

Cribado computacional de *n*-acilamidas como potenciales moduladores del sistema LasR para atenuar la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Computational Screening of N-Acylamides as Potential Modulators of the LasR System to Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* Virulence

Tonatiu Campos-García^{1*}, Juan Vázquez-Martínez², Huitziméngari Campos-García³

¹ Biotecnología Vegetal, CONAHCYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

² Tecnológico Nacional de México/ITS Irapuato, 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco 75460, México.

*Autor de correspondencia: Tonatiu Campos-García, tocampos_pos@ciatej.edu.mx

Palabras clave:

quorum sensing, LasR, *Pseudomonas aeruginosa*, amidas, cribado *in silico*

Keywords:

quorum sensing, LasR, *Pseudomonas aeruginosa*, amides, docking *in silico*

Recibido: 06 de enero 2025
Revisado: 19 de mayo 2025
Aceptado: 24 de junio 2025
Publicado: 21 de julio 2025



Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Resumen

El análisis *in silico* es un método computacional que utiliza simulaciones por computadora para estudiar hipótesis biológicas. Haciendo uso de esta estrategia y basándonos en los principios del diseño racional de fármacos, encontramos que las moléculas candidatas, N-3,4-dihidroxifenetil dodecanamida (DC12) y N-fenetildodecanamida (PEA12), presentan una mayor afinidad, lo que sugiere una mayor probabilidad de interacción y, por lo tanto, un potencial efecto biológico atenuando la patogenicidad (virulencia) de *P. aeruginosa*. Se identificó que el sitio de unión exhibe una arquitectura dual, un bolsillo aromático para la interacción con el núcleo del ligando y una cavidad hidrofóbica donde se acomoda la cadena acilo. Las simulaciones de las dinámicas moleculares mostraron estabilidad de los complejos proteína-ligando, lo cual sugiere una interacción más duradera y un potencial efecto terapéutico, mientras que la farmacocinética predice la similitud con fármacos. Estos resultados contribuyen al desarrollo de moléculas con potencial para reducir la virulencia de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

In silico analysis is a computational method that uses computer simulations to study biological hypotheses. Utilizing this strategy and based on the principles of rational drug design, we found that candidate molecules, N-3,4-dihydroxyphenethyl dodecanamide (DC12) and N-phenethyl dodecanamide (PEA12), exhibit higher affinity. This suggests a greater likelihood of interaction and, consequently, a potential biological effect in attenuating the pathogenicity (virulence) of *P. aeruginosa*. We identified that the binding site exhibits dual architecture: an aromatic pocket for interaction with the ligand's core and a hydrophobic cavity where the acyl chain is accommodated. Molecular dynamics simulations demonstrated the stability of the protein-ligand complexes, suggesting a more durable interaction and a potential therapeutic effect, while pharmacokinetics predicts similarity to existing drugs. These results can contribute to the development of new treatments to reduce the virulence of bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*.



Introducción

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias son una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Mulholland & Adegbola, 2005; Cassini et al., 2019). *Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno humano oportunista más común que desempeña un papel importante en las infecciones de pacientes inmunocomprometidos. Es de gran interés médico, ya que los tratamientos antibióticos tradicionales suelen ser ineficaces (O'Brien et al., 2015; Hirsch & Tam, 2010). Es bien sabido que las bacterias pueden comunicarse mediante la liberación y detección de señales químicas difusibles (Whiteley et al., 2017; Mukherjee & Bassler, 2019). Estas señales químicas pueden estimular diversos tipos de comportamiento bacteriano, como la bioluminiscencia, la transferencia horizontal de ADN, la formación de biopelículas, la producción de factores de virulencia, la resistencia a los antibióticos y la biosíntesis de metabolitos secundarios (Mukherjee & Bassler, 2019). Este tipo de comportamiento se conoce como quorum sensing (QS).

Desde el descubrimiento del sistema QS 'Lux', se ha encontrado que decenas de especies de bacterias Gram-negativas utilizan las *N*-acil-*L*-homoserina lactonas (AHLs) como señal principal de QS (Geske et al., 2005). Las AHLs son moléculas neutrales similares a los lípidos, que constan de un grupo *L*-homoserina lactona conservado y una cola de cadena acilo que puede variar tanto en longitud como en insaturaciones (Eberhard et al., 1981; Eberl et al., 1996). Específicamente, el circuito QS de *P. aeruginosa* consta de módulos de señalización mediados por AHLs que incluyen dos principales vías de señalización similares a Lux conocido como sistema "Las" (Wagner et al., 2007; Wysoczynski-Horita et al., 2018). En el sistema "Las" la sintetasa de AHL LasI produce la *N*-3-oxo-dodecanoil-*L*-homoserina lactona (OHN), que es detectada por el receptor de AHL cognado LasR (Latifi et al., 1996; Chugani & Greenberg, 2014). En este contexto, el desarrollo de pequeñas moléculas sintéticas diseñadas para interferir con el QS bacteriano representa un enfoque potencialmente poderoso para modular los fenotipos de virulencia bacteriana en patógenos bacterianos que presentan multirresistencia a antibióticos como *P. aeruginosa*. Específicamente, dirigirse al receptor de AHLs, LasR podría atenuar la patogenicidad (virulencia) (Hirsch & Tam, 2010).

