



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE *IN SILICO* DO COMPLEXO YCBB-PBP5 MEDIADOR DE RESISTÊNCIA  
A  $\beta$ -LACTÂMICOS

ALINE DE OLIVEIRA BRAGA

Natal-RN

2021

ALINE DE OLIVEIRA BRAGA

ANÁLISE *IN SILICO* DO COMPLEXO YCBB-PBP5 MEDIADOR DE RESISTÊNCIA  
A  $\beta$ -LACTÂMICOS

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr Umberto Laino Fulco  
Co-orientadora: Profa Dr. Maria Celeste  
Nunes de Melo

NATAL-RN

2021

Braga, Aline de Oliveira.

Análise in silico do complexo YCBB-PBP5 mediador de resistência  $\beta$ -Lactâmicos / Aline de Oliveira Braga. - 2021. 66 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Natal/RN, 2021.

Orientador: Prof. Dr Umberto Laino Fulco.

Coorientadora: Profa Dr. Maria Celeste Nunes de Melo.

1. Resistência  $\beta$ -Lactâmicos - Dissertação. 2. MFCC - Dissertação. 3. DFT - Dissertação. 4. YCBB - Dissertação. I. Fulco, Umberto Laino. II. Melo, Maria Celeste Nunes de. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 615.015.8

Defesa da dissertação de mestrado da discente Aline de Oliveira Braga intitulada: ANÁLISE *IN SILICO* DO COMPLEXO YCBB-PBP5 MEDIADOR DE RESISTÊNCIA A  $\beta$ -LACTÂMICOS orientada pelo Prof. Dr. Umberto Laino Fulco e co-orientada pela Profa. Dra. Maria Celeste Nunes de Melo apresentado à banca examinadora designada pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da UFRN

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata \_\_\_\_\_.

### **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Umberto Laino Fulco (DBF/UFRN)

---

Profa. Dra. Maria Celeste Nunes de Melo (DMP/UFRN)

---

Dra. Jéssica de Fátima Vianna (Examinadora externa)

---

Prof. Dr. Antônio Macêdo Filho (Examinador externa)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço pelo dom da vida.

Agradeço a minha família por todo amor e respeito. Ao meu marido, Luiz Ricardo, pela paciência e eterna fortaleza. Ao meu filho, Luiz Henrique, cuja existência me dá todos os motivos para vencer;

Agradeço ao Prof. Dr. Umberto pelo voto de confiança, apoio e respeito; Serei eternamente grata pelo acolhimento;

Agradeço aos colegas do laboratório de Biofísica e Simulação Computacional pela parceria e colaboração. Em especial à Katy pela sua generosidade inesgotável; À Sabryna e Washington pelo apoio nesta jornada; à Xavier pelas suas atitudes resolutivas quando eu necessitei e à Emmanuel por toda ajuda e tempo disponibilizado;

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que cruzaram meu caminho nesta jornada e acrescentaram, deixando um pouco de si em suas ações. Obrigada!

Eu não quero acreditar, eu quero conhecer.

Carl Sagan

Conhecereis a **verdade** e a **verdade** vos libertará!

Jo 8.3

## RESUMO

O mecanismo de resistência mediado pela L,D transpeptidase YcbB complexada com PBP5 em *Escherichia coli* permite a continuação da síntese da parede celular mesmo na presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, possibilitando a sobrevivência da bactéria mesmo sob estresse celular. Devido ao aumento do número de casos de resistência bacteriana aos tratamentos disponíveis, torna-se evidente a necessidade em desenvolver uma melhor compreensão sobre os mecanismos de resistência e conseqüentemente elaborar soluções farmacológicas eficazes. O objetivo deste estudo é avaliar, por meio de técnicas de simulação computacional fundamentadas na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e utilizando como metodologia o Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC), as especificidades energéticas presentes na interação entre os complexos YcbB-Meropenem e PBP5-Meropenem, a partir da utilização das estruturas cristalinas destas proteínas e a aplicação das ferramentas inerentes ao campo da simulação computacional. Para o primeiro complexo, foram avaliados 38 aminoácidos enquanto que para o sistema PBP5-Meropenem 42 aminoácidos foram analisados. A maioria dos resíduos energeticamente mais relevantes fazem parte do bolsão de ligação e os aminoácidos com maior energia atrativa estão situados a uma distância de até 4 Å, em ambos os complexos. Os resultados obtidos indicam maior energia de interação entre o meropenem e PBP5 através da interação dos resíduos THR243, HIS245, SER116, LYS242, GLY114 e SER139 que foram os mais importantes. Enquanto que para o complexo YcbB e meropenem os aminoácidos mais relevantes são SER526, TYR507, LEU431, ILE506, THR430 ARG407, TRP425, PRO428. Os métodos utilizados na análise destes resultados são arrojados e eficientes, e os resultados analisados servem como base de fundamentação teórica no desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: MFCC, DFT, ENERGIA DE INTERAÇÃO, YCBB, PBP5, MEROPENEM

## **ABSTRACT**

The resistance mechanism mediated by L,D transpeptidase YcbB complexed with PBP5 in *Escherichia coli* allows a continuation of cell wall synthesis even in the presence of  $\beta$ -lactam antibiotics, enabling the survival of the bacteria even under cellular stress. Asking for an increase in the number of cases of bacterial resistance to the treatments available, the need to develop a better understanding of the mechanisms of resistance and, consequently, develop effective pharmacological solutions becomes evident. The aim of the study is to evaluate, through computer simulation techniques based on Density Functional Theory (DFT) and using Conjugated Layer Molecular Fractionation (MFCC) as a methodology, as energetic specificities present in the interaction between YcbB-Meropenem complexes and PBP5-Meropenem, from the use of the crystal structures of these proteins and the application of tools inherent in the field of computer simulation. For the first complex, 38 amino acids were obtained while for the PBP5-Meropenem system 42 amino acids were analyzed. Most energetically more residues are part of the binding reinforcement and the amino acids with higher energy generate situated at a distance of up to 4 Å, in both complexes. The results obtained indicate greater interaction energy between meropenem and PBP5 through the interaction of residues THR243, HIS245, SER116, LYS242, GLY114 and SER139 which were the most important. While for the YcbB complex and meropenem the most relevant amino acids are SER526, TYR507, LEU431, ILE506, THR430 ARG407, TRP425, PRO428. The methods used to analyze these results are bold and efficient, and the results are provided as a theoretical basis for the development of new drugs.

Keywords: MFCC, DFT, INTERACTION ENERGY, YCBB, PBP5, MEROPENEM



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação gráfica da parede celular de bactérias gram-negativas

Figura 1.2 – Composição e arquitetura do peptidoglicano

Figura 1.3 – Esquematização das etapas envolvidas no processo de síntese de peptidoglicano

Figura 1.4 – Reação D,D Transpeptidação mediada por PBPs

Figura 1.5 – Etapas da formação do complexo e mecanismo de resistência mediado por YcbB

Figura 1.6 – Reação L,D Transpeptidação mediada por YcbB

Figura 1.7 – Diagrama topológico da YcbB: Divisão da proteína em 4 regiões referentes ao domínio I de sustentação, domínio II de interação com o peptidoglicano, domínio III catalítico e IV subdomínio.

Figura 5.1 – Estruturas cristalográficas das enzimas A) YcbB cocrystalizada com o ligante Meropenem (amarelo) (PDB ID:6NTW) b) PBP5 cocrystalizada com o ligante Meropenem (amarelo) (PDB ID:6NTZ)

Figura 6.1 – Ligante meropenem subdividido em regiões funcionais

Figura 6.2 – DFT projetada em uma isosuperfície de potencial eletrostático

Figura 6.3 – Gráfico de convergência contendo aminoácidos relevantes para o montante energético A) complexo YcbB/Meropenem B) complexo PBP5/Meropenem

Figura 6.4 – Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das interações YcbB/Meropenem em vermelho

Figura 6.5 – Aminoácidos Ser526, Tyr507 e Ile506 da proteína YcbB interagindo com a porção do ligante meropenem através de ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e interações do tipo dipolo-induzido (rosa)

Figura 6.6 – Aminoácidos Trp425, Arg407, Pro428, Thr430 e Leu430 proteína YcBb interagindo com a porção do ligante meropenem. através de dipolo induzido (rosa) e ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e íon dipolo com O'13 protonado do meropenem (azul).

Figura 6.7 – Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das interações PBP5/Meropenem em roxo

Figura 6.8 – Aminoácidos Thr243, Lys242, Arg277 e His245 pertencentes a PBP5 interagindo com o meropenem de forma típica às PBPS, através de ligações de hidrogênio (em verde), íon-dipolo (em azul) e dipolo induzido (em rosa)

Figura 6.9 – Aminoácidos Gly11, Ser116 e Ser139 pertencentes a PBP5 interagindo com o meropenem de forma típica às PBPS, através de ligações de hidrogênio não convencionais (em verde) e dipolo induzido (em rosa)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
Arg	Aminoácido Arginina
Cys	Aminoácido Cisteína
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
Gly	Aminoácido Glicina
His	Aminoácido Histidina
Ile	Aminoácido Isoleucina
Leu	Aminoácido Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
Lys	Aminoácido Lisina
MFCC	Fracionamento Molecular com Capas conjugadas
NAG	Ácido N-acetil-glucosamina
NAM	Ácido N-acetil-murâmico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Penicillin binding protein
PDB	Protein Data Bank
ppGpp	Tetrafosfato de guanósina e pentafosfato de guanósina
Pro	Aminoácido Prolina
Ser	Aminoácido Serina
Trp	Aminoácido Triptofano
Tyr	Aminoácido Tirosina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA	14
1.1.1 PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	16
1.1.2 SÍNTESE DE PEPTIDOGLICANO	18
1.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA MEDIADO POR YcbB	20
1.2.1 L,D TRANSPEPTIDASE YCBB	23
1.2.2 PROTEÍNA LIGADORA DE PENICILINA 5 (PBP5)	25
1.2.3 MEROPENEM	26
<b>2.MODELAGEM MOLECULAR</b>	28
<b>3.JUSTIFICATIVA</b>	30
<b>4.OBJETIVOS</b>	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
5.1 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS CRISTALINAS	33
5.2 MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPAS CONJUGADAS	34
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CRISTALOGRAFICOS	37
6.2 ENERGIA TOTAL DA LIGAÇÃO E CONVERGÊNCIA	39
6.3 ENERGIA E INTERAÇÕES DOS PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS DO COMPLEXO YCBB - MEROPENEM	42
6.4 COMPLEXO PBP5 - MEROPENEM	45
<b>7.CONCLUSÃO</b>	49

## **1. INTRODUÇÃO**

A luta contra a resistência bacteriana pode ser considerada uma verdadeira corrida armamentista. De um lado, a ciência, buscando as melhores estratégias para eliminar as bactérias patogênicas. Do outro, estão as bactérias, microrganismos com potencial letal desenvolvendo mecanismos adaptativos que driblam a eficácia dos antibióticos desenvolvidos, e conseqüentemente evadindo a morte [referência].

Este padrão de interação evolutiva entre antibióticos e bactérias vem sendo observado desde que os primórdios da antibioticoterapia. A descoberta e desenvolvimento inicial da penicilina em 1929 pelo médico e bacteriologista Alexander Fleming foi considerada o primeiro passo para a revolução farmacêutica no sentido de tratar doenças infecciosas. Ao se deparar com a presença de mofo nas suas culturas de *Staphylococcus*, Fleming notou halos transparentes onde deveriam ter crescido bactérias, com esta compreensão ele associou a presença do fungo a uma substância bactericida. Posteriormente, esta substância secretada pelos fungos recebeu o nome Penicilina em homenagem aos fungos do gênero *Penicillium* (Lobanovska; Pilla, 2017).

A penicilina foi um sopro de esperança em uma época onde doenças infecciosas simples eram mortais, sendo a grande responsável por impedir a morte e complicações de doenças como pneumonia, sífilis, difteria, meningite e bronquite. As décadas seguintes foram marcadas por grandes avanços, com a disponibilização de novos antibióticos no mercado como a tetraciclina, eritromicina, gentamicina e vancomicina, a era de ouro da antibioticoterapia (Adedeji, 2016).

Entretanto, apesar dos avanços inéditos e os resultados aparentemente extraordinários, as bactérias se mostraram resilientes. Apenas alguns anos após o início da utilização clínica da Penicilina, casos de resistência foram documentados.

Em 1944, WM Kirby identificou que alguns *Staphylococcus aureus* isolados de material clínico mostravam-se resistentes à penicilina devido à produção de penicilinase. Em 1946, nos Estados Unidos da América, cerca de 5% de estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Em 1949 esta resistência podia ser notada em 29% dos germes isolados em hospitais norte-americanos; em 1950 atingia 50% e em 1959 era de cerca de 80% (Tavares, 2000).

Quase seis décadas depois, a ciência permanecia incapaz de inovar. No ano de 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) disponibilizou uma lista de Patógenos Bacterianos Prioritários contendo um panorama das bactérias que representam maior grau de ameaça à saúde humana (OMS, 2017). Em 2020, o relatório anual da OMS reforça este panorama preocupante, sinalizando para comunidade científica sobre o crescimento alarmante de doenças causadas por bactérias multirresistentes, além de trazer um alerta para a necessidade de urgência no avanço de tratamentos eficazes contra estas doenças (OMS, 2020).

A resistência bacteriana é um verdadeiro problema de saúde pública com potencial de atingir a população em escala global, e apesar de não se caracterizar como doença única, existem previsões sobre uma possível pandemia causada por microrganismos resistentes na qual podem chegar a atingir mais de 10 milhões de pessoas ao ano até 2050 caso medidas não sejam iniciadas imediatamente (Nadimpalli; Chan; Doron, 2021 ; OMS, 2019).

