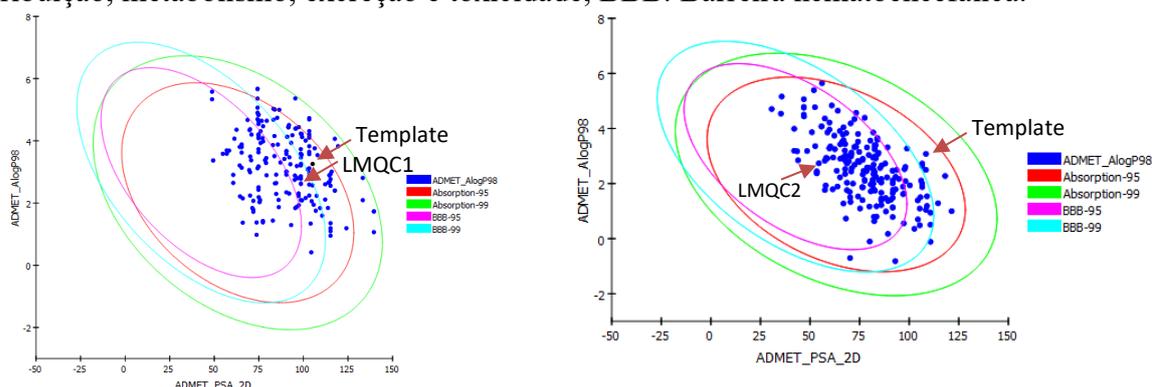


| | X | Y | Z | RADIUS |
|------------------|--------|--------|--------|--------|
| HYDROPHOBIC_1.11 | 2.660 | 1.380 | 1.600 | |
| HYDROPHOBIC_2.11 | -3.760 | -1.280 | -0.420 | 1.70 |
| HYDROPHOBIC_3.11 | 3.460 | -5.540 | -4.020 | |
| HBA_4.11 | -0.576 | 1.949 | -0.569 | |
| HBA_4.21 | -0.180 | 2.340 | -3.520 | 2.30 |
| HBA_5.11 | 4.307 | 3.214 | -1.464 | 1.70 |
| HBA_5.21 | 4.780 | 5.740 | 0.140 | 2.30 |

Fonte: Autoria Própria

Os resultados farmacocinéticos mostram que os dois compostos LMQC1 e LMQC2, mostrados na Tabela 1, têm boa solubilidade em água, bom nível de absorção intestinal, baixa penetração da barreira hematoencefálica, não são hepatotóxicos (ver Figura 4) e não inibem a enzima CYP450 2D6, um bom resultado, pois a inibição desta enzima pode levar a consequências como aumento da toxicidade do fármaco afetado pela interação, ou redução da eficácia do medicamento (HASAN; KHAN; SHARMIN; MAZUMDER *et al.*, 2016).

Figura 4. Gráfico de DMET PSA vs. ALogP98 para os compostos identificados, demonstrando as elipses de limites de confiança de 95% e 99% correspondentes aos modelos BBB e HIA. De acordo com o modelo, o composto deve atender às seguintes especificações para alcançar uma permeabilidade celular ideal: $PSA_{2D} < 140 \text{ \AA}^2$ e $AlogP98 < 5$. ADMET: Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, BBB: Barreira hematoencefálica.