Las *N*-acil amidas son moléculas omnipresentes que se forman a partir de ácidos grasos simples y aminas primarias, y probablemente están presentes en la mayoría (sino todas) de las formas de vida. Estas moléculas son bastante conocidas en todos los reinos vegetal y animal (Leishman & Bradshaw, 2015). La similitud estructural entre las AHLs y las *N*-acil amidas sintetizadas químicamente (Tabla 1) nos proporciona la base para hipotetizar que estas *N*-acil amidas podrían evaluarse como



posibles inhibidores de QS. En un trabajo previo se describe un método enzimático para producir N-acil homoserina lactonas (AHLs), así como otro tipo de N-fenetil amidas de una forma relativamente sencilla con rendimientos entre el 6 y el 99% (Vázquez-Martínez et al., 2018).

El objetivo del presente estudio es utilizar herramientas computacionales para identificar nuevas moléculas con potencial para ser desarrolladas como nuevas estrategias para reducir la virulencia de patógenos bacterianos. En este caso particular, elegimos utilizar el mecanismo de quorum sensing (QS) mediado por LasR en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO) debido a su relevancia clínica (Driscoll & Kollef, 2007; Hirsch & Tam, 2010; Cassini et al., 2019). Para comprender mejor la interacción molecular entre las N-acil amidas sintéticas y el regulador transcripcional de QS LasR, exploramos la interacción entre 16 estructuras de N-acil amidas y la proteína LasR utilizando un cribado virtual mediante docking *in silico*. De estas 16 se eligieron las moléculas candidatas con mejor puntaje de energía de unión (*binding affinity*) para posteriores análisis como similitud de fármacos (*drug-likeness*), predicciones farmacocinéticas (ADME) y simulación de dinámicas moleculares. Adicionalmente, incluimos en el análisis virtual la alamida natural afinina (AFF) en nuestro estudio debido a su efecto negativo reportado sobre el crecimiento de *E. coli* y *B. subtilis* (Molina-Torres et al., 2004).

Materiales y métodos

Análisis de acoplamiento molecular (docking *in silico*) e interacciones

En primer lugar, las N-acil amidas fueron diseñadas utilizando ChemDraw Ultra 12.0 y convertidas a estructuras tridimensionales empleando Chem3D Pro 12.0 (PerkinElmer Inc.). Las representaciones SMILES de los ligandos, presentadas en la Tabla 1, se obtuvieron a través del portal web SwissADME (Daina et al. 2017)). Posteriormente, se obtuvo la estructura de la proteína con su correspondiente ligando co-cristalizado desde el portal Protein Data Bank (Berman et al., 2002), LasR-OHN (PDB ID 2UV0) (Bottomley et al., 2007). Para preparar la estructura proteica y adecuarla al protocolo de acoplamiento rígido se utilizó el módulo “Input generator” de la plataforma CHARM-GUI (Jo et al., 2008). A continuación, se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular rígido utilizando PyRx, un software de cribado virtual diseñado para la identificación computacional de fármacos. PyRx emplea los algoritmos de acoplamiento AutoDock 4.2 y AutoDock Vina, que se basan en el algoritmo genético Lamarckiano y en una función de puntuación de energía libre empírica (Morris et al., 2009; Trott & Olson, 2010). Utilizando el software PyMOL



(Schrodinger LLC, 2010) se obtuvieron imágenes superpuestas que muestran las poses de unión de los ligandos nativos y de las N-acil amidas. Para estudiar en detalle las interacciones entre la proteína diana y los ligandos, se empleó el software BIOVIA Discovery Studio v20.1.0 (Dassault Systèmes, <https://www.3ds.com>). Los resultados de este análisis se presentaron en forma de mapas de interacción bidimensionales y tridimensionales. Como control positivo, y para comparar con la pose de unión del ligando nativo dentro de la estructura experimental cristalizada, se reacopló el ligando nativo OHN mediante el mismo protocolo de docking.