Para que respostas inovadoras surjam, é necessário abranger o conhecimento sobre o problema adotando abordagens diferenciadas que levam à compreensão mais profunda da problemática. Em consonância com este fundamento, foram utilizadas técnicas quânticas de modelagem molecular para abranger o conhecimento em torno do mecanismo de resistência mediado por YcbB presente em *Escherichia coli* (e outras), capaz de evadir a ação farmacológica de uma grande variedade de antibióticos e promover sobrevivência da célula

bacteriana. Para alcançar este objetivo foram utilizados modelos biológicos complexos envolvendo as proteínas YcbB e Pbp5, e o antibiótico meropenem.

## **1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA**

A resistência bacteriana pode ser definida como a capacidade de uma bactéria em desenvolver mecanismos capazes de burlar a eficácia de antibióticos, conseqüentemente garantindo a sobrevivência da célula e a disseminação dos mecanismos de resistência (Fouladkhah; Thompson; Camp, 2020). O desenvolvimento da resistência depende da expressão de genes que determinam o funcionamento e recrutamento de maquinarias bioquímicas e estruturais que promovem falha no mecanismo de ação do antibiótico (Andrade; Darini, 2017).

De modo geral, a resistência pode ter origem intrínseca, que corresponde aos mecanismos de resistência inatos da espécie, ou extrínseca (adquirida), que é originada a partir de mutações nos próprios genes ou quando há aquisição de genes de resistência através da comunicação entre as bactérias (Rice; Bonomo, 2005).

Didaticamente, os mecanismos podem ser classificados de acordo com a estratégia de inativação do antibiótico. Sob esta ótica, os principais mecanismos de resistência são: a produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos, a redução da permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo hiper expressos, alteração do sítio alvo (de ligação) do antibiótico e bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico (Hoek *et al*, 2011).

As implicações práticas no caso de infecções causadas por bactérias resistentes vão desde a dificuldade em tratar os quadros clínicos, culminando para um prolongamento do tempo da doença e um risco de morte aumentado, a rápida disseminação devido o aumento do tempo de exposição, e do ponto de vista de saúde pública, o aumento de custos com tratamentos mais onerosos. (Luepke *et al*, 2017).

As bactérias que possuem genes de resistência, sejam eles advindos de mutações ou aquisições, têm vantagens competitivas em termos de sobrevivência. Na presença de antimicrobianos, as bactérias capazes de sobreviver se replicam, resultando em uma progênie do tipo dominante na população microbiana. Este é o fundamento pelo qual se explica a seleção bacteriana ocasionada pelos antibióticos, a principal causa da resistência bacteriana. (Martinez-Martinez; Calvo, 2010)

Aliado a este processo natural, a seleção de microrganismos resistentes é exacerbada pelo uso inadequado de antimicrobianos que representa a força motriz do avanço na resistência bacteriana. Estima-se que aproximadamente 50% dos antimicrobianos prescritos são considerados desnecessários, como em quadros de infecção viral ou condição ainda não diagnosticada (Elshamy; Aboshanab, 2020).

Em ambiente hospitalar, este cenário alarmante é ainda mais potencializado. O caráter suscetível dos pacientes em estado crítico, como por exemplo os instalados em unidades de terapia intensiva (UTI), favorece o uso extensivo de antimicrobianos. Em acréscimo, o contato entre enfermos propicia um ambiente fértil para a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (NHI, 2011).

O desenvolvimento da resistência também é favorecido por comportamentos como a má higiene, o uso incorreto dos antibióticos pelo paciente e fatores iniciadores de resistência associados ao uso exacerbado de antibióticos na agropecuária (Teixeira; Figueiredo; França, 2019; Rabello *et al*, 2020).

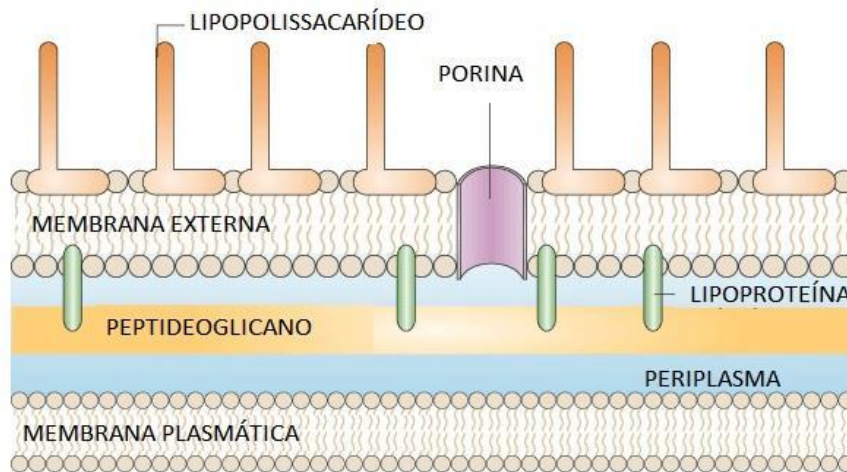
### 1.1.1 PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

A parede celular bacteriana é uma macromolécula de grande complexidade e importância que executa papéis relativos à proteção e sobrevivência da célula bacteriana. Ao fornecer força e rigidez, a parede celular se torna responsável pela manutenção do formato da célula em um processo de neutralização da pressão osmótica interna, além de ser verdadeiramente uma barreira física contra agentes externos. Devido às suas características vitais para a sobrevivência da célula, a

parede celular é considerada um importante alvo farmacológico (Cavaney *et al*, 2021).

Em bactérias gram-negativas, a parede celular é composta essencialmente por uma camada de peptidoglicano, lipoproteínas, uma membrana externa onde se apresenta o lipopolissacarídeo (LPS) e porinas que servem como canais para comunicação do meio extracelular com o meio intracelular (Brown *et al*, 2015). (Figura 1.1)

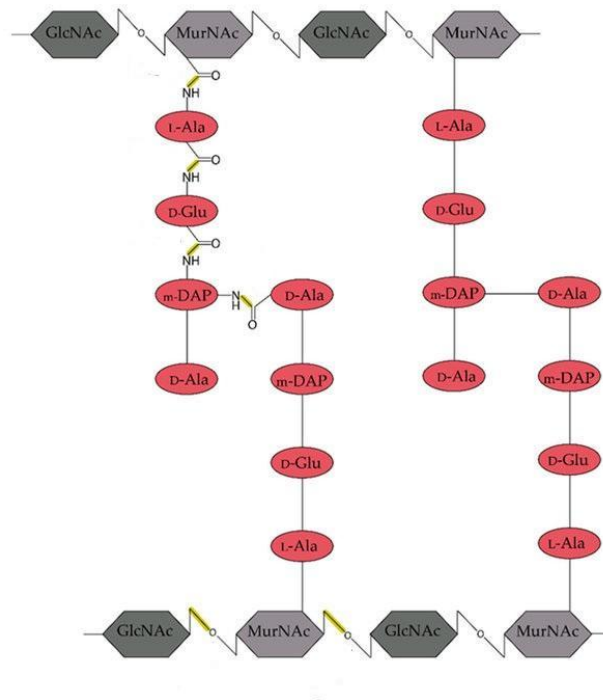
Figura 1.1: Representação gráfica da parede celular de bactérias gram-negativas



Fonte: Adaptado de Cabeen; Jacobs-Wagner, 2005

O peptidoglicano é considerado o principal constituinte da parede celular, responsável pela forma, viabilidade e proteção da célula. Estruturalmente, consiste em uma macromolécula formada de muitas subunidades repetidas, ou seja, um polímero. Esta arquitetura cria uma malha constituída por segmentos de ácido N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) associados por ligações do tipo  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) e alternados por meio de segmentos curtos de peptídeo covalentemente ligados na posição C3-OH do último açúcar (Figura 1.2) (Porfírio; Carlson; Azadi, 2019).

Figura 1.2. Composição e arquitetura do peptidoglicano

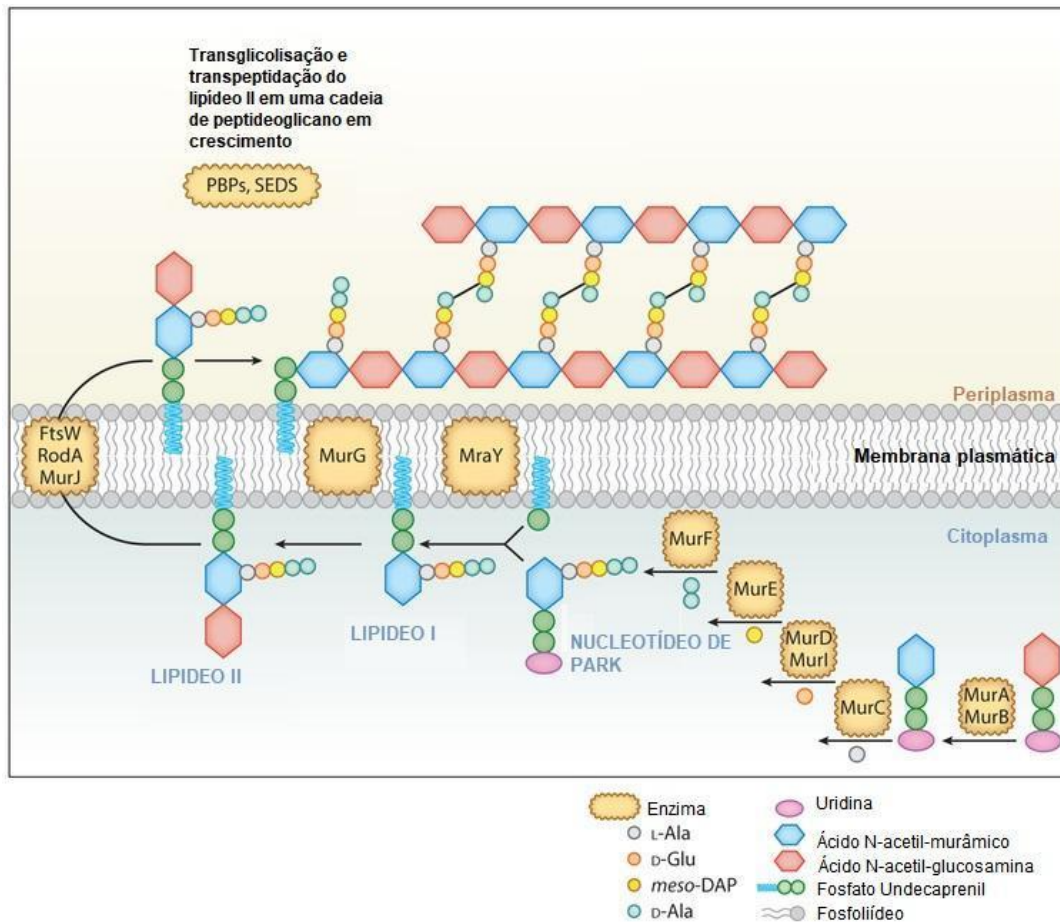


Fonte: Adaptada de Love *et al*, 2018

### 1.1.2 SÍNTESE DE PEPTIDOGLICANO

A síntese do peptidoglicano é um processo que ocorre de forma coordenada envolvendo várias etapas complexas que se desenvolvem desde o citoplasma até o espaço periplasmático (Radkov Hsu; Booher; VanNieuwenhze, 2018). De modo geral, estas etapas podem ser divididas e classificadas de acordo com a região no qual o processo está ocorrendo. A primeira etapa é citoplasmática, envolve reações enzimáticas necessárias para síntese de precursores do peptidoglicano, enquanto que a segunda etapa ocorre na face interna da membrana plasmática, e é destinada a sintetizar os intermediários ligados a lipídios e por fim, a terceira etapa que ocorre no espaço periplasmático, considerada a verdadeira etapa de montagem na rede de peptidoglicano (Egan; Errington; Vollmer, 2020) (Figura 1.3).

Figura 1.3. Esquematização das etapas envolvidas no processo de síntese de peptidoglicano



Fonte: Adaptado de (Radkov; Hsu; Booher; VanNieuwenhze, 2018)

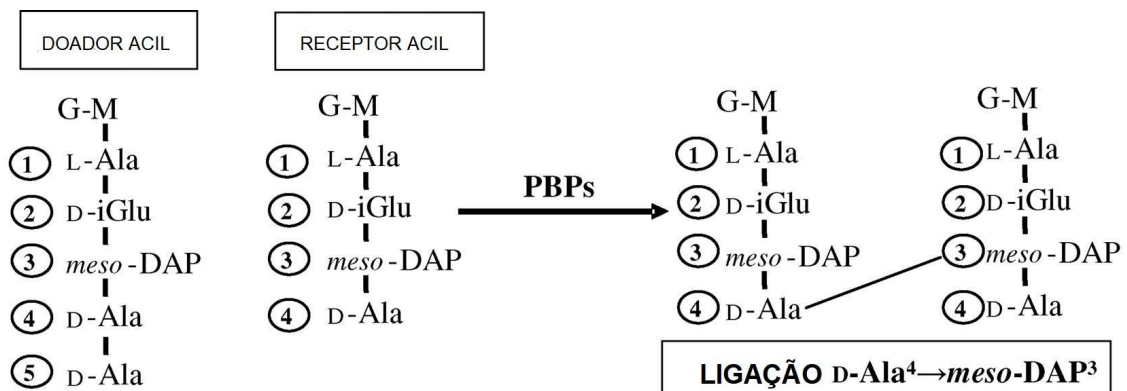
Com riqueza de enzimas, a etapa citoplasmática é modulada pela ação de vários exemplares da família Mur ligase que são responsáveis por promover a síntese dos precursores do peptidoglicano. O processo inicia com uma reação catalisada por MurA/B que promove a formação do ácido UDP-N-acetilmurâmico (UDPMurNAc) a partir de N-acetilglucosamina (GlcNAc). As reações consecutivas adicionam os peptídeos L-alanina, D-glutamato, meso-diaminopimelato ou L-lisina e D-alanil-D-alanina ao UDPMurNAc com o auxílio das enzimas MurC, MurD, MurE e MurF (Lovering; Safadi; Strynadka, 2012). A segunda etapa inicia, didaticamente, quando o nucleotídeo de Park é reconhecido pela MraY transferase, ocorrendo a adição de um fosfato undecaprenil ao complexo, transformando-o em Lipídeo I. Logo

após, a MurG transferase catalisa a transferência da fração GlcNAc de UDP-GlcNAc para de lipídio I, e como resultado a obtenção do lipídio II. Este é finalmente transportado para a porção periplasmática com auxílio das enzimas MurJ, FtsW, RodA. (Otten *et al*, 2018).