Fonte: Autoria Própria

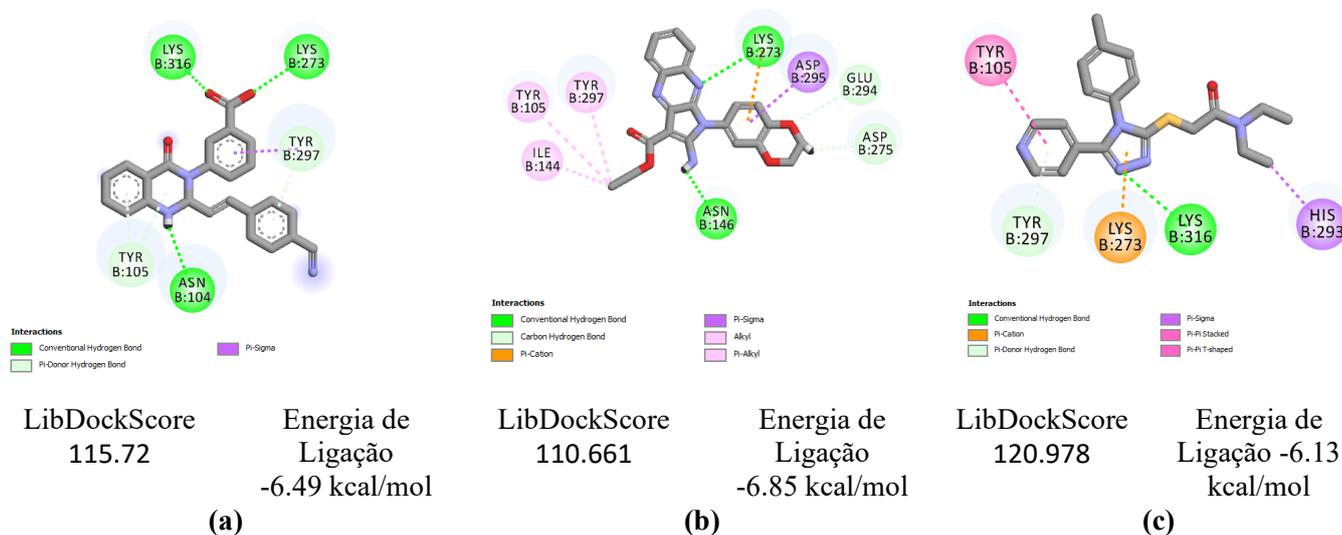
De acordo com a posição de QNZ no software Discovery Studio e AutoDock 4.2® (versão 4.2.6, San Diego, Califórnia, CA, EUA) via pyrx (SILVA; FERREIRA; MARYAM; ESPEJO-ROMÁN *et al.*, 2023), cinco resíduos selecionados como o bolso ativo são mostrados na Figura 5, que os resíduos de aminoácidos (LYS, TYR, ASN) por meio de ligações de hidrogênio convencionais (verde), ligações de hidrogênio doadoras (azul), e interações pi-sigma (roxo). Essas interações indicam que o composto está ancorado no sítio ativo, envolvendo os resíduos LYS B:316, LYS B:273, TYR B:297, TYR B:105 e ASN B:104.

A quinazolinona (QNZ) e duas moléculas (LMQC 1- Molport-002-555-372 e LMQC2- Molport-000-789-749) com LibDockScores superiores a 110.00 e energia de ligação acima de -6.00 kcal/mol, foram escolhidas, conforme ilustrado na Figura 5. Todas as moléculas deste estudo foram selecionadas com base nos valores de LibDockScore, energia livre e inspeção visual da estrutura química, bem como as interações com os resíduos de aminoácidos usando a molécula QNZ como template (ver Figura 5a).

A molécula LMQC1 possui LibDockScore de 120.978 e Energia de Ligação de -6.85 kcal/mol, possui os resíduos de aminoácidos, envolvendo ligações de hidrogênio convencionais (verde) com ASN B:146 e LYS B:273, e interações pi-sigma (roxo) com ASP B:275. Possui também interações pi-álquil com TYR B:105 e TYR B:297, além de uma interação pi-cátion com LYS B:273 (ver Figura 5b).

A molécula LMQC2 possui LibDockScore de 120.978 e Energia de Ligação de -6.13 kcal/mol, possui os resíduos de aminoácidos, envolvendo ligações de hidrogênio convencionais (amarelas) com LYS B:273 e 316, e interações pi-sigma (roxo) com HIS B:293 e pi-cátion com TYR B:105. Essas interações sugerem uma boa afinidade do composto no sítio ativo, o que pode contribuir para sua estabilidade e potencial atividade antibacteriana, (ver Figura 5c).

Figura 5. Representação de interações em 2D do estudo de *docking molecular* para (a) Quinazolinona - QNZ, (b) LMQC1_HYP1 e (c) LMQC2_HYP2 na estrutura cristalina de 4CJN de MRSA.



