

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CÁSSIO LIMA DOS SANTOS

Avaliação de uma ferramenta de docking online em um caso real

São Carlos
2024

CÁSSIO LIMA DOS SANTOS

Avaliação de uma ferramenta de docking online em um caso real

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Física de São Carlos da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Silva
Nascimento - Instituto de Física de São Carlos.

São Carlos
2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

RESUMO

As infecções bacterianas multirresistentes são uma ameaça crescente à saúde pública global, agravada pelo uso excessivo e inadequado de antibióticos. Este estudo investiga a enzima tiamina monofosfato quinase de *Klebsiella pneumoniae* (KpThiL) como alvo potencial para novos antibióticos, devido à necessidade urgente de alternativas eficazes. *K. pneumoniae*, um patógeno oportunista responsável por infecções graves, apresenta cepas resistentes a múltiplos medicamentos, destacando a importância da busca por novos alvos terapêuticos. Utilizando uma abordagem integrada, combinamos técnicas de triagem de ligantes (LBDD) e *docking* molecular (SBDD) para identificar compostos que interajam com o sítio ativo da KpThiL. A triagem inicial identificou moléculas estruturalmente semelhantes à tiamina monofosfato (TMP). Em seguida, realizamos um *docking* molecular em maior escala com o programa pyLiBELa, triando mais de 300 mil compostos aprovados pelo FDA. Os resultados apontaram 250 moléculas com potencial inibitório significativo. Apesar da ausência de coincidências entre os compostos identificados pelos dois métodos, nossos achados ressaltam a complexidade do sítio ativo da KpThiL e a importância de abordagens multifacetadas na descoberta de inibidores eficazes.

Palavras-chave: Patógenos multirresistentes. Tiamina monofosfato Kinase. *Klebsiella pneumoniae*. *Docking* molecular.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções e resistência a antibióticos

As infecções bacterianas são uma das principais preocupações de saúde pública em todo o mundo. Com a crescente emergência de patógenos multirresistentes, o tratamento dessas infecções tornou-se um desafio significativo⁽¹⁾. Um estudo publicado em 2020 estimou que, em 2017, ocorreram cerca de 11 milhões de mortes relacionadas à sepse, representando 19,7% de todas as mortes globais⁽²⁾. Em uma pesquisa mais recente, foi estimado que, em 2019, houve aproximadamente 13,7 milhões de mortes relacionadas a infecções, das quais 7,7 milhões foram associadas a 33 patógenos bacterianos, tanto resistentes quanto sensíveis a antimicrobianos, e 1,27 milhão de mortes foram causadas diretamente pela resistência a antibióticos⁽³⁾. Esses números são comparáveis aos da COVID-19, que causou aproximadamente 5,5 milhões de mortes nos dois anos iniciais da pandemia (2020-2021)⁽⁴⁾. Devido a esses números alarmantes e à falta de visibilidade, as infecções bacterianas estão sendo denominadas de "pandemia silenciosa".

Historicamente, a descoberta de antibióticos representou um marco, proporcionando meios eficazes de controle de infecções que anteriormente resultavam em altas taxas de mortalidade. No entanto, o uso excessivo e inadequado desses medicamentos ao longo das últimas décadas contribuiu para uma rápida aceleração no desenvolvimento e disseminação da resistência bacteriana⁽⁵⁾. Fenômenos como a transferência horizontal de genes e mutações genéticas têm permitido que as bactérias desenvolvam e compartilhem mecanismos de resistência⁽⁶⁾. Essa dinâmica resultou no atual cenário em que observamos um grande número de mortes decorrentes de infecções bacterianas. Atualmente, são registradas aproximadamente 700.000 mortes anuais em todo o mundo devido a infecções resistentes a antibióticos. Se não agirmos a longo prazo e de forma estratégica, esse número poderá aumentar para 10 milhões de mortes anuais até 2050⁽⁷⁾.

1.2 Vias utilizadas por antibióticos e alternativas

Existem cinco principais vias de atuação de antibióticos, o que nos permite classificá-los com base no seu mecanismo de ação: inibidores da síntese da parede

celular, como a penicilina, prejudicam a integridade estrutural das bactérias, levando à sua ruptura e morte. Outros, que interferem na síntese de proteínas, como tetraciclinas e aminoglicosídeos, bloqueiam a função ribossomal, cessando a produção de proteínas cruciais para a sobrevivência bacteriana. Há também aqueles que impedem a replicação e transcrição do DNA, com antibióticos como as fluoroquinolonas e rifampicinas desativando processos genéticos essenciais. Desestabilizadores da membrana plasmática, como as polimixinas, alteram a permeabilidade da membrana, causando danos letais. Adicionalmente, alguns antibióticos, como as sulfonamidas, atacam vias metabólicas específicas ao inibir a síntese de folato, um componente vital do metabolismo bacteriano^(8,9).

A pesquisa sobre antibióticos sempre foi de grande interesse, especialmente nos últimos anos, devido à necessidade urgente de alternativas eficazes para combater a resistência bacteriana. Contudo, permanece a questão das limitações inerentes às abordagens tradicionais, que muitas vezes se concentram em modificações químicas nas classes existentes de antibióticos⁽¹⁰⁾. Essas limitações indicam a necessidade de descobrir novos alvos terapêuticos para enfrentar os desafios crescentes da resistência bacteriana. Se todas as opções são limitadas a cinco principais vias de ação, o universo de possibilidades é muito restrito e as chances de desenvolvimento de resistência são maiores⁽¹¹⁾.