Em *E. coli*, a terceira etapa da síntese do peptidoglicano é realizada principalmente por enzimas PBP de classes A e B que executam atividade enzimática de transpeptidação. Este processo ocorre basicamente em dois passos: 1) acilação mediada por serina do penúltimo resíduo, D-alanina, do pentapeptídeo na fita Peptideoglicano em crescimento; 2) O intermediário acil-enzima covalente é subsequentemente desacetilado por meio de um ataque nucleofílico de uma cadeia lateral ou grupo amino terminal do terceiro resíduo, meso-DAP, L-lisina ou L-lisina-pentaglicina, em uma fita Peptideoglicano adjacente (Figura 1.4) (Cavaney *et al*, 2019).

As proteínas ligadoras de penicilina responsáveis pela etapa final da síntese do peptidoglicano são os alvos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que atuam mimetizando o seu substrato o peptídeo doador e bloqueia a atividade enzimática. A inibição desta etapa culmina para a desestabilização da parede celular e, consequentemente, na morte celular. (Lima; Silva; Barbosa; Barreiro, 2020)

Figura 1.4 Reação D,D Transpeptidação mediada por PBPs



## 1.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA MEDIADO POR Y<sub>CB</sub>B

Sob circunstâncias de estresse celular, como o causado pelos  $\beta$ -lactâmicos, a *E.coli* entra em estado de alerta, sendo capaz de se remodelar e desenvolver uma resposta eficiente para resistir aos efeitos farmacológicos. O desenvolvimento de uma via alternativa, um mecanismo de resistência, surge com o recrutamento de moléculas capazes de resgatar a síntese da parede celular, gerando resistência de amplo espectro à classe de  $\beta$ -lactâmicos (Egan; Errington; Vollmer, 2020).

Como detalhado anteriormente, a biossíntese do peptidoglicano é um processo essencial para a manutenção da parede celular e viabilidade de célula. Em situações em que as células bacterianas são submetidas a uma alta pressão seletiva, a via de produção de peptidoglicano mediada por PBPs é inibida pela ação dos  $\beta$ -lactâmicos, entretanto como um mecanismo alternativo, de *backup*, a célula bacteriana através de uma pequena cascata de acontecimentos recruta moléculas acessórias responsáveis pela sua sobrevivência (Hugonnet *et al*, 2016).

Na via comum, a enzima PBP1b possui duas atividades enzimáticas, atuando como glicosiltransferase e D,D transpeptidase. É considerada a responsável pelo processo de reticulação da rede do peptidoglicano em situações de ambiente controlado, mas na presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a PBP1 tem a sua capacidade de D,D transpeptidase inibida pelo fármaco, atuando apenas como glicosiltransferase. (Figura 1.5 A e B)

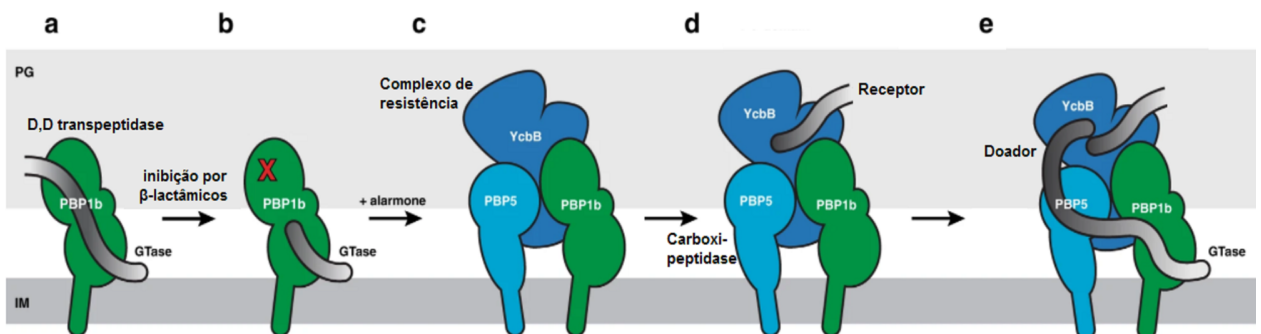
Quando a inibição mediada por fármacos ocorre, há um aumento na síntese de (p) PPgPP alarmona, que funciona como um marcador da resposta adaptativa frente aos antibióticos. Esta molécula está relacionada a diversas variações fisiológicas envolvendo ativação e repressão de genes, tradução de proteínas e ativação de enzimas, sendo intensamente associada a regulação da taxa de crescimento e a resposta ao estresse (Hugonnet *et al*, 2016). Diante desta

circunstância, as enzimas PBP5 e YcbB são recrutadas para formar o complexo de resistência em associação a PBP1B (Figura 1.5, c) (Cavaney et al, 2019).

O recrutamento dessa maquinaria torna possível a continuação do processo de polimerização de peptidoglicano. As enzimas YcbB e PBP5 assumem o papel da PBP1 quanto a função de carboxipeptidase que passa a ser mediada pela PBP5 e transpeptidase que se torna responsabilidade da YcbB (Cavaney et al, 2019).

A reação de carboxipeptidação ocorre com a remoção do D-Ala5 terminal por PBP5, gerando um produto que é o substrato de tetrapeptídeo de glicano doador para YcbB que por fim catalisa uma transpeptidação do tipo L-D para formar uma ligação cruzada DAP3 doador -DAP3 receptor (Figura 1.5, d e ) (Hugonnet *et al*, 2016)

Figura 1.5. Etapas da formação do complexo e mecanismo de resistência mediado por YcbB

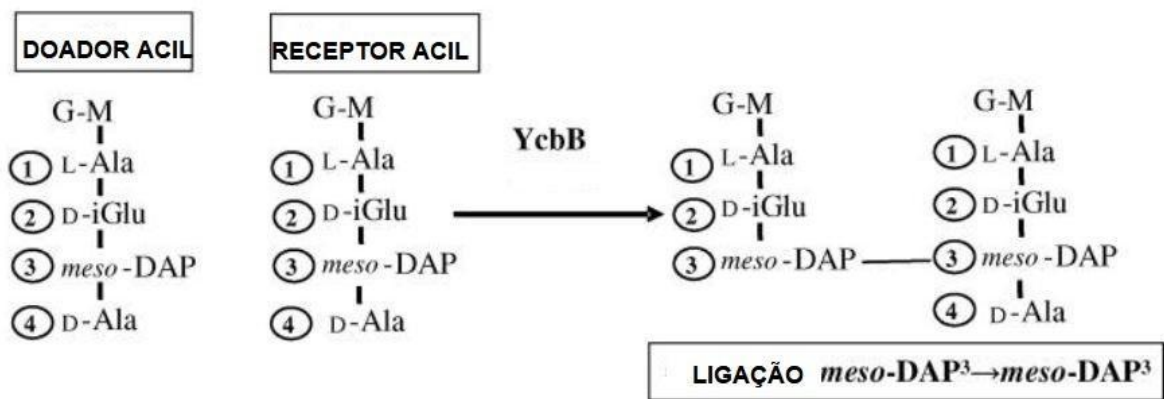


Fonte: Adaptado de Cavaney *et al*, 2019

No que diz respeito à estrutura do peptidoglicano, a diferença primordial entre a via comum de síntese mediada por PBPs e a via alternativa mediada por YcbB é o tipo de ligação cruzada resultante da reação. No primeiro caso, as ligações são essencialmente do tipo  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), enquanto que na via alternativa as ligações cruzadas são do tipo **3 $\rightarrow$ 3** (DAP3 doador-DAP3 receptor) (Figura. 1.6) (Egan; Errington; Vollmer, 2020).

Outra característica inerente às L,D transpeptidases, é que de um modo geral, não são inibidas pela vasta maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção de uma pequena fração de antibióticos da classe dos carbapenêmicos. Em suma, quando as DD-transpeptidases são inibidas, *E. coli* muda seu *modus operandi* relacionado a síntese de peptidoglicano e usa seu sistema de reparo de peptidoglicano para crescer com um peptidoglicano totalmente funcional e reticulado por uma enzima capaz de resistir a maior parte do arsenal  $\beta$ -lactâmico (Biarrote-Sorin *et al* 2006).

Figura 1.6. Reação L,D Transpeptidação mediada por YcbB



Fonte: Adaptado de Mainardi *et al*, 2008

### 1.2.1 L,D TRANSPeptIDASE YCBB

A YcbB é uma proteína solúvel encontrada na parede celular da bactéria gram-negativa *E.coli* e tem como principal função atuar na transpeptidação de aminoácidos durante o processo de síntese do peptidoglicano, especialmente em situações de estresse celular (Cavaney *et al*, 2019). Pertence à família das L,d transpeptidases, que compartilham regiões conservadas contendo histidina e cisteínas que estão relacionadas às suas atividades enzimáticas. Exemplos de proteínas desta família podem ser encontradas em variadas espécies de bactérias

como *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella enterica* e *Citrobacter rodentium*. (Lecoq *et al* 2013; Dubeé, 2012; Aliashkevic; Cava, 2021)

A atividade enzimática da YcbB é dependente da sinalização intracelular ocasionada pelo aumento de tetrafosfato de guanosina e pentafofato de guanosina (referidos coletivamente como (p) ppGpp ou alarmones) em resposta ao estresse. Esta regulação favorece o recrutamento da YcBb associada a proteína ligadora de penicilina 5 (PBP5) que ocasiona uma resposta adaptativa eficiente capaz de evitar a ação de um largo espectro de antibióticos (Aliashkevic; Cava, 2021).

Para obter compreensão de como a YcbB interage e funciona a nível molecular, é necessário entender o seu comportamento estrutural. Por isso, através de análises realizadas com homologia foi possível categorizar e observar várias regiões de conservação genética dentro da família das L,D transpeptidases e ainda assim, a YcbB exibe algumas características inerentes e exclusivas (Caveney *et al*, 2019).

De forma geral, a sua estrutura pode ser dividida em três grandes domínios e um subdomínio. O domínio de sustentação (scaffold), domínio de interação com o peptidoglicano e domínio catalítico. Cada domínio apresenta características estruturais específicas que culminam no desempenho das suas funções correspondentes na enzima (Figura 1.7) (Caveney *et al*, 2019).

O domínio de sustentação (scaffold) é exclusivo da família YcbB dentro das L,D transpeptidases, por isto podem existir funções específicas ou atividades regulatórias ainda desconhecidas, entretanto há evidências do seu papel crucial na interação proteína-proteína como no caso da formação do complexo de resistência entre YcbB, PBP5 e PBP1b (Huggonet *et al*, 2016). Sua composição estrutural está organizada em dez hélices formando um feixe helicoidal com duas destas hélices se comunicando com os outros domínios (Figura 1.7, I) (Caveney *et al* 2019).

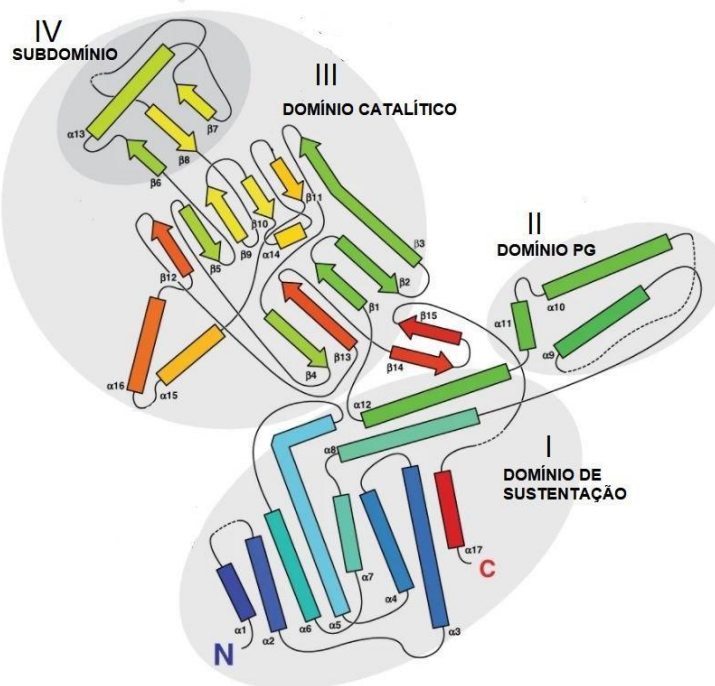
A YcbB interage com o peptidoglicano através de um domínio próprio arquitetado em uma configuração no qual forma um pequeno feixe triélico

antiparalelo com uma região elástica entre a primeira e a segunda hélices relativamente conservada aos domínios de ligação de PG (Figura 1.7, II) (Caveney *et al*, 2019).