Predicción de similitud farmacológica (drug-likeness)

La predicción de la similitud farmacológica de las N-acil amidas se realizó utilizando la regla de cinco de Lipinski (Lipinski, 2004) a través del servidor SwissADME (Daina et al. 2017). Para considerarse fármacos de administración oral deben cumplir al menos con cuatro de los cinco criterios establecidos por la regla (masa molecular, aceptores de puentes de hidrógeno, donadores de puentes de hidrógeno, índice de refracción molar y LogP) (Daina et al., 2017).

Predicción de propiedades fisicoquímicas y parámetros farmacocinéticos

Para predecir las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos de los ligandos: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET), también utilizamos el servidor web gratuito SwissADME. El porcentaje de absorción (AB%) se calculó utilizando la siguiente fórmula (Bhowmik et al., 2021):

$$AB \% = 109 - (0.345 \times TPSA)$$

Simulaciones de Dinámica Molecular (MD-simulations)

Para ejecutar las simulaciones de MD se utilizó el servidor WEBGRO, impulsado por GRACE “High Performance Computing Facility”, disponible como servicio público por la Universidad de Ciencias Médicas de Arkansas (UAMS) (<https://simlab.uams.edu>). Las simulaciones se efectuaron utilizando todos los átomos y sus coordenadas en los complejos LasR-ligando utilizando GROMACS v2019.2 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.2636382>) con el campo de fuerza GROMOS96 43a1 y el modelo de agua SPC. El sistema preparado se solvató con moléculas de agua y se neutralizó con la adición de 0.15 M de Na⁺ y Cl⁻. El proceso de minimización de energía involucró 5,000 pasos con el algoritmo “steepest descent”. El sistema se equilibró en dos pasos, NVT (Número de partículas, Volumen y Temperatura constantes) y NPT (Número de partículas, Presión y Temperatura constantes), a 310 °K. Se utilizó el algoritmo de



restricción LINCS para restringir los enlaces y ángulos, mientras que los hidrógenos y las fuerzas electrostáticas de largo alcance se trataron con el algoritmo Particle Mesh Ewald (PME). El termostato de Berendsen y la presión de Parrinello-Rahman se utilizaron para mantener la presión y la temperatura (Abraham et al., 2015; Páll et al., 2014; Pronk et al., 2013; Hess et al., 2008; Essmann et al., 1995; Hess, 2008; Miyamoto & Kollman, 1992; Bussi, Donadio & Parrinello, 2007). La presión se estableció en 1 bar, se utilizó un algoritmo leap-frog para integrar las ecuaciones de movimiento de Newton y el tiempo de simulación se estableció en 50 ns, con lo que se generaron 1,000 cuadros. Las simulaciones se realizaron en 1 nodo con un total de 28 núcleos físicos y 56 núcleos lógicos. El hardware fue un Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2680 v4 @ 2.40GHz y las utilidades GROMACS se utilizaron para analizar las trayectorias de las dinámicas moleculares obtenidas.

Para dibujar los gráficos se extrajeron las tablas de datos de los archivos “.xvg” y se construyeron los gráficos en el software EXCEL. Se utilizó el complemento VMD Timeline versión 2.3 para visualizar y analizar los cambios en los contactos entre ligando y residuo con un corte de distancia de contacto de 4 Å. Al final de la simulación, tomamos los datos PDB del cuadro final y analizamos los residuos interactuantes en este punto con el servidor web “PLIP Protein-Ligand Interaction Profiler” para obtener el mapa de contactos al final de la simulación (Adasme et al., 2021).

Resultados y discusión

Acoplamiento molecular y análisis de interacción

El regulador transcripcional LasR es un homotetrámero y contiene cuatro cadenas (E, F, G y H). Por lo tanto, para nuestros estudios de acoplamiento trabajamos en la cadena E. Después de un acoplamiento exitoso entre los 16 ligandos en el sitio de unión de LasR, se anotaron los puntajes de afinidad de unión (BA) y se eligieron las poses mejor calificadas con la energía de unión más baja para los estudios de interacción más detallados. Se compararon las poses de unión predichas de nuestros ligandos candidatos y el ligando nativo reacoplado con la estructura cristalográfica original. Los resultados mostraron que las poses de unión predichas del ligando nativo reacoplado son muy similares a la estructura cristalográfica experimental (Figura 1a). En la Figura 1 se puede observar que todas las moléculas acopladas adoptan una pose de unión similar dentro del sitio de unión. Esta pose es similar a la del ligando de la estructura experimental, lo cual evidencia la confiabilidad de este método de acoplamiento.