Fonte: Autoria Própria

Para a previsão de atividades biológicas, foi utilizado o software PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) (POROIKOV; FILIMONOV; IHLENFELDT; GLORIOZOVA et al., 2003) para prever possíveis atividades biológicas (ver Tabela 4). O PASS fornece duas probabilidades: Pa (probabilidade de ser ativo) e Pi (probabilidade de ser inativo). A Pa indica a probabilidade de o composto exibir a atividade biológica prevista, enquanto a Pi representa a probabilidade de o composto não exibir essa atividade. (SILVA; FERREIRA; MARYAM; ESPEJO-ROMÁN *et al.*, 2023). A previsão da atividade antibacteriana foi realizada para os dois compostos selecionados para investigação

Nossos resultados demonstraram que a molécula template (QNZ) apresentou atividade antibacteriana com uma probabilidade de Pa de 0.191 (ver Tabela 4). Além disso, o composto LMQC2 mostrou probabilidade de atividade antibacteriana, com valores de Pa variando entre 0.428 e 0.032 (Tabela 4). Por outro lado, o composto LMQC1 não exibiu atividade antibacteriana, o que pode ser vantajoso, uma vez que seus valores de atividade não estão registrados na base de dados. Podemos destacar que nenhuma das estruturas apresentou riscos toxicológicos e todas atendem aos parâmetros físico-químicos estabelecidos, permitindo que avancem para as fases seguintes.

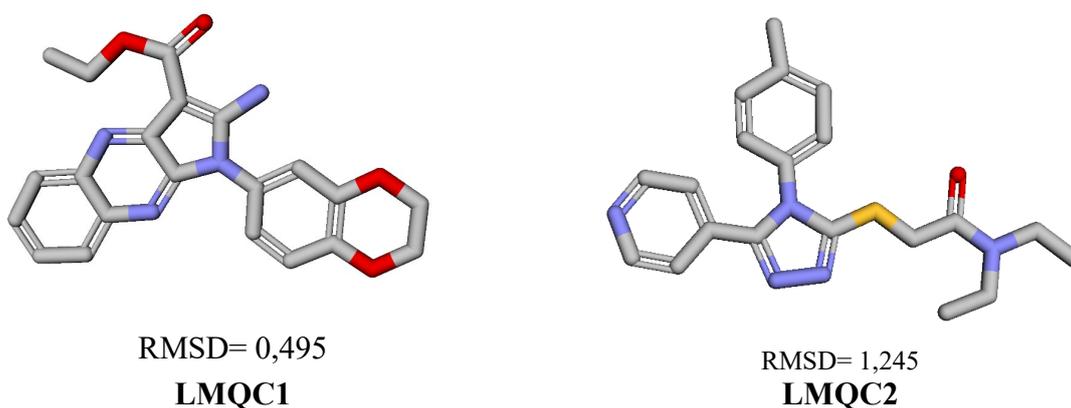
Tabela 4. Predição da atividade biológica para compostos resultantes da triagem virtual.

| MOLÉCULA | SMILES | Antibacteriano | |
|-------------------|--|----------------|-------|
| | | Pa | Pi |
| TEMPLATE (QNZ) | <chem>c1ccc2c(c1)C(=O)N(C(=N2)/C=C/c3ccc(cc3)C#N)c4cccc(c4)C(=O)O</chem> | 0.191 | 0.184 |
| LMQC1 | <chem>CCOC(=O)c1c(N)n(-c2ccc3OCCOc3c2)c2nc3ccccc3nc12</chem> | - | - |
| LMQC2 | <chem>CCN(CC)C(=O)CSc1nnc(-c2ccncc2)n1-c1ccc(C)cc1</chem> | 0.428 | 0.032 |

Fonte: Autoria Própria

Após as etapas metodológicas, dois compostos com resultados mais promissores (conforme mostrado nas Figuras 5 e 6) identificados por triagem virtual no servidor, foram submetidos a uma busca no SciFinder®, disponível no Chemical Abstract Service (CAS) (<https://scifinder.cas.org/>). Nenhum estudo referente a uma possível atividade biológica, foco deste trabalho, foi identificado.

Figura 6. Predição da atividade biológica para compostos resultantes da triagem virtual.