O domínio catalítico contém o sítio de reação com a presença de um motivo contendo uma cisteína (Cys528) e uma histidina (His509) conservadas nesta região. A dinâmica catalítica que ocasiona o ataque nucleofílico responsável pela transpeptidação é proveniente da interação desses resíduos com o alvo. Em sua perspectiva estrutural, adota uma conformação canônica característica de L,D transpeptidase, formando uma fenda entre os locais de contato com o resíduo doador e receptor formado de folhas beta dispostas em forma de concha e  $\alpha$ -hélices 15 e 16 situadas na fenda (Figura 1.7, III) (Caveney, 2019).

O subdomínio fica situado logo acima do domínio catalítico com a função de fornecer flexibilidade inerente durante as funções na entrada, cobertura e liberação do substrato (Gokulan *et al*, 2018). É composto por uma pequena folha beta de três fitas ( $\beta_{6,8,7}$ ) e uma  $\alpha$ -hélice (Figura 1.7, IV) (Caveney *et al*, 2019).

Figura 1.7. Diagrama topológico da YcbB: Divisão da proteína em 4 regiões referentes ao domínio I de sustentação, domínio II de interação com o peptidoglicano, domínio III catalítico e IV subdomínio.



Fonte: Adaptado de Cavaney *et al*, 2019

### 1.2.2 PROTEÍNA LIGADORA DE PENICILINA 5 (PBP5)

Atualmente se tem conhecimento de doze proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) em *E.coli*, sendo que apenas quatro têm funções fisiológicas conhecidas, estas são caracterizadas pelo alto peso molecular, são as PBP 1a, 1b, 2 e 3. Em oposição a isto, as PBPs de baixo peso molecular, incluindo a PBP5, ainda não têm funções fisiológicas bem definidas, embora o conhecimento sobre suas capacidades enzimáticas seja mais elaborado (Nelson; Young, 2000).

Dos atributos conhecidos da PBP 5, é possível citar a sua atividade enzimática como D,D-carboxypeptidase, que promove a remoção do resíduo de alanina terminal da cadeia lateral de pentapeptídeo de peptidoglicano (Nelson; Young, 2001). O mecanismo pelo qual essa função é desempenhada é comum a outras PBPs e ocorre por meio da acilação de um sítio ativo de serina pelo substrato

de peptídeo, seguido por desacilação hidrolítica deste intermediário de acil-enzima para completar a remoção da alanina (Sauvage *et al*, 2008).

Estudos realizados por Nelson e Young (2000) demonstraram que a PBP5 também desempenha um papel importante na síntese e manutenção da formato da célula bacteriana, as conclusões são frutos do experimento no qual bactérias expressando PBP5 de forma normal produziam células com o formato previsto, enquanto mutantes sem PBP 5 produziram células com diâmetros, contornos e características topológicas alteradas.

Em acréscimo às principais características, a PBP5 se comporta de forma a resistir a ação de  $\beta$ -lactâmicos, sendo inibida apenas em concentrações elevadas do fármaco (Montealegre *et al*, 2016). A baixa afinidade pode estar ligada a mutações pontuais no domínio C-terminal (Zhou *et al*, 2015) porém ainda é necessário mais estudos envolvendo a análise de sequenciamentos para determinar com exatidão as mutações envolvidas.

No que diz respeito a estrutura da PBP5, pode ser dividida em dois domínios principais. O domínio I é compartilhado com todas as PBPs e todas as  $\beta$ -lactamases baseadas em serina formada por uma proporção equivalente de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$  tem sua função relacionada à atividade de peptidase, e também responsável pela ligação aos  $\beta$ -lactâmicos (Sauvage *et al*, 2008). O domínio II é único para PBP 5 e é formado por um sanduíche de duas folhas antiparalelas, uma de três fitas e a outra de duas fitas, chamado de domínio c-terminal (Nicholas *et al*, 2003).

A associação da PBP5 com a YcbB durante o resgate da síntese do peptidoglicano é indispensável para o sucesso da sobrevivência da célula bacteriana. Por isso, a avaliação da influência energética da PBP5 neste processo também foi alvo de análise neste estudo.

### 1.2.3 MEROPENEM

O Meropenem, desenvolvido durante a década de 1980, representa mais um avanço na química estrutural dos carbapenêmicos. É um antibacteriano com caráter bactericida, de amplo espectro, administrado por via intravenosa com excelente atividade contra uma ampla gama de bactérias, incluindo muitos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Drusano, 1997)

Pertence à classe dos  $\beta$ -lactâmicos, no grupo dos carbapenêmicos, e são caracterizados pela estrutura básica contendo o núcleo  $\beta$ -lactâmico responsável pela ligação às PBPs e seu derivado de Tienamicina com cadeia pentacíclica não saturada ligada a um átomo de carbono que caracteriza o anel carbapenêmico (Salmon-Rousseau *et al*, 2020).

O meropenem pode ser dividido em regiões que favorecem sua ação biológica, como por exemplo, a porção hidroxietil na configuração trans que confere estabilidade a serina  $\beta$ -lactamases, o anel  $\beta$ -lactama que fornece alta afinidade para proteínas de ligação às PBPs, o núcleo de carbapenem que é associado a um espectro antibacteriano ultra-amplo, o grupo C1 metil melhora a estabilidade à desidropeptidase-I renal e porção C2 aumenta a atividade contra patógenos Gram-negativos, e também pode ser responsável pela boa tolerabilidade do sistema nervoso central de meropenem. (Drusano, 1997)

No que concerne a ação farmacológica, o meropenem se liga às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), e age como um substrato que imita o peptídeo doador e inibe irreversivelmente as enzimas por meio da acilação de longa duração da serina catalítica culminando para inibição da parede celular e consequente morte da célula bacteriana (Zandi ; Townsend, 2021).

Dentre os diversos fármacos constituintes do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, o meropenem é um dos únicos que demonstra capacidade inibitória para as enzimas da via alternativa mesmo que em alta concentração (Hugonnet *et al*, 2016). Devido a este fator, o meropenem foi escolhido como ligante para as enzimas YcbB e PBP5

em um estado de cocrystalização com o objetivo de avaliar a importância da relação entre a sua estrutura e as enzimas, bem como de que maneira essa interação acontece e pode ser crucial para o entendimento e desenvolvimento de fármacos mais direcionados e específicos.

## **2. MODELAGEM MOLECULAR**

A modelagem molecular compreende aos métodos teóricos e abordagens computacionais utilizadas no estudo da estrutura e do comportamento das moléculas, que podem variar de pequenos sistemas químicos a grandes moléculas biológicas ordenados pelas leis físicas que regem os átomos e moléculas (Drews, 2000). Uma das maiores contribuições relacionadas à modelagem molecular é a elucidação das interações que permeiam as moléculas em grau atômico, devido a isto é possível representar e estudar reações químicas, manipular estruturas e compreender os mecanismos envolvidos na interação entre ligante-receptor (Kuntz, 1992).

A compreensão da dinâmica envolvendo as interações moleculares torna possível a aplicação de diversas ferramentas no campo da biologia estrutural, como é o caso do processo de desenvolvimento de novos medicamentos. Esta área do conhecimento comumente se beneficia da modelagem molecular, pois os recursos como tempo e custos são otimizados, os resultados apresentam excelente acurácia, e conseqüentemente as chances de sucesso farmacológico são elevadas (Barreiro *et al*, 1997).

Dentro do contexto da modelagem molecular, a escolha da metodologia computacional vai depender de fatores como: a complexidade do sistema, que tipos de informações são almejadas, qual a qualidade dos recursos disponíveis tais como poder computacional e o limite de custos (Mendiata-moreno *et al.*, 2015). Estes métodos vão variar essencialmente quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados e podem ser

categorizados em métodos da mecânica molecular, *ab initio* e semi-empíricos (Barreiro *et al*, 1997).

Os métodos envolvendo mecânica molecular se baseiam na visão clássica que calculam a estrutura e energia da molécula levando em consideração o movimento do núcleo, assumindo que os elétrons possuem uma distribuição ótima, uma vez que a posição do núcleo é conhecida. Neste caso, o campo de força empregado é constituído pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema como distâncias de ligação, ângulos de ligação, distâncias de van der Waals e ligações hidrogênio. Neste tipo de abordagem, uma das maiores vantagens é a velocidade de processamento na avaliação de sistemas moleculares complexos (Barreiro *et al*, 1997).

Os métodos em mecânica quântica, também conhecidos como *ab initio*, permitem maior precisão nos resultados, além de fornecerem dados sobre a estrutura eletrônica, que não é considerada na mecânica molecular. A utilização desta metodologia no presente estudo através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês Density Functional Theory) tem o intuito de calcular as propriedades dos sistemas a partir da resolução da equação de Schrödinger, fundamentada pelo teorema de Kohn-Sham que permite a determinação do número total de elétrons e determina o potencial externo através da obtenção da densidade eletrônica do sistema (Custodio; Custostio; Creatto, 2012). A utilização da DFT favoreceu o desenvolvimento de estratégias computacionais com o objetivo de obter as energias, estrutura e propriedades de átomos e moléculas com um custo computacional relativamente baixo (Sgrignani; Magistrato, 2013).

Os métodos semi-empíricos são baseados no mesmo formalismo dos métodos *ab initio* com adição do ajuste na parametrização para dados experimentais, e como consequência, é possível obter resultados com acuracidade química elevada e alta velocidade dos métodos de orbitais moleculares (DEWAR *et al*, 1985)

As diversas possibilidades dentro do universo da modelagem molecular nos permitem acessar um potencial magnífico que vai desde a compreensão dos mecanismos básicos das moléculas até a elaboração de fármacos que possam atuar com eficácia nestes processos.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A parede celular desempenha funções de vital importância para a sobrevivência da célula bacteriana. Devido a isto, enzimas responsáveis pela síntese de peptidoglicano se tornam excelentes alvos farmacológicos.

Atualmente contamos com um número limitado de fármacos que visam a inibição da síntese da parede celular, aliada a essa deficiência, as bactérias apresentam a capacidade de performar sob condições de pressão seletiva, lançando mão de mecanismos de adaptações que driblam os fármacos, culminando para a sobrevivência celular e propagação do mecanismo de resistência.

A enzima YcBb é um exemplo de componente chave que, pressionado pelo estresse celular causado pelos  $\beta$ -lactâmicos, atua em uma via alternativa na biossíntese do peptidoglicano. A partir do desenvolvimento deste mecanismo e conseqüentemente o progresso da produção da parede celular, a bactéria consegue evadir a ação de boa parte do repertório farmacológico resultando na sobrevivência da bactéria. Entretanto, alguns fármacos da classe dos carbapenêmicos, como o Meropenem, apresentam poder inibitório contra a YcbB e podem ter sucesso em bloquear sua atividade.

Ao considerar a situação epidemiológica, a escassez de novos fármacos com alta especificidade, e a constante adaptabilidade das bactérias em relação ao stress seletivo causado pelos antimicrobianos, se torna evidente a necessidade de colocar foco no avanço da ciência na direção de soluções mais rápidas e mais assertivas. A urgência silenciosa de um bom plano de contenção para uma nova pandemia é ensurdecador. A partir desta percepção, o uso de métodos da Mecânica Quântica

podem nos trazer um excelente ângulo a se explorar no estudo de novas abordagens farmacológicas.

A ideia central deste trabalho é avaliar, mapear e descrever como interage o complexo formado pela YcbB - a enzima responsável pelo mecanismo alternativo; o meropenem - um dos poucos fármacos capazes de inibir YcbB; e PBP5 - que interage tanto com o meropenem quanto com a YcbB. A compreensão deste mecanismo pode esclarecer os aspectos necessários para o design de novos fármacos mais específicos e potentes. Em acordo com isso, a simulação quântica utilizando DFT, torna possível a avaliação dos aspectos moleculares desta interação, mostrando ser uma grande ferramenta no avanço de soluções contra o problema da resistência bacteriana.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho é apresentar e descrever um panorama das interações quânticas do complexo L,D Transpeptidase YcBb, PBP5 e Meropenem. Desta forma, identificar e avaliar os resíduos de maior importância bem como as singularidades que envolvem o complexo fármaco-proteína.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar as energias de interação entre os resíduos das proteínas responsáveis pela biossíntese da parede celular e o seu inibidor, o fármaco meropenem
- Descrever, com base na Teoria da Densidade Funcional (DFT), as interações mais importantes entre os complexos avaliados, caracterizando os tipos de interação que acontecem e avaliá-los de acordo com a sua importância.
- Realizar uma comparação dos dados obtidos com os dados descritos na literatura

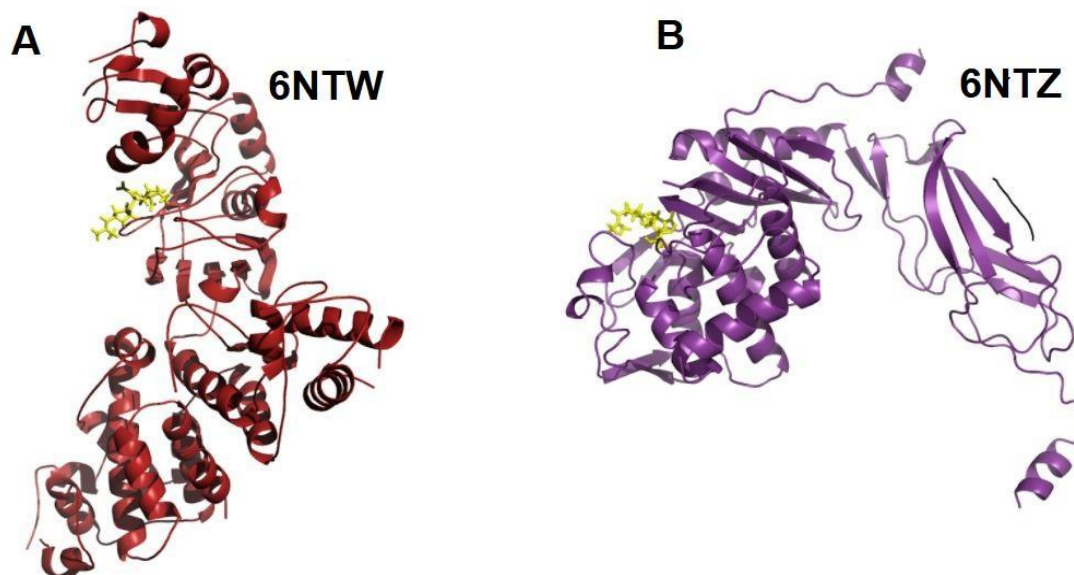
## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS CRISTALINAS

A análise das estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas permite uma compreensão profunda da função da proteína e o seu funcionamento interno. A disponibilidade de estruturas com resoluções atômicas torna esta abordagem uma ferramenta valiosa dentro da biologia moderna (Dessau; Modis, 2011).