Nesse contexto, enquanto as estratégias de curto prazo se concentram em aprimorar moléculas e alvos já conhecidos visando a redução de riscos, a longo prazo, é crucial a identificação de novas moléculas e alvos, especialmente diante da emergência de patógenos resistentes a múltiplos medicamentos, como os conhecidos patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*)⁽¹¹⁾. A descoberta de novos alvos terapêuticos pode abrir caminho para o desenvolvimento de antibióticos inovadores que são essenciais na luta contra a resistência bacteriana.

1.3 Via de biossíntese da tiamina pirofosfato

As vias enzimáticas implicadas na biossíntese de vitaminas têm sido mostradas na literatura como alvos potencialmente promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos. Um exemplo interessante é a via da tiamina, uma molécula essencial para todos os organismos vivos, desde microrganismos até mamíferos. A tiamina em sua

forma ativa, tiamina pirofosfato (TPP), é um cofator crítico em processos celulares fundamentais, tais como o metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos. Ao contrário dos mamíferos, certos microrganismos, como bactérias e fungos, e também as plantas, têm a capacidade de sintetizar TPP através de vias biossintéticas *de novo*. Neste processo, os precursores derivados do tiazol e da pirimidina são sintetizados separadamente e posteriormente unidos enzimaticamente para formar o monofosfato de tiamina (TMP), em uma reação catalisada pela enzima tiamina fosfato sintase (ThiE). A etapa final dessa via é conduzida pela tiamina monofosfato kinase (ThiL), que fosforila o TMP até converter-se em TPP em organismos Gram-negativos⁽¹²⁾. Adicionalmente, algumas bactérias são capazes de utilizar tiamina exógena e convertê-la em TPP. Dado que os mamíferos não possuem a via biossintética para TPP, as enzimas que participam dessa biossíntese e, em especial a enzima ThiL, tornam-se alvos promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos⁽¹¹⁾.

1.4 Relevância do estudo da KpThiL

Neste estudo, exploramos a enzima tiamina monofosfato quinase de *Klebsiella pneumoniae* (KpThiL), um patógeno oportunista Gram-negativo que é responsável por aproximadamente 10% das infecções nosocomiais. *K. pneumoniae* pode provocar condições severas como pneumonia, sepse e meningite, afetando sobretudo pessoas imunocomprometidas. Notavelmente, suas cepas virulentas (hvKP), equipadas com um plasmídeo que potencializa a produção de cápsula e a síntese de sideróforos, têm capacidade de infectar até mesmo indivíduos saudáveis⁽¹³⁾. A resistência antimicrobiana, particularmente em cepas resistentes ao carbapenem (CRKp), é uma preocupação crescente, exacerbando os desafios em unidades de terapia intensiva (UTIs) ao aumentar as taxas de mortalidade e os custos hospitalares⁽¹⁴⁾. A prevalência mundial de colonização por CRKP é alarmante, evidenciando uma urgente necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas em face da escassez de tratamentos eficazes e do aumento dessas cepas resistentes.

Um estudo publicado em 2020 no *Journal of Biological Chemistry* (JBC) examinou a enzima ThiL em *Pseudomonas aeruginosa*, outro patógeno significativo em infecções hospitalares. A deleção do gene ThiL não apenas interrompeu a biossíntese de tiamina mas também a capacidade de utilizar tiamina exógena, resultando em falhas de

crescimento da cepa Δ ThiL, mesmo com a presença de derivados de tiamina, exceto TPP. De forma mais crítica, a virulência da cepa mutante foi consideravelmente reduzida, demonstrando menor indução de citocinas inflamatórias e uma diminuição substancial na carga bacteriana em um modelo de infecção *in vivo*. A investigação prospectiva da enzima ThiL de *P. aeruginosa* (PaThiL) como um alvo terapêutico incluiu a análise de suas propriedades bioquímicas e a realização de um rastreamento de inibidores por meio de ensaios *in vitro*, onde diversos compostos, incluindo o inibidor não competitivo WAY213613, mostraram atividade antibacteriana efetiva contra *P. aeruginosa*⁽¹⁵⁾.

1.5 Docking molecular e pyLiBELa

O *docking* molecular é uma técnica computacional utilizada comumente na descoberta de novos fármacos. Essa abordagem permite a previsão de como uma molécula pequena interage com uma proteína alvo, determinando a conformação mais favorável dentro do sítio de ligação e associando uma energia de interação ou uma pontuação a esta interação. A precisão dessa técnica permite identificar potenciais inibidores ou moduladores de atividade enzimática, o que é essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos⁽¹⁶⁾. Ferramentas como o pyLiBELa desempenham um papel crucial nesse contexto, facilitando o *docking* molecular e a triagem virtual de grandes bases de dados de compostos químicos. Com a capacidade de ser executado em clusters de computadores, o pyLiBELa pode processar milhares de moléculas, identificando aquelas com maior potencial de interação com um alvo biológico específico⁽¹⁷⁾. Recentemente, avanços em inteligência artificial, como o AlphaFold2, têm revolucionado o campo da biologia estrutural ao prever estruturas proteicas com alta precisão⁽¹⁸⁾. Essas predições fornecem modelos estruturais detalhados que podem ser utilizados no *docking* molecular, permitindo a exploração de alvos proteicos previamente inacessíveis⁽¹⁹⁾.

Inspirados por essas descobertas, este estudo propõe usar o pyLiBELa de forma prospectiva para identificar possíveis inibidores de KpThiL, visando descobrir novos compostos que possam servir como bases para o desenvolvimento de antibióticos inovadores contra *Klebsiella pneumoniae*. Esta abordagem não só amplia o escopo da pesquisa em resistência bacteriana, mas também potencializa o uso de ferramentas computacionais avançadas no combate a patógenos resistentes.