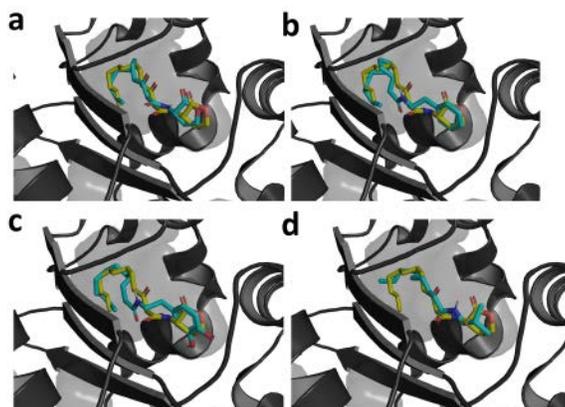


Figura 1. Comparación entre las poses de unión del ligando nativo OHN (amarillo) cristalizado experimentalmente en el sitio de unión de LasR frente a las poses de unión a **a)** OHN reconstituido, **b)** PEA12, **c)** DC12 y **d)** AFF. Todos los ligandos acoplados se representan en cian. El sitio de unión se representa en color negro transparente. La estructura de la proteína se representa en formato “cartoon”

Fuente: elaboración propia

Los resultados de las energías de unión predichas para las *N*-acil amidas acopladas son más bajas que las del ligando nativo reconstituido (Tabla 1). El ligando nativo OHN mostró una energía de unión de $-9.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$, mientras que las *N*-acil amidas mejor calificadas mostraron energías de unión más bajas. DC12 tiene $-9.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$ y PEA12 tiene $-9.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$. La alcanida natural afinina mostró una energía de unión en el rango del ligando nativo (Tabla 1). Estos resultados son interesantes por el hecho de que se ha demostrado que solo los ligandos que presentan mayores afinidades con el sitio catalítico (menores energías de unión) pueden desplazar del este al ligando nativo (Paczkowski et al., 2017).

Tabla 1. Especies químicas y energías de unión de las *N*-acil amidas seleccionadas acopladas al activador transcripcional LasR de *Pseudomonas aeruginosa*

Códigos SMILES	Estructura	Nombre IUPAC	Código Interno	Energía de Unión (Kcal mol ⁻¹)
<chem>CCCCCCCCCCC(=O)NCCC1=C:C:C(O):C(O):C:1</chem>		N-(3,4-dihidroxifenetil) dodecanamida	DC12	-9.6
<chem>CCCCCCCCCCC(=O)NCCc1ccccc1</chem>		<i>N</i> -fenetildodecanamida	PEA12	-9.4
<chem>C/C=C/C=C\C/C=C/C=C/C(=O)NCC(C)C</chem>		<i>N</i> -Isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -decatrienamida	AFF	-8.9
<chem>CCCCCCCCC(=O)CC(=O)N[C@H]1CCOC1=O</chem>		<i>N</i> -3-oxo-dodecanoil- <i>L</i> -homoserina lactona	OHN	-9.0

Fuente: elaboración propia



En la Figura 2 se representan las mejores poses de acoplamiento e interacciones de los residuos de la cadena lateral de la proteína con el ligando en forma de imágenes 3D y 2D. En la simulación del acoplamiento LasR con el ligando nativo OHN, los aminoácidos involucrados en las interacciones dentro de un rango menor a 4 Å son Tyr56, Ser129, Asp73, Trp60 con puentes de hidrógeno; y Leu36, Leu40, Ala50, Ile52, Tyr64, Val76, Cys79, Trp88, Phe101, Ala105, Leu110, Leu125, Ala127 con interacciones no polares (Figura 2a). En conjunto, los resultados muestran que los residuos interactuantes que forman el sitio de unión están presentes en todas las estructuras acopladas y que el sitio de unión está formado principalmente por interacciones no polares como Alquil, Pi-Alquil, Pi-Pi apiladas, Pi-Pi en forma de T y Pi-sigma (Figura 2a-d).

Los resultados del acoplamiento son bastante similares a resultados previos obtenidos por la cristalización experimental de LasR con su auto inductor OHN. Se ha demostrado experimentalmente que OHN forma seis puentes de hidrógeno intermoleculares con LasR que involucran a Tyr56, Trp60, Arg61, Asp73, Thr75 y Ser129 (Bottomley et al., 2007). En particular, estos residuos están fuertemente conservados en los homólogos de LuxR, lo que refleja un mecanismo de activación compartido por las AHL con grupos homoserina lactona similares (Bottomley et al., 2007). La estructura reacoplada de OHN con la cadena E de LasR predijo puentes de hidrógeno similares con Tyr56, Trp60, Asp73 y Ser129, lo que demuestra la confiabilidad de las predicciones de acoplamiento.