A primeira etapa do processo de análise é a obtenção das estruturas cristalográficas realizada através do acesso e busca no banco de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank (RCSB/PDB)* que disponibiliza de forma gratuita para a comunidade científica uma grande variedade de cristais. Neste trabalho, as estruturas utilizadas para análise, pode ser encontradas sob os códigos (resolução) 6NTW (2.76 Å), que compreende a estrutura tridimensional da proteína YcbB cocrystalizada com o meropenem (Figura 5.1 A), e 6NTZ (2.20 Å), estrutura tridimensional do complexo formado entre a PBP5 e o meropenem (Figura 5.1, B) (Cavaney *et al*, 2019)

Figura 5.1: Estruturas cristalográficas das enzimas A) YcbB cocrystalizada com o ligante Meropenem (amarelo) sob o código 6NTW b) PBP5 cocrystalizada com o ligante Meropenem (amarelo) sob o código 6NTZ



Fonte: Figura elaborada pela autora

Em posse desta informação, o processo de otimização é iniciado como uma etapa pré-analítica que visa o aprimoramento das estruturas cristalinas, no qual há adições de átomos de hidrogênio e cadeias laterais de aminoácidos omitidos em consequência das limitações do processo de difração de raio X, desta forma, proporcionando uma estrutura mais aprimorada para análise. Nesta etapa, a utilização do campo de força clássico CHARMM (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics) é imprescindível, em virtude da sua capacidade em descrever processos moleculares orgânicos com exatidão (Momany; Rone, 1992).

## 5.2 MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPAS CONJUGADAS

O fracionamento molecular com capas conjugadas (MFCC) é um método cujo objetivo é fracionar, a nível molecular, as energias de interação entre moléculas para obter a energia total do complexo através das somas das energias individuais. (Zhang; Zhang, 2005). De forma simplificada, esse processo ocorre de maneira que a porção da proteína que interage com o fármaco seja mapeada, fracionada e analisada levando em consideração os valores energéticos da interação. (Bezerra *et al*, 2019).

O método consiste em dividir virtualmente a proteína a partir de rupturas nas ligações peptídicas visando isolar o aminoácido de interesse, logo após esta quebra ocorre a adição das capas, onde antes existiam as quebras. As capas são os aminoácidos anterior e posterior ao aminoácido de interesse, e esta adição se justifica na necessidade de preservar das propriedades da ligação de valência, e na medida do possível, a mimetização do ambiente protéico em torno da porção fragmentada (Zhang; Zhang, 2003)

Os componentes envolvidos na análise da energia são decompostos em **L** se referindo ao ligante, **R<sub>i</sub>** representando resíduo de aminoácido e **C** para capas conjugadas na seguinte equação:

$$EI (L - R_i) = E (L + C_{1-i} R_i C_{i+1}) - E (L + C_{1-i} C_{i+1}) - E (C_{1-i} R_i C_{i+1}) + E (C_{1-i} C_{i+1})$$

Eq.(1)

O primeiro termo,  $E(L + C_{1-i} R_i C_{i+1})$ , se refere a energia total do sistema formado pelo ligante, resíduos e capas ; o segundo termo,  $E(L + C_{1-i} C_{i+1})$ , é a energia total do sistema formado pelas capas e pelo ligante. Além disso, o terceiro termo,  $E(C_{1-i} R_i C_{i+1})$ , é a energia total do resíduo com as capas, enquanto o quarto e último,  $E(C_{1-i} C_{i+1})$ , é a energia das capas.

Após a etapa de fragmentação, a realização dos cálculos de energia foi realizada através do *software* Gaussian (G09), dentro do formalismo da DFT, utilizando o modelo de gradiente de aproximação generalizado (GGA) com o funcional de densidade com correção de dispersão associado do tipo B97D e o conjunto de bases cc-pvtz (Grimme, 2006).

Outro fator importante a ser levado em consideração é o ambiente eletrostático do qual aquela proteína faz parte e como isso pode influenciar as moléculas envolvidas no complexo (Cossi *et al*, 2003). Para representar o ambiente em torno do fragmento com maior acurácia, os resultados foram obtidos usando modelo com constante dielétrica  $\epsilon$  igual a 20 e 40.

Para garantir que todas as ligações importantes sejam avaliadas, foi estabelecido um limite para o número de resíduos de aminoácidos a serem investigados através da criação de esferas imaginárias a partir do bolsão de ligação, contendo dentro delas todos os aminoácidos que estão a uma distância específica do ligante. À medida que os raios vão se distanciando do bolsão de ligação, é possível notar um padrão de decréscimo de energia de interação condizente com a relevância dos aminoácidos para aquela ligação.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como previamente exposto, a proteína YcbB é a enzima que catalisa a reação de transpeptidação do peptidoglicano durante o desvio da biossíntese da parede celular em situações de estresse, como o causado pelos antibióticos. Associada a PBP5, formam um complexo de resistência que viabiliza a sobrevivência da célula, mesmo na presença da maior parte do arsenal de  $\beta$ -lactâmicos disponível. Entretanto, existem evidências que alguns exemplares da classe dos carbapenêmicos, como o meropenem, possuem potencial inibitório neste complexo (Hugonnet *et al*, 2016).

A expansão do conhecimento em torno desta dinâmica de interação estrutural e molecular no complexo proteína-fármaco pode elucidar os fatores que levam ao mecanismo de resistência e as características peculiares que levam à inibição ocasionada pelo meropenem. Diante da aquisição destas informações, é possível dar um passo em direção às melhores alternativas farmacológicas.

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CRISTALOGRAFICOS

As interações moleculares ocorrem em pH específico e podem tolerar pequenos desvios em torno dele, por esta razão o conhecimento detalhado da natureza dos estados físicos das proteínas e seus ligantes permite a obtenção de resultados confiáveis. Quando submetido ao pH cristalográfico de 7,5 o meropenem apresenta cargas +1 e -1, gerando em uma conformação geral neutra.

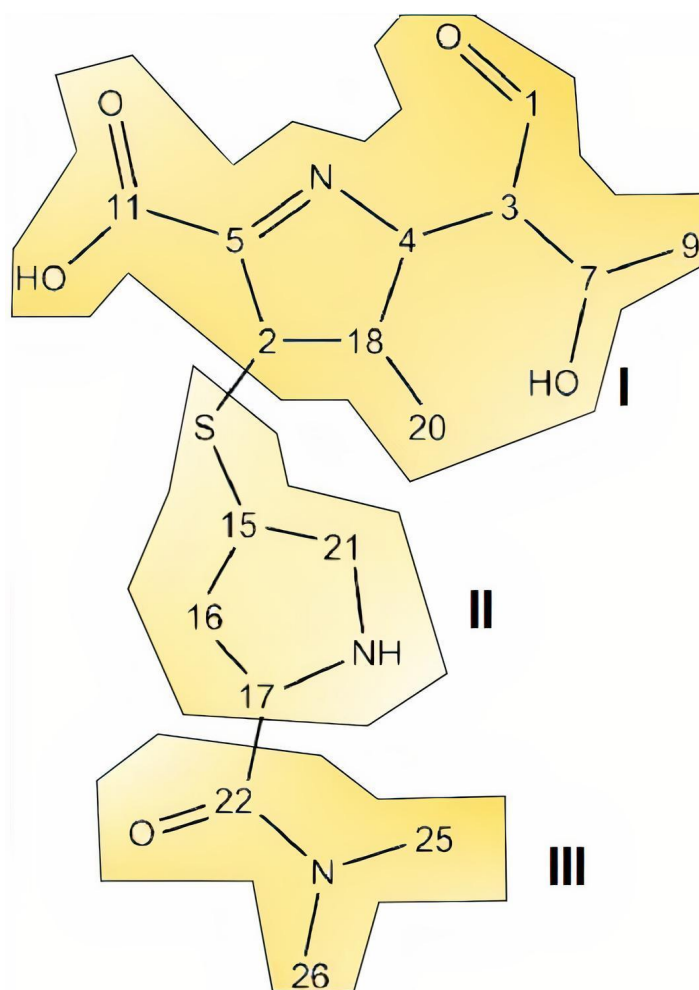
Para uma melhor visualização dos aspectos estruturais e posterior descrição das interações moleculares, o meropenem foi submetido a uma fragmentação virtual que levou em consideração os grupamentos funcionais ligados à função biológica do fármaco (Figura 6.1). As três divisões compreendem as regiões I, II e III.

Na região I, encontra-se o anel  $\beta$ -lactâmico, responsável pela alta afinidade para proteínas de ligação às PBPs. A região II está associada ao espectro antibacteriano ultra-ampla e fornece ao meropenem uma vantagem a bactérias

gram-negativas. Na região III, é possível verificar o radical responsável pela diferenciação entre o meropenem e os outros fármacos do grupos dos carbapenêmicos (Figura 6.1) (Drusano *et al*, 1997).

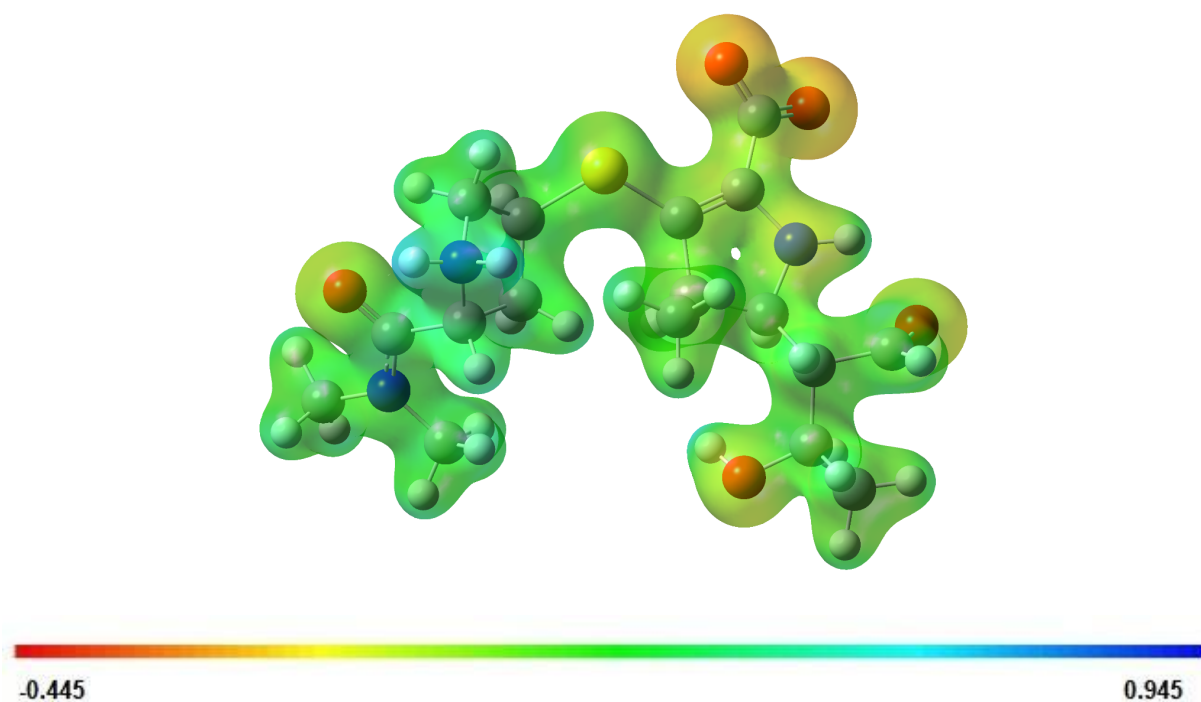
Quanto ao potencial eletrostático que está representado na figura 6.2 é possível notar que o meropenem apresenta, de maneira global, uma característica mais eletropositiva (verde). Porém há algumas pequenas áreas que apresentam uma característica levemente mais eletronegativas (vermelho) em comparação aos outros átomos da estrutura devido a presença de oxigênios.

Figura 6.1: Ligante meropenem subdividido em regiões funcionais: região I promove alta afinidade para proteínas de ligação às PBPs, região II associada ao espectro antibacteriano ultra-amplio e região III relaciona-se ao radical meropenem.



Fonte: Figura elaborada pela autora

Figura 6.2: DFT projetada em uma isosuperfície de potencial eletrostático



Fonte: Figura elaborada pela autora

## 6.2 ENERGIA TOTAL DA LIGAÇÃO E CONVERGÊNCIA

Toda interação que ocorre entre uma proteína e um fármaco requer energia, e esse dado pode ser medido e qualificado. Os aminoácidos responsáveis pelas interações mais fortes podem ser analisados, e um mapeamento do sítio ativo quanto à afinidade, atratividade e repulsão podem ser demonstrados de forma eficiente com as ferramentas adequadas.