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho é realizar uma prova de conceito para avaliar o potencial da enzima ThiL como alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos antibióticos, utilizando uma abordagem integrada que combina técnicas de triagem baseadas em ligantes e *docking* molecular em larga escala. Os objetivos específicos deste estudo são:

1. Realizar o screening de ligantes baseado na estrutura da tiamina monofosfato (TMP) utilizando o software pyLiBELa, comparando a TMP com uma série de análogos potenciais.
2. Utilizar o PyLiBELa para realizar o *docking* molecular de centenas de milhares de moléculas contra o sítio ativo da enzima tiamina monofosfato kinase de *Klebsiella pneumoniae* (KpThiL), com o propósito de identificar compostos que demonstrem alta afinidade e potencial atividade antibacteriana.
3. Analisar e comparar os resultados do screening de ligantes com os resultados do *docking* molecular, identificando sobreposições entre os compostos triados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Screening de ligantes baseado no ligante

A primeira etapa consistiu no screening baseado no ligante, onde empregamos o pyLiBELa para alinhar a estrutura da TMP com o conjunto de moléculas disponíveis no conjunto **World** da base de dados ZINC⁽²⁰⁾. Os resultados obtidos foram organizados conforme o índice de similaridade de Hodgkin, e a análise visual das estruturas dos ligantes foi conduzida utilizando a ferramenta ViewDock do programa UCSF Chimera. O índice de similaridade de Hodgkin representa uma medida quantitativa para avaliar a correspondência entre duas moléculas⁽²¹⁾. O índice é calculado por:

$$SI_{AB} = \frac{2V_{AB}}{V_{AA} + V_{BB}} \quad (1)$$

onde,

$$V_{AB} = w_1 \sum_i \sum_j \int dr \rho_i(r) \rho_j(r) + w_2 \sum_i \sum_j \int dr \phi_i^{pos}(r) \phi_j^{pos}(r) \\ + w_2 \sum_i \sum_j \int dr \phi_i^{neg}(r) \phi_j^{neg}(r) \quad (2)$$

Aqui:

- $\rho_i(r)$ e $\rho_j(r)$ são as descrições gaussianas do volume atômico realizados para duas moléculas, A (i átomos) e B (j átomos).
- $\phi_i^{pos}(r)$ e $\phi_j^{pos}(r)$ são as descrições gaussianas para cargas positivas para as duas moléculas;
- $\phi_i^{neg}(r)$ e $\phi_j^{neg}(r)$ são as descrições gaussianas para cargas negativas para as duas moléculas;
- w_1 e w_2 são pesos para os termos de forma e carga.

A forma molecular é descrita como a função gaussiana:

$$\rho(\mathbf{r}) = p_i \exp \left\{ \left[-\pi \left(\frac{3p_i}{4\pi\sigma_i^3} \right)^{\frac{2}{3}} \right] (\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)^2 \right\} \quad (3)$$

onde,

- p_i é a amplitude gaussiana definida como uma constante dada por $2\sqrt{2}$.
- r_i é a coordenada atômica para o átomo i .
- σ_i é definido como o raio de Van der Waals do i -ésimo átomo.

A partir das descrições gaussianas de forma e carga (Eq. 3), o pyLiBELa realiza a otimização de sobreposição entre duas moléculas ao maximizar a Eq. 2, tomando a molécula 'A' como referência e 'B' como uma molécula de busca. O algoritmo é capaz de rotacionar e transladar a molécula de busca no espaço cartesiano tridimensional como um corpo rígido. Com os valores obtidos, o índice de similaridade é calculado utilizando a Eq. 1⁽²¹⁾. Este índice varia de -1 a 1, indicando anti-similaridade (-1), ausência de similaridade (0) ou similaridade total (1).

3.2 Preparação da KpThiL para docking

Antes de iniciar o *docking* molecular, foi necessário 'preparar' a estrutura da enzima KpThiL de forma adequada. A estrutura da KpThiL foi resolvida por cristalografia no grupo

de pesquisa onde este trabalho foi conduzido. No entanto, observou-se que a estrutura obtida possuía a região C-terminal parcialmente desordenada, como consequência da ausência do ATP na estrutura. Assim, para os experimentos de *docking*, o modelo da proteína foi obtido a partir de uma predição do AlphaFold2 (AF2) disponível no site do UniProt.

A KpThiL é uma proteína dimérica. Assim, o programa UCSF Chimera foi utilizado para alinhar duas cópias do modelo obtido pelo AF2 com uma estrutura homóloga. A proteína escolhida foi a tiamina monofosfato kinase de *Acinetobacter baumannii* (estrutura 5DD7). Em seguida, no Chimera, foi realizado o alinhamento e a montagem do dímero com base na enzima *A. baumannii*. Além disso, a 5DD7 foi utilizada também para posicionar os ligantes no modelo da KpThiL (ATP e TMP).

O software PDB2PQR foi utilizado para a definição dos estados de protonação, adição dos átomos de hidrogênio e atribuição de cargas atômicas segundo o modelo do campo de força AMBER⁽²²⁾.

3.3 Auto-docking e docking cruzado

A partir da estrutura obtida nas etapas anteriores, o arquivo foi carregado no [Google Colab do pyLiBELa](#). O primeiro teste realizado foi o de auto-docking. O auto-docking (ou *self-docking*) é um experimento direto utilizado para avaliar a qualidade da reprodução das conformações do ligante no sítio ativo em relação à conformação experimental. Como a conformação inicial do ligante já corresponde à conformação cristalográfica, o auto-docking não reflete adequadamente o desafio real do docking⁽¹⁷⁾. Para uma avaliação mais representativa, foi realizado um teste no qual as coordenadas iniciais do ligante não foram fornecidas ao programa pyLiBELa. Em vez disso, a estrutura do ligante foi fornecida no formato SMILES (1D).