Fonte: Autoria Própria

Conclusões

Este estudo, utilizando triagem virtual baseada em farmacóforos, identificou dois compostos (LMQC1 e LMQC2) promissores para inibição da proteína PBP2a de MRSA. As hipóteses farmacofóricas geradas revelaram interações estratégicas entre os compostos e o alvo biológico, destacando as características hidrofóbicas e aceitadores de ligações de hidrogênio.

As predições ADME/*Tox* mostraram que as moléculas selecionadas apresentaram perfis favoráveis para atividade antibacteriana contra MRSA, como solubilidade e baixa toxicidade. A triagem virtual, seguida de simulação de *docking molecular*, identificou dois compostos promissores com alta afinidade pela PBP2a. O composto LMQC1 apresentou um LibDockScore de 120.978 e uma energia de ligação de -6.85 kcal/mol, enquanto o composto LMQC2 registrou um LibDockScore de 120.978 e uma energia de ligação de -6.13 kcal/mol, ambos os valores são semelhantes ou superiores aos valores do composto template (QNZ).

As interações de *docking molecular* mostraram que os três compostos interagem com resíduos críticos, como LYS B:273 e TYR B:105. Os resíduos críticos são aminoácidos específicos de uma proteína que são fundamentais para sua função biológica, especialmente nas interações com ligantes (BOULEY; KUMARASIRI; PENG; OTERO; SONG; SUCKOW; SCHROEDER; WOLTER; LASTOCHKIN; ANTUNES *et al.*, 2015). O composto LMQC1 apresentou ligações adicionais com ASN B:146, enquanto LMQC2 demonstrou interações semelhantes às da QNZ, destacando LYS B:316 como um ponto de interação comum. A análise PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) indicou um potencial antibacteriano para LMQC2. Esses compostos serão avaliados em futuras validações experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e aos membros do LMQC.

Referências

ARANTES, L. O.; CALDAS, E. R.; ROSA, S. A.; LELES, A. C. R. *et al.* Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, 9, n. 7, p. 21227-21243, 2023.

BIOVIA, D. S. Discovery studio modeling environment. Release 2017.

BOULEY, R.; KUMARASIRI, M.; PENG, Z.; OTERO, L. H. *et al.* Discovery of antibiotic (E)-3-(3-carboxyphenyl)-2-(4-cyanostyryl) quinazolin-4(3H)-one. **Journal of the American Chemical Society**, 137, n. 5, p. 1738-1741, 2015.

BOULEY, R.; KUMARASIRI, M.; PENG, Z.; OTERO, L. H. *et al.* Discovery of Antibiotic (E)-3-(3-Carboxyphenyl)-2-(4-cyanostyryl)quinazolin-4(3H)-one. **Journal of the American Chemical Society**, 137, n. 5, p. 1738-1741, 2015/02/11 2015.

DOS SANTOS, I. V. F.; BORGES, R. S.; SILVA, G. M.; DE LIMA, L. R. *et al.* Hierarchical virtual screening based on rocaglamide derivatives to discover new potential anti-skin cancer agents. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 9, p. 836572, 2022.



LIMA, M. F. P.; BORGES, M. A.; PARENTE, R. S.; JÚNIOR, R. C. V. *et al.* Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares–revisão de literatura. **Uingá Review**, 21, n. 1, 2015.

OLIVEIRA, L. P. S.; LIMA, L. R.; SILVA, L. B.; CRUZ, J. N. *et al.* Hierarchical Virtual Screening of Potential New Antibiotics from Polyoxygenated Dibenzofurans against Staphylococcus aureus Strains. **Pharmaceuticals**, v.16, n. 10, DOI: 10.3390/ph16101430.

RAMOS, R. S.; BORGES, R. S.; DE SOUZA, J. S. N.; ARAUJO, I. F. *et al.* Identification of Potential Antiviral Inhibitors from Hydroxychloroquine and 1,2,4,5-Tetraoxanes Analogues and Investigation of the Mechanism of Action in SARS-CoV-2. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Feb 4 2022.

SILVA, L. B.; FERREIRA, E. F. B.; MARYAM; ESPEJO-ROMÁN, J. M. *et al.* Galantamine Based Novel Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitors: A Molecular Modeling Design Approach. **Molecules**, 28, n. 3, p. 1035, 2023.