Para analisar a energia total do complexo é necessário segmentá-lo e avaliar individualmente cada resíduo, percebendo não apenas o valor energético destas interações, mas as especificidades das forças por trás desta energia. Desta forma,

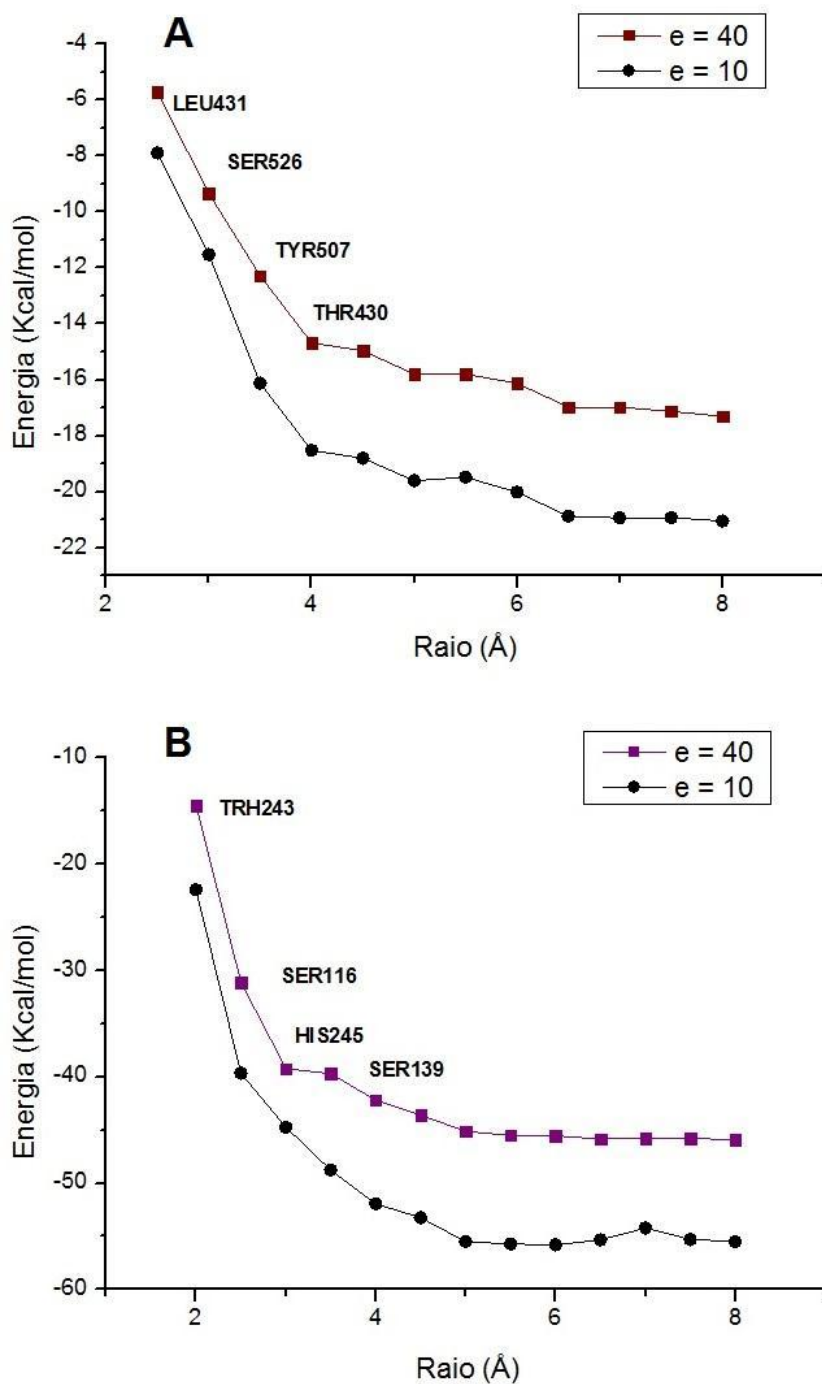
é possível identificar quais aminoácidos contribuem mais expressivamente e quais são menos importantes no contexto de interação entre as moléculas do complexo.

De acordo com este princípio, ao analisar individualmente as interações de cada aminoácido pode-se incorporar suas energias e assim obter o valor total da energia de ligação. Para complexo Ycb-Meropenem, 38 aminoácidos foram avaliados, obtendo a energia total de -17,58 Kcal/mol, enquanto que no complexo PBP5-meropenem, a contribuição energética foi proveniente de 42 aminoácidos com valor de energia de -45,84 Kcal/mol.

Os aminoácidos mais próximos à região de interação com o fármaco possuem valores energéticos mais altos, à medida que os aminoácidos se distanciam deste bolsão existe uma tendência natural a diminuir a energia. Em um dado momento, esta variação energética entre raios não ultrapassa o valor de 10%, fenômeno chamado de convergência. A convergência acontece em distâncias específicas para cada complexo proteína-ligante. Neste estudo, tanto o complexo YcbB-Meropenem quanto o PBP5-Meropenem atingiram o critério de convergência a partir do raio 5 Å (Figura 6.3, A e B respectivamente).

Utilizando os resultados provenientes da análise dos resíduos calculados levando em consideração a constante dielétrica igual a 40 ( $\epsilon = 40$ ) foi possível avaliar características próprias dos aminoácidos, suas contribuições energéticas, as distâncias e os tipos de interações. A escolha desta constante para a análise de dados se justifica na sua capacidade de representar o ambiente solvatado proteico com melhor estabilidade promovendo maior acurácia no valores das energias de interação quando comparadas a valores mais aproximados do vácuo (Ryde;Soderhjelm, 2016).

Figura 6.3: Gráfico de convergência contendo aminoácidos relevantes para o montante energético A) complexo YcbB-Meropenem B) complexo PBP5-Meropenem



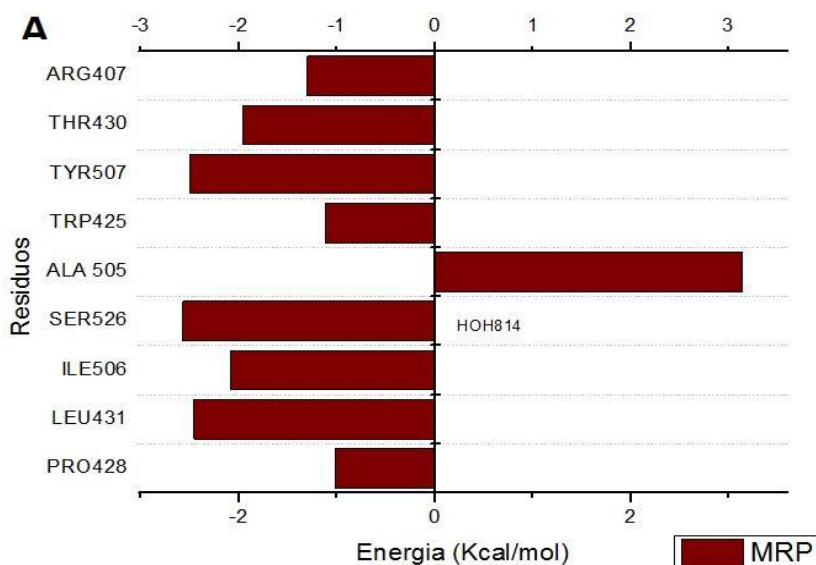
Fonte: Figura elaborada pela autora

### 6.3 ENERGIA E INTERAÇÕES DOS PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS DO COMPLEXO YCBB - MEROPENEM

Os aminoácidos são as unidades básicas de uma proteína que devem estar dispostos na ordem correta para que a proteína seja enovelada de maneira apropriada e desempenhe sua função sem intercorrências. Além disso, cada aminoácido tem sua peculiaridade estrutural, polaridade e potencial de formar interações intermoleculares (Bröer; Bröer, 2017).

Dada as características inerentes dos aminoácidos e sua capacidade de realizar interações, neste estudo foram analisados resíduos do complexo YcBb-Meropenem, dentre eles, os que se revelaram mais energeticamente relevantes (figura XXX) foram os seguintes SER526 (-2,57 Kcal/mol) > TYR507 (-2,50 Kcal/mol) > LEU431(-2.46Kcal/mol) > ILE506 (-2,09 Kcal/Mol) > THR430 (-1,96 Kcal/mol) > ARG407 (-1,30 Kcal/mol) > TRP425 (-1,12 Kcal/mol) > PRO428 (-1,02 Kcal/mol) (figura 6.4) Todos se ligaram aos grupamentos presentes na região I.

Figura 6.4: Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das interações YcbB-Meropenem em vermelho.



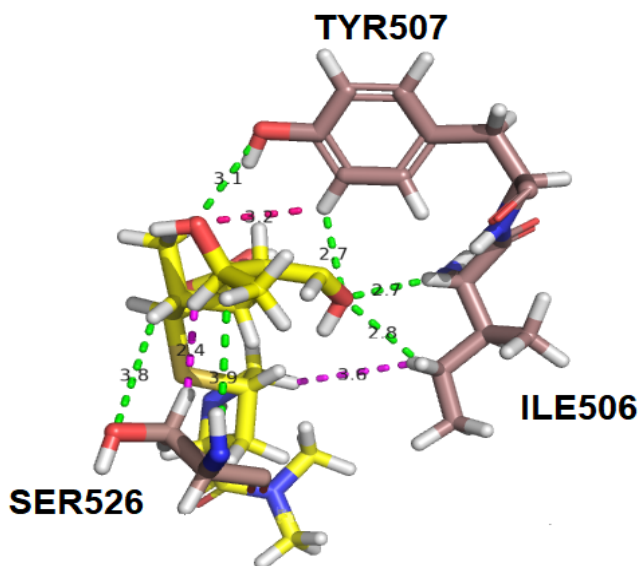
Fonte: Figura elaborada pela autora.

O resíduo que se destacou por apresentar maior energia de interação com o ligante foi a Ser526 ( -2,57 Kcal/mol) no raio 2,5 Å interagindo com a região I do ligante através de ligações de hidrogênio não convencional (em verde) e dipolo-induzido (em rosa) como pode ser visto na Figura 6.5.

A ligação de hidrogênio desempenha papel na estabilização das moléculas do complexo, o que torna a análise deste tipo de interação de grande valia para a pesquisa farmacêutica (Guzmán-Afonso *et al*, 2019).

O aminoácido Tyr507 ( -2,50 Kcal/mol) no raio 3 Å, foi o resíduo que apresentou a segunda maior energia de interação. De acordo com NA Cavaney, este resíduo apresenta grande importância no processo de acetilação e desacetilação da enzima, pois fica situada no interior do sítio ativo e atua reduzindo a energia de ativação necessária para reação por estabilizar o estado de transição do mecanismo. Desta forma, favorece a função enzimática. Outro resíduo considerado importante é o Ile506 que por meio de ligações de hidrogênio não convencionais favorece a estabilização do complexo (Cavaney *et al*, 2019). As contribuições energéticas são provenientes principalmente de ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e dipolo induzido (rosa) (Figura 6.5)

Figura 6.5: Aminoácidos Ser526, Tyr507 e Ile506 da proteína YcbB interagindo com a porção do ligante meropenem através de ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e interações do tipo dipolo-induzido (rosa) .



Fonte: Figura elaborada pela autora

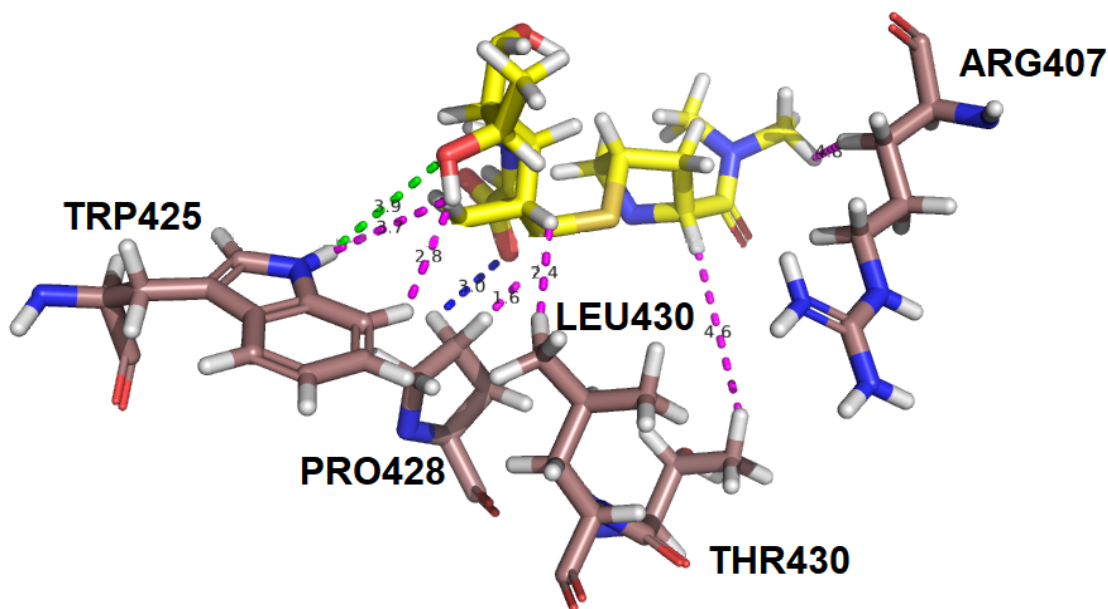
Os resíduos Leu431 (-2.46Kcal/mol), Trp425 (-1.12Kcal/mol), Pro428 (-1.02Kcal/mol) agem estabilizado o complexo através da formação de um bolsão apolar a partir de ligações hidrofóbicas que se liga ao C1 do grupo metil no meropenem. A Leu431 interage com o meropenem majoritariamente através de dipolo-induzido (rosa) (Figura 6.6). Enquanto que o Trp425 apresenta certo grau de influência na redução do pKa do Tyr507, através da interação com a Lys497 dentro do sistema (Cavaney *et al*, 2019). A sua interação com o meropenem se dá por meio de ligações de hidrogênio não convencionais (em verde) e dipolo-induzido (rosa) (Figura 6.6).