3.3 Triagem baseada no receptor através de docking prospectivo

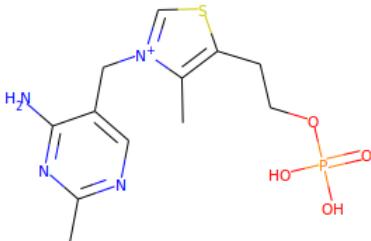
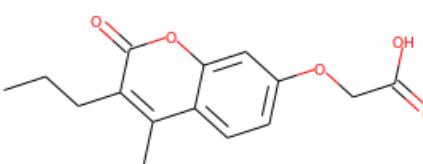
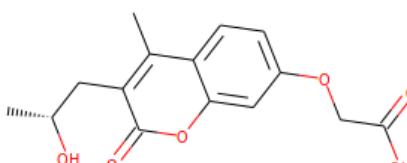
Por fim, o pyLiBELa foi executado no cluster do grupo de cristalografia, utilizando como *input* uma base de dados de compostos aprovados pelo [FDA disponível no ZINC](#). O conjunto total consistia de 307.852 moléculas, que foram divididas em 103 grupos de 3.000 moléculas cada para o *docking*.

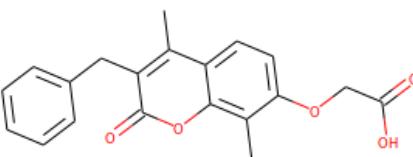
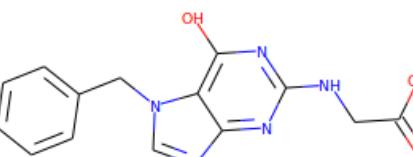
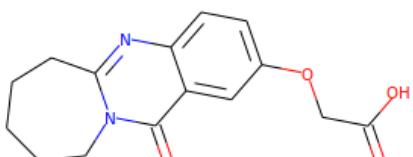
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Screening de ligantes baseado no ligante

A triagem de ligantes realizada utilizando o pyLiBELa identificou várias moléculas com alta similaridade estrutural à tiamina monofosfato (TMP). O processo baseou-se nos valores do índice de similaridade de Hodgkin (SI), considerando apenas moléculas com mais de 0,75 de similaridade. Inicialmente, 14.374 moléculas foram triadas, e após a inspeção visual, 30 compostos foram selecionados, com os cinco principais compilados na Tabela 01. A maioria desses compostos possui um grupo de carga negativa, geralmente um ácido carboxílico ou fosfato, além de cadeias carbônicas fechadas, predominantemente anéis aromáticos. Essas características são encontradas na estrutura da TMP, que consiste em dois anéis, um pirimidínico e outro tiazólico, unidos por uma ponte metilênica e um fosfato em uma das extremidades.

Tabela 01: TMP e 5 principais compostos selecionados a partir do screening de ligantes

Código Zinc	SI	Estrutura 2D
TMP (estrutura de referência) ZINC000001532839	-	
ZINC000000133268	0,78	
ZINC000000488946	0,77	

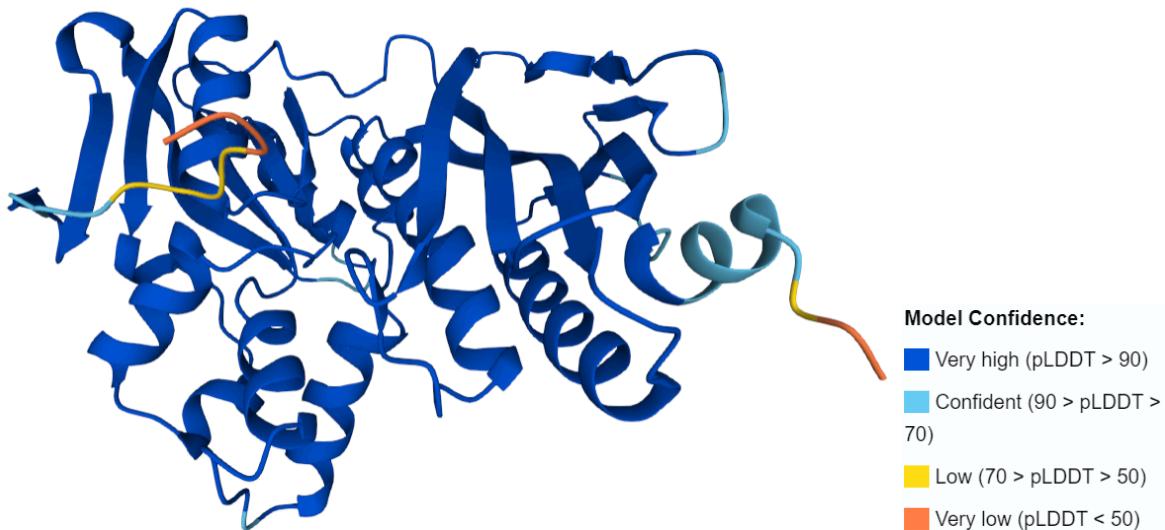
Código Zinc	SI	Estrutura 2D
ZINC000000253049	0,78	
ZINC000009065378	0,84	
ZINC000008764996	0,80	

Fonte: elaborada pelo autor

4.2 Preparação da KpThiL para Docking e estrutura da proteína

A estrutura monomérica obtida por predição do AlphaFold2, representada na Figura 01, apresenta regiões de alta confiabilidade ao longo de quase todo o comprimento da proteína, com exceção das extremidades, que possuem menor confiabilidade, com base nos valores de pLDDT. Devido a essa alta confiabilidade geral, a estrutura pode ser utilizada como modelo representativo da KpThiL. A comparação com o modelo experimental obtido no grupo também confirmou a confiabilidade deste modelo do AlphaFold2.