En la estructura cristalizada experimentalmente, la cadena acilo de 12 carbonos en OHN se extiende dentro de una cavidad revestida con residuos hidrófobos, algunos de los cuales solo se ven en LasR y no en otros homólogos de LuxR, por ejemplo, Leu40, Tyr47, Cys79 y Thr80 (Bottomley et al., 2007). Nuestros resultados muestran que, en todas las estructuras acopladas, las cadenas acilo de los ligandos se extienden dentro del sitio de unión y están rodeadas por una amplia gama de residuos hidrófobos similares. Dentro de los cuales se encuentran los residuos anteriormente mencionados (Figura 2).

En estudios previos, el modelado de la unión de naringenina a LasR predice que este flavonoide se une preferentemente al mismo sitio que OHN con una afinidad de unión similar, y que no podría establecer contacto con todos los residuos de aminoácidos necesarios para la formación de la estructura de un monómero funcional que puede oligomerizarse, lo que resulta en que OHN no pueda formar un complejo activo estable con LasR en presencia de este flavonoide (Hernando-Amado et al., 2020).

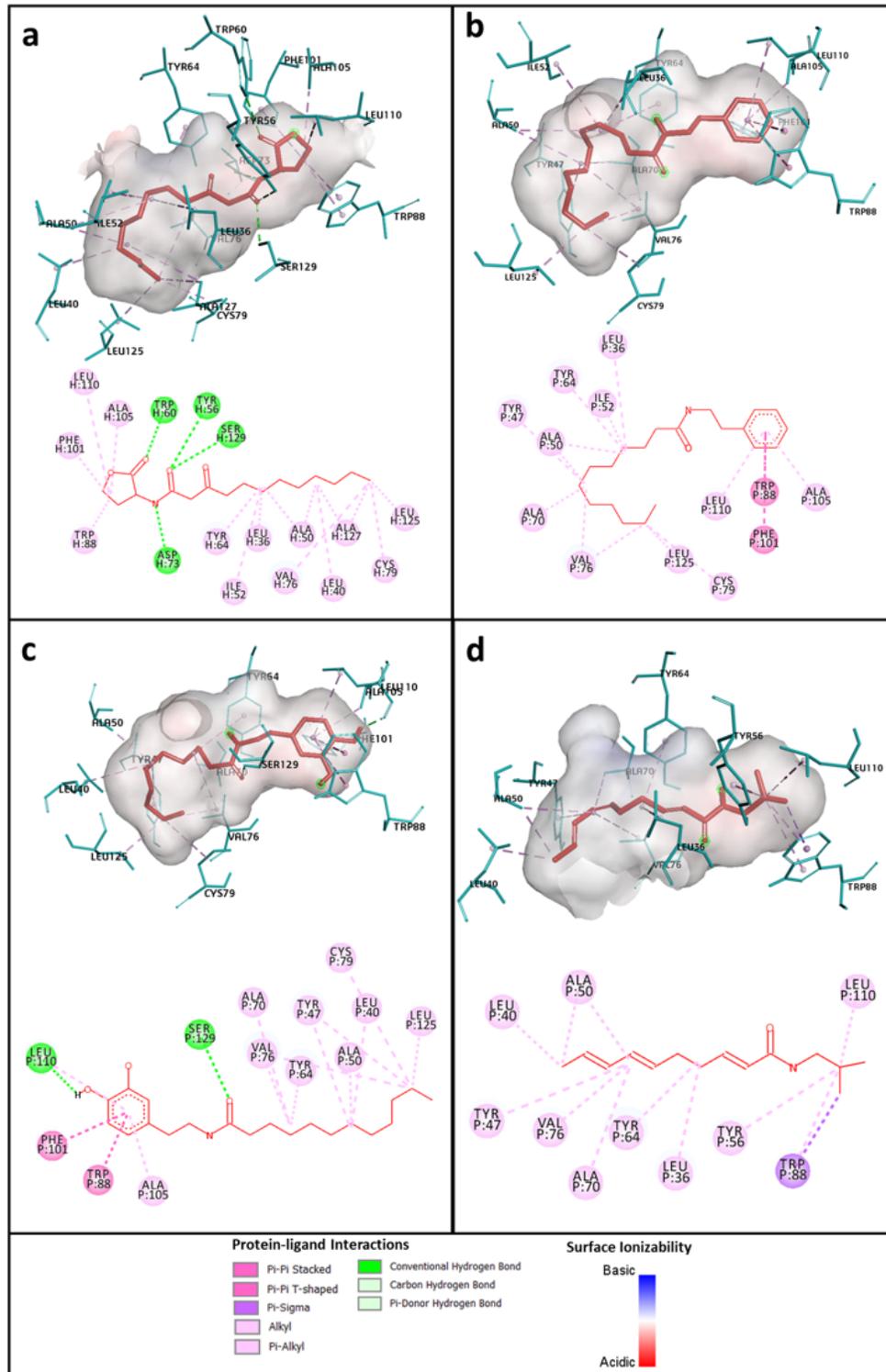


Figura 2. Representación 3D y 2D de las interacciones de los compuestos acoplados **a)** OHN, **b)** PEA12, **c)** DC12 y **d)** AFF dentro del regulador transcripcional LasR. En las representaciones 3D, los ligandos están coloreados en rojo mientras que los residuos que interactúan están coloreados en cian. En los mapas de interacción 2D, los colores en las esferas de residuos representan las interacciones proteína-ligando