O resíduo Pro428 está envolvido na formação de uma crista estrutural que evita interação significativa entre os grupos eletropositivos, entre eles a Arg407 (-1.30Kcal/mol) que contribui para a base molecular do mecanismo com baixa

sensibilidade da YcbB por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos clássicos. A Pro428 interage com o meropenem através de interações dipolo induzido e íon dipolo com O'13 protonado do meropenem (Figura 6.6 ) (Cavaney *et al*, 2019).

Através de interações do tipo dipolo induzido, especificamente conhecidas como dispersão de London, a Arg407 contribui energeticamente para a afinidade do complexo. Quanto às intensidades, as Forças de Dispersão de London vão depender da polarizabilidade, do tamanho e da forma espacial da molécula, sendo que moléculas mais polarizáveis têm forças de dispersão de London mais fortes. (Figura 6.6) (Rocha, 2001).

Figura 6.6: Aminoácidos Trp425, Arg407, Pro428, Thr430 e Leu430 proteína YcBb interagindo com a porção do ligante meropenem através de dipolo induzido (rosa) e ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e íon dipolo com O'13 protonado do meropenem (azul).



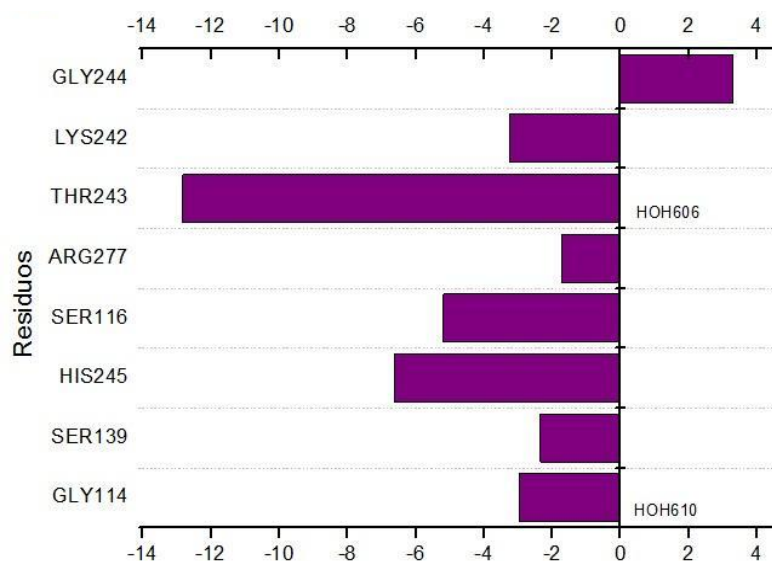
Fonte: Figura elaborada pela autora

#### 6.4 COMPLEXO PBP5 - MEROPENEM

A PBP5 é uma enzima multifacetada, possui atividade DD-carboxipeptidase necessária para manter a morfologia celular normal e grau de reticulação do peptidoglicano. Além disso, possui atividade de  $\beta$ -lactamase suficiente para contribuir para a capacidade de resistir à atividade antibiótica dos  $\beta$ -lactamas (Smith *et al*, 2013). Com essas competências, a PBP5 se alia à capacidade enzimática da YcbB e seus mecanismos de resistência intrínsecos para criar um complexo que tem como resultado a resistência e restauração da manutenção da célula bacteriana que evade com relativa facilidade a ação farmacológica (Cavaney *et al* 2019).

Uma análise contendo 68 aminoácidos do complexo PBP5-Meropenem demonstraram que os aminoácidos com maior relevância energética foram THR243 (-12,82 Kcal/mol) > HIS245 (-6,63 Kcal/mol) > SER116 (-5,20 Kcal/mol) > LYS242 (-3,25 Kcal/mol) > GLY114 (-2,98 Kcal/mol) > SER139 (-2,35 Kcal/mol) também se relacionando com átomos das estruturas presentes na região I. Estes resíduos estão representados na Figura 6.7

Figura 6.7: Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das interações PBP5/Meropenem em roxo



Fonte: Figura elaborada pela autora

Dentre os resíduos com maior relevância no complexo PBP5-Meropenem, o Thr243 obteve a maior contribuição energética. As interações intermoleculares que corroboram com esses dados esclarecem a origem das energias provenientes de interações com o meropenem do tipo ligação de hidrogênio e formação de íon-dipolo (Figura 6.8)

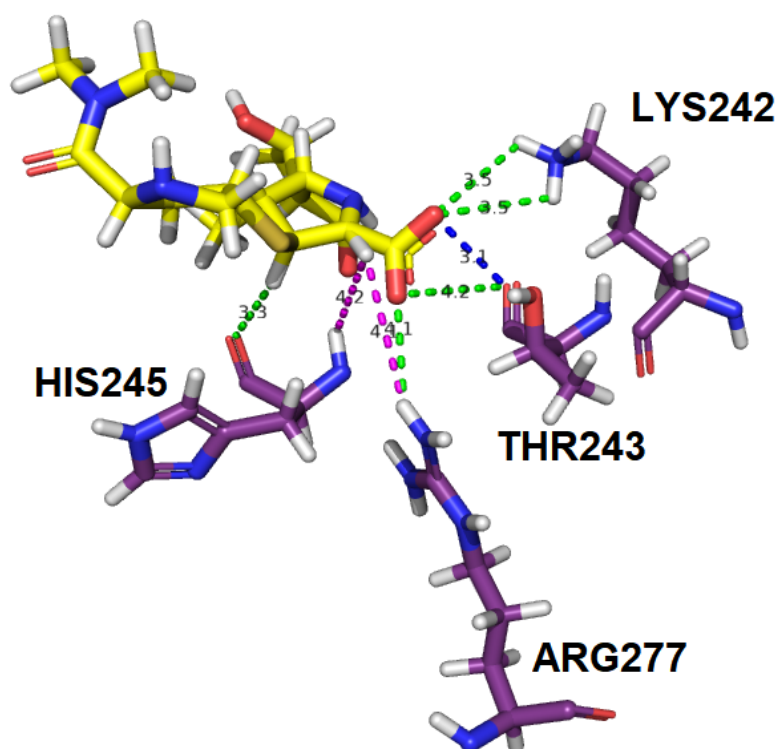
Os dipolos são criados dentro da molécula por certos átomos que distorcerem a nuvem eletrônica das mesmas, por serem mais eletronegativos que os outros que estão ligados, gerando interações do tipo íon-dipolo consideradas uma interação forte (Seribeli, 2019).

A estabilização do Thr243 no complexo ocorre através de interações eletrostáticas de longo alcance com o amido da cadeia lateral de Lys242 bem como o grupo guanidínio de Arg277 e também interagem com o meropenem através de ligações de hidrogênio (Figura 6.8)

Como segundo exemplar mais energético, o resíduo His245 estabelece interações com o meropenem através de interação do tipo dipolo induzido e ligações de hidrogênio que polarizam e estabilizam a carbonila durante a acilação e formação de intermediários (Figura 6.8) (Cavaney *et al*, 2019).



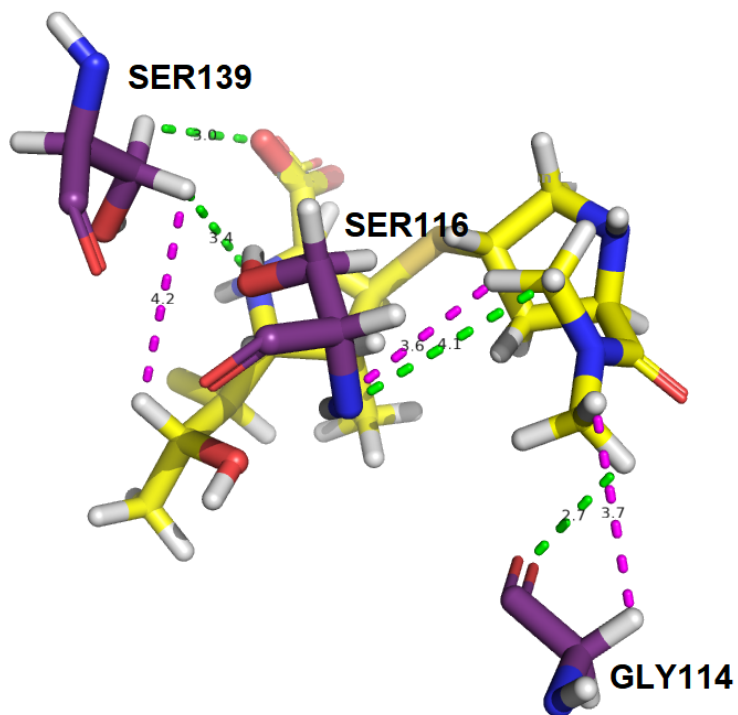
Figura 6.8: Aminoácidos Thr243, Lys242, Arg277 e His245 pertencentes a PBP5 interagindo com o meropenem de forma típica às PBPS, através de ligações de hidrogênio (em verde), íon-dipolo (em azul) e dipolo induzido (em rosa).



Fonte: Figura elaborada pela autora.

A Gly114 e Ser116 compõe junto com os resíduos relevantes uma rede eletrostática que permite a melhor acomodação do meropenem no bolsão de ligação. Enquanto o resíduo Ser139 participa das etapas enzimáticas de acetilação e desacetilação através de um ataque nucleofílico no substrato do pentapeptídeo. (Cavaney *et al*, 2019). As principais interações intermoleculares que envolvem estes resíduos são ligações de hidrogênio não convencionais e dipolo induzido (Figura 6.9).

Figura 6.9: Aminoácidos Gly11, Ser116 e Ser139 pertencentes a PBP5 interagindo com o meropenem de forma típica às PBPS, através de ligações de hidrogênio não convencionais (em verde) e dipolo induzido (em rosa)



Fonte: Figura elaborada pela autora

## 7.CONCLUSÃO

Durante o estresse causado por antibióticos, as bactérias podem desenvolver a habilidade de se remodelar e resistir ao efeito farmacológico. Em *E. coli*, o mecanismo de readaptação aos estímulos externos ocorre via sinalização de alarmona, que inicia o processo de recrutamento e ativação das enzimas necessárias para a manutenção da síntese da parede celular. A enzima YcbB é recrutada e associada às PBP1b/PBP5 por meio do seu domínio de sustentação se ligando a regiões apolares nas PBPS. Juntas, são capazes de retomar o processo de síntese da parede celular, bem como criar resistência aos fármacos beta-lactâmicos (Egan; Errington; Vollmer, 2020)

Com a utilização de ferramentas de modelagem molecular foi possível investigar as interações entre as enzimas YcbB, PBP5 e o fármaco meropenem. Desta forma, obtivemos os resultados energéticos dos resíduos mais relevantes para a atuação do complexo. Utilizando dados da literatura como linha mestra no desenvolvimento desta pesquisa, constatou-se a concordância dos resultados encontrados neste estudo com os previamente evidenciados em estudos experimentais.

A proteína YcbB foi extensivamente analisada, com o objetivo de mapear as suas regiões e resíduos mais importantes, além de criar um panorama molecular da interação entre seus resíduos e o meropenem. Neste complexo, foi observado a contribuição energética dos resíduos SER526 > TYR507 > LEU431 > ILE506 > THR430 > ARG407 > TRP425 > PRO42, com valor energético total de 17.58Kcal/mol.

O envolvimento da PBP5 no mecanismo de resistência também foi estudado, tendo em vista o seu papel vital para o desdobramento da sustentação da biossíntese do peptidoglicano. Para o complexo PBP5/Meropenem, 68 resíduos foram analisados, sendo que estes apresentaram valores mais significativos THR243 > HIS245 > SER116 > LYS242 > GLY114 > SER139.

As bactérias são microrganismos capazes de implementar vias flexíveis para evitar o ataque dos antibióticos utilizando uma série de complexos multiproteicos dinâmicos e variáveis e à medida que entramos em uma era considerada alarmante do ponto de vista de resistência bacteriana, estudos que facilitem o entendimento dos complexos biossintéticos de PG não canônicos são cada vez mais necessários.

Estudos *in silico*, como este, auxiliam o processo de desenvolvimento de novos fármacos na fase de fundamentação teórica pois fornecem todo o arcabouço molecular no que se refere às interações intermoleculares e seus valores energéticos. Desta forma, o novo fármaco pode ser desenvolvido a partir de uma perspectiva racional.

Para estudos posteriores, um objetivo almejado será entender o papel regulatório e interações das sintetases de peptidoglicano e todo o arsenal proteico relacionado a morfogênese celular que resultam na expansão segura do peptidoglicano mesmo em situações de estresse.

## REFERÊNCIAS

ADEDEJI, W.A. *et al* "THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS." **Annals of Ibadan postgraduate medicine**, 14(2), 56-57, 2016.

ALIASHKEVICH, A; CAVA, F. LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. **FEBS J**. DOI: 10.1111/febs.16066 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34109739/> Acesso em: 15/07/2021

ANDRADE, L. N; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. **J Infectious control**. 6(1), 2017.

ANDRADE, L. N; DARINI, A. L. C. Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. **J Infectious control**. 7(3), 2018.

BARREIRO, E. J. *et al*. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, 20(3), 300–310, 1997.

BEZERRA, K.S. *et al*. Ribosomal RNA–Aminoglycoside Hygromycin B Interaction Energy Calculation within a Density Functional Theory Framework **The Journal of Physical Chemistry** 123 (30), 6421-6429, 2019

BIARROTTE-SORIN S. *et al*. Crystal structure of a novel beta-lactam-insensitive peptidoglycan transpeptidase. **J Mol Biol**. 9;359(3):533-8, 2006.