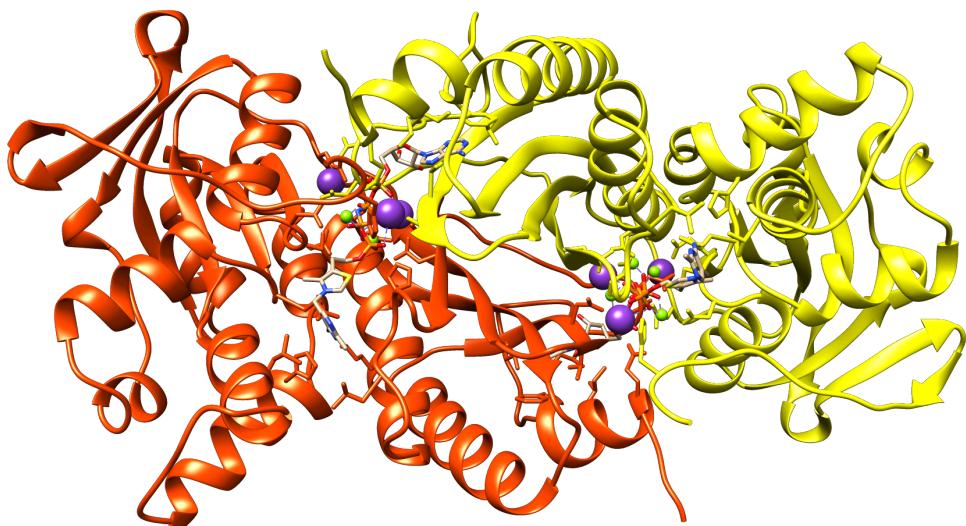
Figura 01: estrutura do monômero da KpThiL



Fonte: site da UniProt

A partir do BLAST realizado utilizando o UCSF Chimera, a estrutura 5DD7, correspondente à tiamina monofosfato quinase de *A. baumannii* (AbThiL), foi escolhida devido ao seu menor e-value de $2,18 \cdot 10^{-80}$. Consequentemente, a confiabilidade em utilizar a 5DD7 para construir o dímero e adicionar os ligantes é muito alta. Isso assegura que a estrutura dimerizada e os ligantes posicionados resultantes sejam representações precisas e funcionais da KpThiL. A Figura 02 representa o dímero de KpThiL após o BLAST e o alinhamento do monômero obtido do AlphaFold com as cadeias A e B do dímero de ThiL de *A. baumannii*. Conforme mostrado na figura, a proteína possui dois sítios ativos.

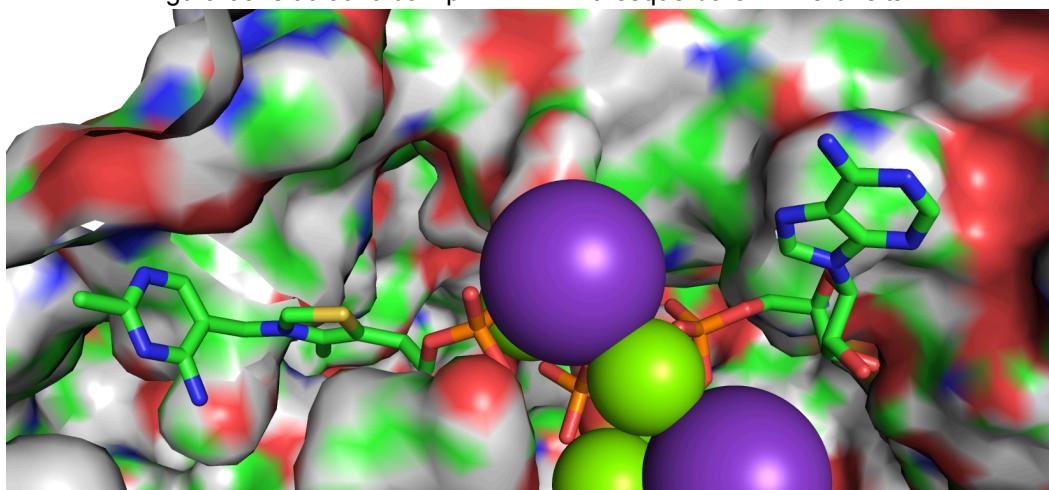
Figura 02: estrutura do dímero da KpThiL



Fonte: elaborada pelo autor através do Chimera

No sítio ativo, conforme mostrado na Figura 03, é possível observar a proximidade entre a TMP e o ATP, coordenadas pelos íons potássio (representados por esferas roxas) e magnésio (em verde). Sob condições normais, a enzima ThiL catalisa a fosforilação da TMP para formar o tiamina pirofosfato (TPP), que é a forma ativa da vitamina B1⁽²³⁾.