Fuente: elaboración propia



Evaluación de la estabilidad de los complejos acoplados utilizando simulaciones de dinámica molecular

Para respaldar los resultados obtenidos mediante el acoplamiento molecular utilizamos simulaciones de dinámicas moleculares de 50 ns para determinar la estabilidad de los complejos proteína-ligando seleccionados. Las simulaciones de dinámicas moleculares (MD) pueden proporcionar no solo abundante información dinámica y estructural sobre las bio-macromoléculas, sino también una gran cantidad de información energética y termodinámica sobre las interacciones proteína-ligando (Liu et al., 2018). Después de realizar la simulación, extrajimos y analizamos las diferencias en la fluctuación y desviación de la raíz cuadrada media de las trayectorias (RMSF, RMSD), el radio de giro (Rg), los puentes de hidrógeno (HBs) y el número de contactos (dentro de 4 Å) de los complejos LasR-OHN, LasR-PEA12, LasR-DC12 y LasR-AFF. El cálculo de la RMSF nos permite evaluar la flexibilidad y estabilidad de cada residuo. Los resultados mostraron que todos los complejos exhibieron distribuciones de RMSF similares, LasR-PEA12 tiene el valor más bajo (SD 0.448), seguido por LasR-OHN (SD 0.585), LasR-DC12 (SD 0.658) y LasR-AFF (SD 0.755); sin embargo, LasR sin ligando (Apo-form) mostró valores generales más altos de RMSF (SD. 0.799) (Figura 3a). Este resultado nos permite inferir que la presencia del ligando genera energías de unión que estabilizan el complejo.

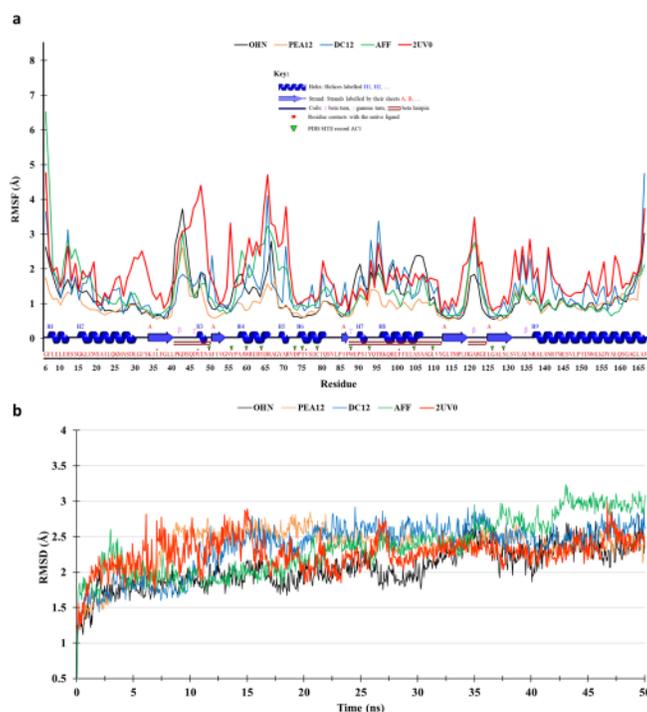


Figura 3. a) RMSF por residuo después de 50 ns de simulación (el eje X detalla las características de la estructura secundaria), **b)** Evolución temporal del RMSD para cada complejo proteína-ligando

Fuente: elaboración propia



Por otro lado, la RMSD del complejo proteína-ligando permite la cuantificación del grado de cambios conformacionales que pueden ocurrir durante las simulaciones. Es decir que nos permite detectar cambios en la topología de los átomos que conforman la columna vertebral de la proteína. Los resultados mostraron que todos los complejos simulados tienen un RMSD promedio entre 2.0-2.6 Å muy similar al de la forma LasR-Apo (2UV0) (2.2 Å) (Figura 3b).