BRÖER .S; BRÖER A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. **Biochem J**. 474(12):1935-1963, 2017.

BROWN, C. *et al*. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. **Nature** 523, 208–211, 2015.

BROWN, L. *et al*. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nat Rev Microbiol** 13, 620–630, 2015.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. São Paulo: **Artmed**, 2012.

CABEEN, M. T, JACOBS-WAGNER C. Bacterial cell shape. **Nat Rev Microbiol.** 3(8), 601-10, 2005.

CAVANEY, N. A. *et al.* Structural and Cellular Insights into the I,d-Transpeptidase YcbB as a Therapeutic Target in *Citrobacter rodentium*, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Typhi Infections. **Antimicrob Agents Chemother.** 20;65(2), e01592-20, 2021

CAVANEY, N.A. *et al.* Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. **Nat Commun**, 10, 1849, 2019.

COSSI, M. *et al.* Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. **J Comput Chem** 24 (6), 669-681, 2003

CUSTÓDIO, R; CUSTÓDIO, M. R; CREATTO, E. Resolvendo a equação de Schrödinger utilizando procedimentos numéricos fundamentais **J Educação • Quím. Nova** 35 (10), 2012.

DESSAU, M. A.; MODIS, Y. Protein crystallization for X-ray crystallography. **J Vis Exp.** 16(47), 2285, 2011.

DEWAR, M.J.S. *et al* . AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **J. Am. Chem. Soc.**107, 3902-3909, 1985

DOMINGUES, L. *et al.* Mecanismos de resistência aos antibióticos betalactâmicos pelos *Staphylococcus aureus*. **Revista Multidisciplinar em Saúde.** 2 (3), 44, 2021.

DREWS, I I. Drug discovery today - and tomorrow. **Drug Discov Today.** 5(1), 2-4, 2000

DRUSANO, G. Meropenem: laboratory and clinical data, **Clinical Microbiology and Infection.** 3, 4, 1997.

EGAN, A.J.F.; ERRINGTON, J.; VOLLMER, W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. **Nat Rev Microbiol** 18, 446–460, 2020.

ELSHAMY, A.A.; ABOSHANAB, K.M. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. **Future Sci OA**. 6(3), FSO438, 2020

FOULADKHAH, A.C.; THOMPSON, B.; CAMP, J.S. The Threat of Antibiotic Resistance in Changing Climate. **Microorganisms**. 8, 748. 2020

FREEMAN, M.C. *et al.* The impact of sanitation on infectious disease and nutritional status: A systematic review and meta-analysis MC Freeman *et al* **International Journal of Hygiene and Environmental Health** 220(6), 928-949, 2017

GRIMME S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. **Journal of computational chemistry**, vol.30, n.27, p.1787-99, 2006

GUZMÁN-AFONSO, C. *et al.* Understanding hydrogen-bonding structures of molecular crystals via electron and NMR nanocrystallography. **Nat Commun** 10, 3537, 2019.

HUGONNET, J.E. *et al.* Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli*. **ELife** 5, 1–22, 2016.

KUNTZ, I. Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. **Science** 257, 5073, 1078-1082, 1992

LECOQ, L. Structure of Enterococcus faecium L,D-transpeptidase acylated by ertapenem provides insight into the inactivation mechanism. **ACS Chem Biol** 8(6),1140-6, 2013

LIMA, L.M. *et al.*  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective, **Eur J Med Chem**, 208, 112829, 2020

LISA M.N. *et al.* A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- $\beta$ -lactamases. **Nat Commun** 8, 538, 2017.

LOBONOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **Yale J Biol Med**. 90(1), 135-145, 2017

LOVE, M.J. *et al.* Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care. **Antibiotics**. 7, 17, 2018

LOVERING, A.L.; SAFADI, S.S.; STRYNADKA, S.C.J. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly, **Annual Review of Biochemistry** 81, 451-478, 2012

LUEPKE, K.H. *et al.* Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy**. 37(1),71-84, 2017.

MAINARDI, J. *et al.* A Novel Peptidoglycan Cross-linking Enzyme for a  $\beta$ -Lactam-resistant Transpeptidation Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 280(46), 38146-38152, 2005.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; CALVO, J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual [The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. 28(52), 25-31, 2010

MENDIETA-MORENO J.I, *et al.* Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Free Energy Maps and Nonadiabatic Simulations for a Photochemical Reaction in DNA: Cyclobutane Thymine Dimer. **J Phys Chem Lett**. 3;7(21), 4391-4397, 2016.

MOMANY, F.A.; RONE, R. Validation of the general purpose QUANTA 3.2/CHARMm force field JOOC 13(7), 888–900, 1992

MONTEALEGRE M.C. *et al.* Differential Penicillin-Binding Protein 5 (PBP5) Levels in the Enterococcus faecium Clades with Different Levels of Ampicillin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(1), 2016

NADIMPALLI, M.L., CHAN C.W. & DORON, S. Antibiotic resistance: a call to action to prevent the next epidemic of inequality. **Nat Med** 27, 187–188, 2021.

NELSON, D. E., & YOUNG, K. D. Contributions of PBP 5 and DD-Carboxypeptidase Penicillin Binding Proteins to Maintenance of Cell Shape in Escherichia coli. **Journal of bacteriology.** 183, 3055-64, 2001.

NELSON, D. E., & YOUNG, K. D. Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of Escherichia coli. **Journal of bacteriology,** 182(6), 1714–1721. 2000

NICHOLAS R.A. *et al.* Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from Escherichia coli: implications for deacylation of the acyl-enzyme complex. **J Biol Chem.** 278(52), 52826-33, 2003

OTTEN C. *et al.* *Mol Microbiol.* 107(2), 142-163, 2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários [Internet]. Genebra: OMS; 2017. Acesso em: 03 de maio de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/75/en>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis, [Internet]. Genebra: OMS; 2020. Acesso em: 12 de Abril de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>

PATERSON, D. Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. **Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition**. 2. 1874-1877, 2011

PORFÍRIO, S.; CARLSON, R.W.; AZADI, P. Elucidating Peptidoglycan Structure: An Analytical Toolset. **Trends Microbiol.** 27(7), 607-622, 2019

RABELLO, R.F. *et al.* Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals** 2020, 10, 552

RADKOV, A.D. *et al.* **Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. Annu Rev Biochem.** 87, 991-1014, 2018

REX, J.H. *et al.* A comprehensive regulatory framework to address the unmet need for new antibacterial treatments. **The Lancet Infectious Diseases**, 13(3) 269-275, 2013

RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. em Victor Lorian, M. D. (Eds), **Antibiotics in Laboratory Medicine** New York 5, 441-476, 2005

RYDE, Ulf; SÖDERHJELM, Pär. Ligand-Binding Affinity Estimates Supported by Quantum-Mechanical Methods. **Chemical Reviews**, 116 (9), 5520-5566, 2016.

SALMON-ROSSEAU, A. *et al.* Comparative review of imipenem/cilastatin versus meropenem. **Med Mal Infect.** 50(4), 316-322, 2020.

SAUVAGE, E. *et al.* The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiol Rev.** 32(2), 234-58, 2008

SERIBELI, F.L. Interações Intermoleculares: o estado da arte da pesquisa em ensino e desenvolvimento de atividades práticas experimentais sobre o tema. **Scientia Vitae**, 7(23), 18-36, 2019.

SGRIDNANI J.; MAGISTRATO, A. First-principles modeling of biological systems and structure-based drug-design. **Curr Comput Aided Drug Des.**9(1),15-34, 2013

SMITH, J.D. Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in  $\beta$ -lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 57(7), 3137-46, 2013.

TOMASI, J; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical reviews** 105 (8), 2999-3094, 2005.

VAN HOEK AH. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Front Microbiol.** 2:203, 2011

WALTER, T. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 33(3),281-301, 2000

ZANDI, T. A.; CRAIG, A. Competing off-loading mechanisms of meropenem from an l,d-transpeptidase reduce antibiotic effectiveness. **PNAS.** 118 (27) e2008610118, 2021

ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein–molecule interaction energy. **The Journal of chemical physics** ,119(7), 3599-3605, 2003

ZHANG, D. W., & ZHANG, J. Z. Full quantum mechanical study of binding of HIV-1 protease drugs. **International journal of quantum chemistry**,103(3), 246-257, 2005

ZHOU C. *et al* Effects of two novel amino acid substitutions on the penicillin binding properties of the PBP5 C-terminal from *Enterococcus faecium*. **Mol Med Rep.** 12(4), 5281-5, 2015

ZHOU, H. X.; PANG, X. Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. **Chemical reviews**, 118(4), 1691–1741, 2018

## APÊNDICE A

Tabela A.1 – Valores energéticos dos resíduos da proteína YcbB que interagem com o ligante Meropenem, contendo raio de distância e águas envolvidas na interação

<b>6NTW Resíduos</b>	<b>Raio (Å)</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 40</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 10</b>	<b>H2O (Envolvidos na interação)</b>
PRO428	2,5	-1,02	-1.48	
LEU431	2,5	-2.43	-2.59	
GLU504	2,5	-0,72	-1.3	
ALA505	2,5	3,14	2.71	
ILE506	2,5	-2,09	-2.49	
SER526	2,5	-2,57	-2.75	HOH814
TRP425	3	-1,12	-1.09	
TYR507	3	-2,50	-2.55	
PRO429	3,5	-0,44	-0.63	
THR430	3,5	-1,96	-2.4	
ALA432	3,5	-0,06	-0.15	
ARG433	3,5	-0,36	-1.13	
LYS434	3,5	-0,12	-0.29	
ARG407	4	-1,30	-1.18	
SER525	4	-0,19	-0.22	
GLY527	4	-0,91	-1.01	
LEU493	4,5	-0,28	-0.28	
SER503	5	-0,06	-0.01	
<b>6NTW Resíduos</b>	<b>Raio (Å)</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 40</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 10</b>	<b>H2O (Envolvidos na interação)</b>
HIS509	5	-0,51	-0.42	

<b>ARG530</b>	5	-0,26	-0.37	HOH821
<b>PRO410</b>	5,5	-0,19	-0.11	
<b>VAL529</b>	5,5	0,19	0.23	
<b>LYS408</b>	6	-0,12	53	
<b>LYS497</b>	6	-0,21	-0.52	HOH802
<b>GLY403</b>	6,5	-0,05	-0.01	
<b>THR409</b>	6,5	-0,14	-0.14	
<b>ASN426</b>	6,5	-0,08	-0.09	
<b>VAL427</b>	6,5	-0,58	-0.69	
<b>LEU508</b>	7	-0,01	0.05	
<b>ARG404</b>	7,5	-0,08	-0.06	
<b>MET500</b>	7,5	-0,04	-0.02	
<b>SER502</b>	7,5	-0,01	0.04	
<b>LEU524</b>	7,5	-0,03	0	
<b>ILE401</b>	8	-0,03	0	
<b>VAL402</b>	8	-0,02	0.04	
<b>ASP406</b>	8	-0,11	-0.25	
<b>ASP435</b>	8	-0,00	0.11	
<b>SER492</b>	8	-0,02	-0.01	

Tabela A.2 – Valores energéticos dos resíduos da proteína PBP5 que interagem com o ligante Meropenem, contendo raio de distância e águas envolvidas na interação

<b>6NTZ Resíduos</b>	<b>Raio (Å)</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 40</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 10</b>	<b>H2O (Envolvidos na interação)</b>
LYS242	2	-3,25	-6,60	
THR243	2	-12,82	-13,50	HOH606
GLY244	2	3,30	-0,07	
ARG277	2	-1,72	-2,25	
ALA72	2,5	-1,80	-1,74	
SER116	2,5	-5,20	-5,34	
ASN141	2,5	-1,66	-1,51	
LEU182	2,5	-1,35	-1,27	
HIS245	2,5	-6,63	-7,39	
SER115	3	-1,08	-1,33	
SER139	3	-2,35	-2,29	
THR246	3	-1,69	1,47	
GLY114	3,5	-2,98	-3,54	HOH610
GLY181	3,5	-0,47	-0,47	HOH625; HOH652. HOH658
LEU74	3,5	-0,79	-0,93	
ARG227	4	-1,72	-2,25	
LEU117	4	-0,68	-0,86	
HIS180	4,5	-0,50	-0,38	
GLN224	4,5	-0,21	-0,07	
<b>6NTZ Resíduos</b>	<b>Raio (Å)</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 40</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 10</b>	<b>H2O (Envolvidos na interação)</b>
PHE119	4,5	-0,13	-0,11	
ASP183	5	-0,46	-0,84	

TYR251	5	-0,46	-1,05	HOH638
PHE274	5	-0,48	-0,24	
PRO71	5	-0,00	-0,01	
GLN138	5,5	-0,26	-0,43	
ASN252	5,5	-0,11	0,21	
GLN187	5,5	-0,05	-0,26	
PHE112	6	-0,16	0,03	
GLY140	6	-0,08	-0,26	
ASN228	6,5	-0,14	-1,02	
ASP247	6,5	-0,35	-0,07	
ALA249	6,5	-0,07	-0,04	
LEU253	6,5	-0,08	2,09	
GLU278	6,5	-0,05	0,12	
ASP70	6,5	-0,01	1,17	
LYS113	6,5	-0,25	0,01	
THR178	7	-0,02	-0,15	
LEU225	7	-0,10	0,03	
LYS248	7	-0,04	-0,07	
GLY250	7	-0,06	-0,08	
<b>6NTZ Resíduos</b>	<b>Raio (Å)</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 40</b>	<b>Energia (Kcal/mol) Constante de 10</b>	<b>H2O (Envolvidos na interação)</b>
LYS248	7	-0,04	0,04	
GLY250	7	-0,06	-0,01	