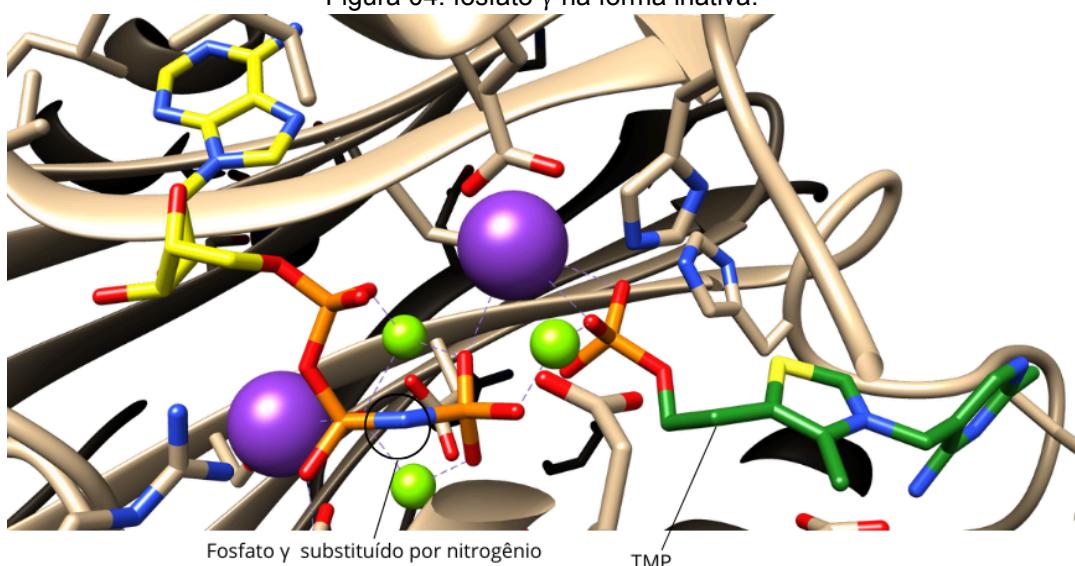
Figura 03: sítio ativo da KpThiL. TMP à esquerda e ATP à direita.



Fonte: elaborada pelo autor através do PyMOL

A estrutura cristalográfica da enzima AbThiL possuía um análogo do ATP em que o fósforo do fosfato γ foi substituído por um nitrogênio, conforme ilustrado na Figura 04. No Chimera, esse nitrogênio foi substituído por um fósforo para restaurar a estrutura original.

Figura 04: fosfato γ na forma inativa.

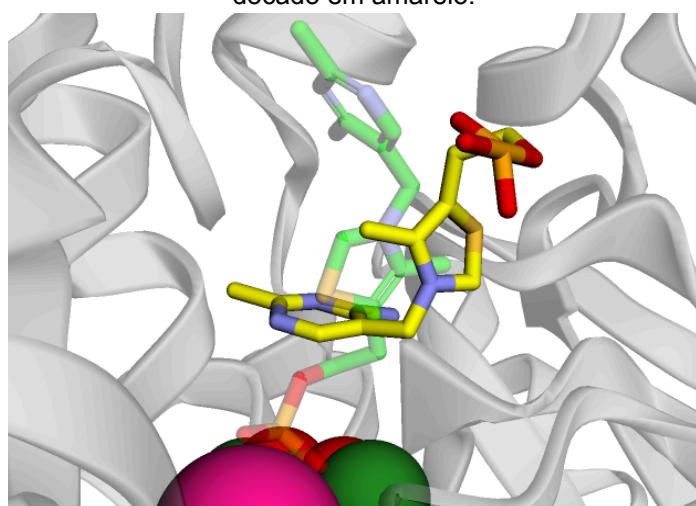


Fonte: elaborada pelo autor através do Chimera

4.3 Validação do pyLiBELa no Colab

Durante o processo de docking da TMP na KpThiL, realizado através do pyLiBELa utilizando apenas os SMILES da TMP, observamos que, embora a ferramenta tenha posicionado a TMP corretamente no sítio de ligação, houve uma dificuldade em alinhar o grupo fosfato de forma precisa, resultando em sua orientação invertida, como evidenciado na Figura 05.

Figura 05: docagem da TMP no pyLiBELa a partir dos SMILES. Ligante de referência em verde e ligante docado em amarelo.



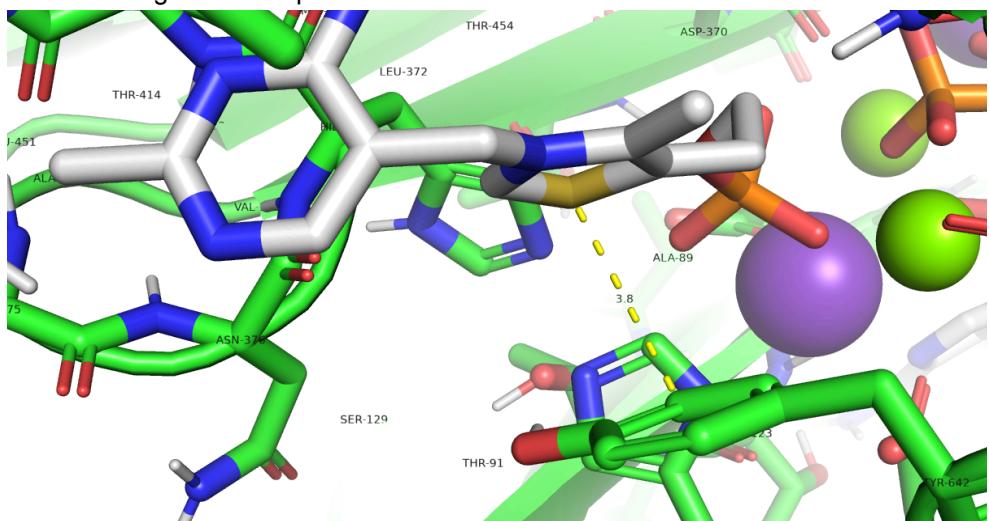
Fonte: elaborada pelo autor através do pyLiBELa

Acreditamos que a dificuldade em realizar o docking adequadamente é atribuída à complexidade do sítio ativo, que contém uma variedade significativa de elementos com cargas. Nesse contexto, o pyLiBELa enfrenta desafios para determinar quais elementos o fosfato deve interagir. Durante a docagem, o algoritmo considera tanto o volume atômico quanto as cargas. Para mitigar o impacto de um sítio ativo altamente carregado na docagem, reduzimos o peso atribuído à carga e aumentamos o peso do volume. Com esses parâmetros otimizados, seguimos para a triagem prospectiva. Utilizando os parâmetros otimizados, o auto-docking resultou em RMSD menor que 3,0 Å em relação à posição inicial, considerando todos os átomos. Este valor de RMSD foi considerado suficiente para as etapas posteriores do projeto.