El valor Rg nos proporciona información sobre la dimensión general y la forma de la proteína (Kirchmair et al., 2015), es decir, es un parámetro que mide la compacidad de una proteína. La Figura 4a muestra los valores Rg para todos los complejos ligando-proteína y la forma Apo (2UV0). Los valores Rg promedio fueron 1.50 para LasR-OHN, 1.48 para LasR-DC12, 1,50 para LasR-PEA12, 1,50 para LasR-AFF y 1.50 para la forma Apo. Los resultados de los valores Rg promedio indican que la forma general de la proteína es estable y compacta tras la unión del ligando y durante todo el tiempo de simulación.

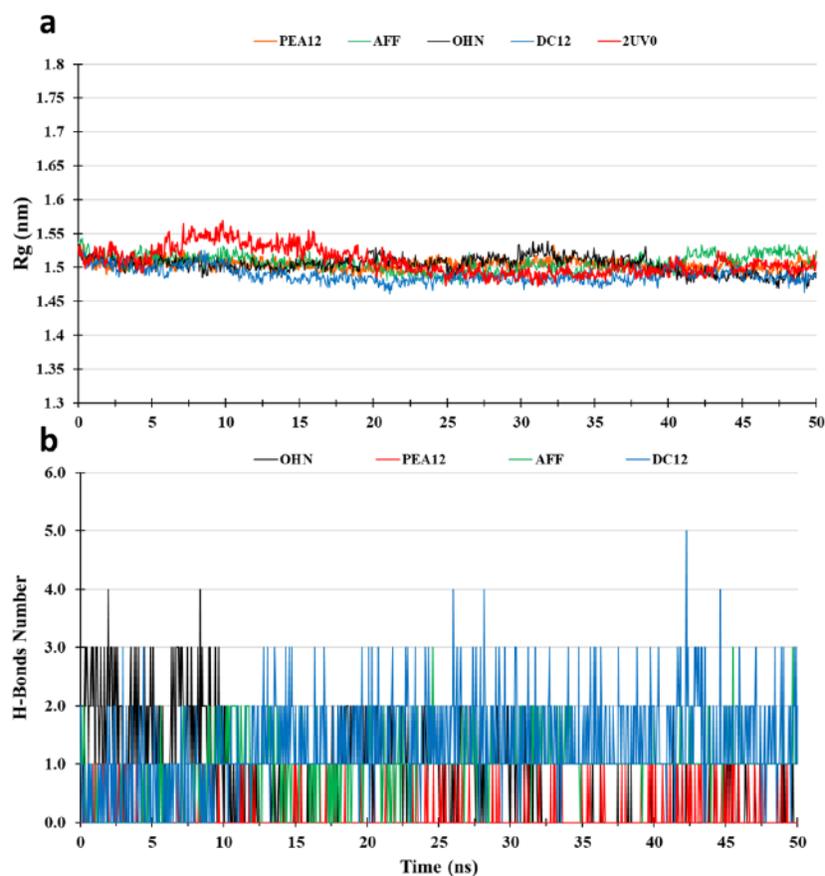


Figura 4. a) Evolución temporal del Rg para cada complejo proteína-ligando. **b)** Enlaces de hidrógeno proteína-ligando durante el tiempo de simulación

Fuente: elaboración propia



El compuesto DC12 mantiene más puentes de hidrógeno (HBs) durante todos los 50 ns de simulación (Figura 4b). Por el contrario, OHN mantiene más HBs solo durante los primeros 10 ns, mientras que AFF y PEA12 mantienen entre 1 y 2 HBs durante la simulación (Figura 4b). Estos análisis nos llevan a predecir la fuerza de unión consistente de los compuestos a lo largo del tiempo de simulación mediante puentes de hidrógeno.

El análisis de contactos entre LasR-OHN (Figura 5) muestra que durante los 50 ns de simulación residuos como Tyr64, Tyr56, Arg61, Trp60, Trp88 y Ser129 mantienen una alta actividad de contacto dentro en un rango menor a 4 Å (Figura 5a). Las *N*-acil amidas sintéticas comparten residuos interactuantes similares. En LasR-PEA12 y LasR-DC12, Trp88, Phe102 y Tyr93 son los residuos que mantienen los valores de interacción más altos durante el tiempo de simulación, mientras que en LasR-AFF los principales residuos interactuantes son Trp60, Trp88 y Tyr56; sin embargo, este complejo proteína-ligando tiene los valores de interacción más bajos (Figura 5a-d). La evidencia experimental muestra que en la estructura cristalizada del complejo LasR-OHN, el grupo 1-oxo del ligando forma puentes de hidrógeno directos tanto con Tyr56 como con Ser129, mientras que el grupo 3-oxo forma puentes de hidrógeno a través de una molécula de agua con la cadena lateral Arg61 (Bottomley et al., 2007).