4.4 Screening baseado no receptor através de docking prospectivo

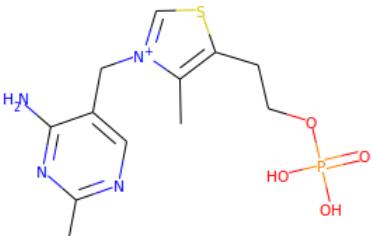
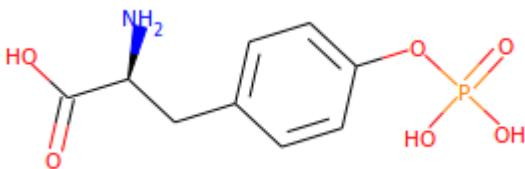
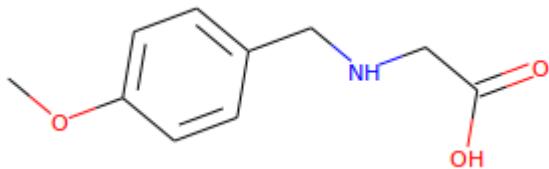
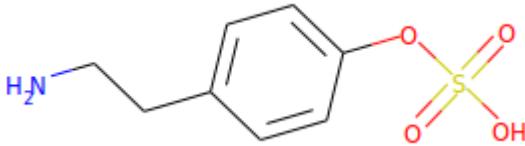
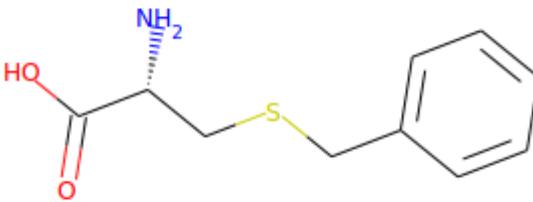
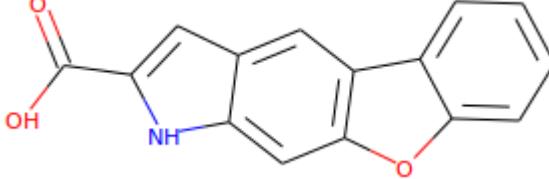
A execução do pyLiBELa no *cluster* do grupo utilizando a base de dados do FDA disponível no ZINC resultou na triagem de 307.852 moléculas. Após o docking, 250 moléculas apresentaram energias de ligação de até -25 kcal/mol, sugerindo maior potencial de interação com a enzima KpThiL. Essas moléculas foram então submetidas a uma inspeção visual detalhada através da ferramenta ViewDock do UCSF Chimera. Ao observar como a estrutura da TMP contribui para sua estabilização no sítio ativo, identificamos dois aspectos fundamentais: a interação do grupo fosfato com os íons e o empilhamento π do anel tiazol com a tirosina 319, como evidenciado na Figura 06. Dessa forma, entre as 250 moléculas com energia de interação favorável, buscamos selecionar aquelas com características similares, ou seja, um grupo carregado negativamente e um anel capaz de realizar empilhamento π . Os cinco principais compostos selecionados são representados na Tabela 02.

Figura 06: empilhamento π do tiazol da TMP com a TYR 319.



Fonte: elaborada pelo autor através do PyMOL

Tabela 02: TMP e 5 principais compostos selecionados a partir do *docking* prospectivo

Código Zinc	Nome	Energia(k cal/mol)	Estrutura 2D
ZINC0000015328 39	Tiamina monofosfato (estrutura de referência)	-25	
ZINC0000015304 64	Fosfo tirosina	-40	
ZINC0000046701 53	*	-38	
ZINC0000060928 52	Sulfato de tiramina	-36	
ZINC0000004042 99	*	-32	
ZINC0000040274 18	*	-30	

* Nome não encontrado no ZINC

Fonte: elaborada pelo autor.

Comparando os resultados do screening baseado no ligante e no receptor, esperávamos encontrar um ou mais compostos em comum nas duas listas, o que seria altamente positivo. No entanto, para nossa surpresa, isso não ocorreu.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo investigou a enzima tiamina monofosfato quinase de *Klebsiella pneumoniae* (KpThiL) como um alvo potencial para o desenvolvimento de novos antibióticos, utilizando técnicas de triagem de ligantes e docking molecular. Embora a pesquisa tenha demonstrado a viabilidade de explorar ThiL como alvo terapêutico, os resultados obtidos foram modestos. A triagem de ligantes com o UCSF Chimera e o docking molecular com o pyLiBELa identificaram compostos com potencial inibitório, mas a ausência de coincidências entre os compostos identificados pelos dois métodos destaca a complexidade do desafio. Além disso, as dificuldades observadas na orientação precisa dos ligantes sugerem que melhorias metodológicas são necessárias. Vale destacar que este foi o primeiro estudo a aplicar o programa LiBELa na implementação Python (pyLiBELa) em uma triagem prospectiva.

Os achados ressaltam a complexidade inerente ao desenvolvimento de novos antibióticos e indicam que a investigação de KpThiL e a utilização de ferramentas computacionais avançadas precisam ser complementadas por abordagens experimentais. Uma das possibilidades de continuação deste estudo é realizar experimentos em laboratório com os ligantes selecionados, a fim de confirmar suas atividades inibitórias e avaliar sua eficácia como antibióticos. Esses experimentos podem incluir estudos de farmacodinâmica para compreender a relação entre a concentração do fármaco e seu efeito biológico, bem como estudos de farmacocinética para analisar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos compostos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1 Kumar NR, Balraj TA, Kempegowda SN, Prashant A. Multidrug-Resistant Sepsis: A Critical Healthcare Challenge. *Antibiotics* (Basel). 2024 Jan 4;13(1):46. doi: 10.3390/antibiotics13010046. PMID: 38247605; PMCID: PMC10812490.
- 2 Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality,

1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020 Jan 18;395(10219):200-211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7. PMID: 31954465; PMCID: PMC6970225.

3 GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2022 Dec 17;400(10369):2221-2248. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36423648; PMCID: PMC9763654.

4 Msemburi W, Karlinsky A, Knutson V, Aleshin-Guendel S, Chatterji S, Wakefield J. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. *Nature.* 2023 Jan;613(7942):130-137. doi: 10.1038/s41586-022-05522-2. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36517599; PMCID: PMC9812776.

5 Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Sep;74(3):417-33. doi: 10.1128/MMBR.00016-10. PMID: 20805405; PMCID: PMC2937522.

6 Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016 Apr;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. PMID: 27227291; PMCID: PMC4888801.

7 Davies SC, Oxlade C. Innovate to secure the future: the future of modern medicine. *Future Healthc J.* 2021 Jul;8(2):e251-e256. doi: 10.7861/fhj.2021-0087. PMID: 34286193; PMCID: PMC8285149.

8 Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *J Antibiot (Tokyo).* 2014 Jan;67(1):7-22. doi: 10.1038/ja.2013.49. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23756684.

9 Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jun;8(6):423-35. doi: 10.1038/nrmicro2333. Epub 2010 May 4. PMID: 20440275; PMCID: PMC2896384.

10 Mandal SM, Roy A, Ghosh AK, Hazra TK, Basak A, Franco OL. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Front Pharmacol.* 2014 May 13;5:105. doi: 10.3389/fphar.2014.00105. PMID: 24860506; PMCID: PMC4027024.

11 Barra ALC, Dantas LOC, Morão LG, Gutierrez RF, Polikarpov I, Wrenger C, Nascimento AS. Essential Metabolic Routes as a Way to ESKAPE From Antibiotic Resistance. *Front Public Health.* 2020 Feb 28;8:26. doi: 10.3389/fpubh.2020.00026. PMID: 32257985; PMCID: PMC7093009.

12 Jurgenson CT, Ealick SE, Begley TP. Biosynthesis of Thiamin Pyrophosphate. *EcoSal Plus.* 2009 Aug;3(2):10.1128/ecosalplus.3.6.3.7. doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.7. PMID: 26443755; PMCID: PMC6039189.

- 13 Kot, B., Piechota, M., Szweda, P. et al. Virulence analysis and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalised patients in Poland. *Sci Rep* 13, 4448 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31086-w>
- 14 Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Jan 21;12(2):234. doi: 10.3390/antibiotics12020234. PMID: 36830145; PMCID: PMC9952820.
- 15 Kim HJ, Lee H, Lee Y, Choi I, Ko Y, Lee S, Jang S. The ThiL enzyme is a valid antibacterial target essential for both thiamine biosynthesis and salvage pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2020 Jul 17;295(29):10081-10091. doi: 10.1074/jbc.RA120.013295. Epub 2020 May 13. PMID: 32404369; PMCID: PMC7380198.
- 16 Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev*. 2014 Mar;6(1):75-87. doi: 10.1007/s12551-013-0130-2. Epub 2013 Dec 21. PMID: 28509958; PMCID: PMC5425711.
- 17 de Oliveira CJ. Implementação do programa de docking LiBELa em linguagem Python. Monografia - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2023.
- 18 AlQuraishi M. Protein-structure prediction revolutionized. *Nature*. 2021 Aug;596(7873):487-488. doi: 10.1038/d41586-021-02265-4. PMID: 34426694.
- 19 Lyu J, Kapolka N, Gumper R, Alon A, Wang L, Jain MK, Barros-Álvarez X, Sakamoto K, Kim Y, DiBerto J, Kim K, Glenn IS, Tummino TA, Huang S, Irwin JJ, Tarkhanova OO, Moroz Y, Skiniotis G, Kruse AC, Shoichet BK, Roth BL. AlphaFold2 structures guide prospective ligand discovery. *Science*. 2024 May 16:eadn6354. doi: 10.1126/science.adn6354. Epub ahead of print. PMID: 38753765.
- 20 Irwin JJ, Tang KG, Young J, Dandarchuluun C, Wong BR, Khurelbaatar M, Moroz YS, Mayfield J, Sayle RA. ZINC20-A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *J Chem Inf Model*. 2020 Dec 28;60(12):6065-6073. doi: 10.1021/acs.jcim.0c00675. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33118813; PMCID: PMC8284596.
- 21 Vaz de Lima LA, Nascimento AS. MolShaCS: a free and open source tool for ligand similarity identification based on Gaussian descriptors. *Eur J Med Chem*. 2013 Jan;59:296-303. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.11.013. Epub 2012 Nov 17. PMID: 23247048.
- 22 Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, Brookes DH, Wilson L, Chen J, Liles K, Chun M, Li P, Gohara DW, Dolinsky T, Konecny R, Koes DR, Nielsen JE, Head-Gordon T, Geng W, Krasny R, Wei GW, Holst MJ, McCammon JA, Baker NA. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci*. 2018 Jan;27(1):112-128. doi: 10.1002/pro.3280. Epub 2017 Oct 24. PMID: 28836357; PMCID: PMC5734301.

23 McCulloch KM, Kinsland C, Begley TP, Ealick SE. Structural studies of thiamin monophosphate kinase in complex with substrates and products. *Biochemistry*. 2008 Mar 25;47(12):3810-21. doi: 10.1021/bi800041h. Epub 2008 Mar 1. PMID: 18311927; PMCID: PMC6078389.