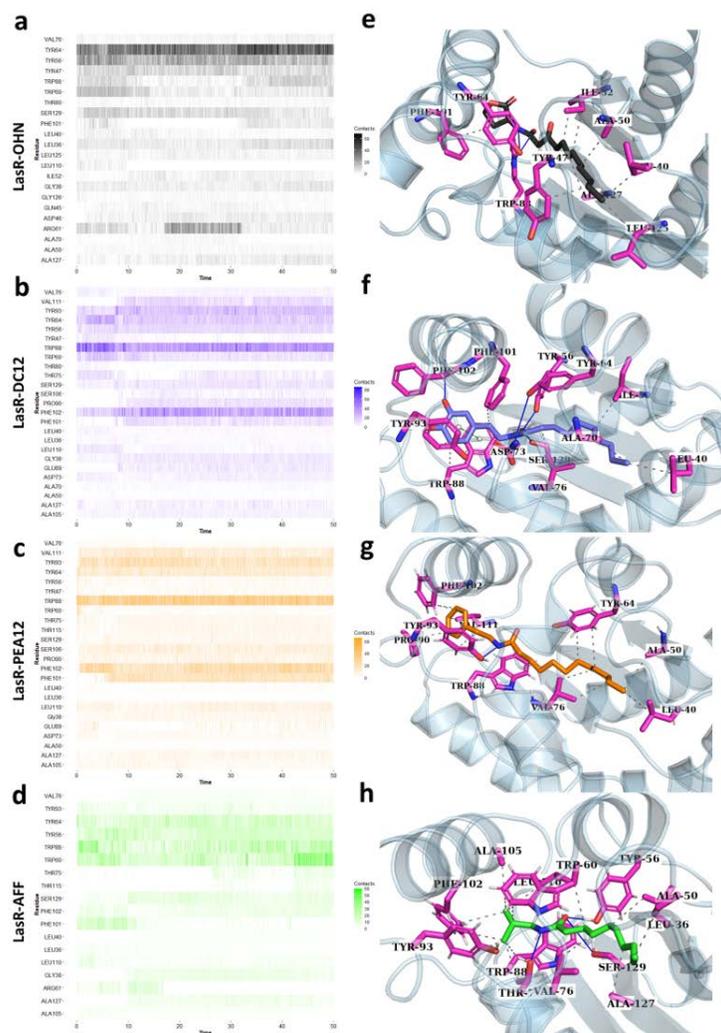


Figura 5. Evolución de interacciones entre aminoácidos y el ligando durante los 50 ns de la simulación y dentro de un rango de interacción de 4 Å. Interacciones entre la proteína LasR con **a-e)** el ligando nativo *N*-3-oxo-dodecanoil-*L*-homoserina lactona (OHN), **b-f)** *N*-(3,4-dihidroxifenetil) dodecanamida (DC12), **c-g)** *N*-fenetildodecanamida (PEA12), **d-h)** *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida (AFF)

Fuente: elaboración propia

Los resultados predicen que, al final del tiempo de simulación, el ligando re-acoplado OHN mantiene enlaces de H con Tyr64 y Trp88 (Figura 5e); mientras que DC12, enlaces de H con Tyr56, Tyr64, Asp73, Phe102, Ser129; y Trp88, enlace apilado Pi-Pi (Figura 5f). AFF tiene enlaces H con Tyr56, Thr75 y Ser129 (Figura 5g); y PEA12, principalmente interacciones hidrofóbicas con solo un enlace de H con Tyr93 (Figura 5h). En un modelo de LasR acoplado con una furanona halogenada se encontró que es probable que la furanona se una a LasR de manera similar al anillo lactona de OHN empaquetándose contra numerosas cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr y Trp) (Bottomley et al., 2007). En este sentido, nuestros resultados predicen que las principales interacciones con las *N*-acilamidas evaluadas y el



sitio de unión de LasR se forman con residuos aromáticos y los residuos que más interactúan durante el tiempo de la simulación son Trp88, Phe102, Tyr93, Phe101 y Tyr64. En el caso de las furanonas, la ausencia de la cadena acilo larga impediría la correcta formación del núcleo hidrofóbico en LasR, porque la cadena acilo de la AHL natural media el empaquetamiento de las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ sobre la lámina β central (Bottomley et al., 2007). Nuestros resultados predicen que la cadena acilo presente en las *N*-acil amidas está bien empaquetada por residuos hidrofóbicos, es decir, DC12 y PEA12 después de los 50 ns de simulación permanece empaquetado dentro de las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ sobre la lámina β central y mantiene interacciones con residuos hidrofílicos como Leu40, Ile52, Ala70 y Val76. Estos resultados muestran que estas *N*-acilamidas sintéticas se unen a residuos que experimentan interacciones estructuralmente importantes y están más estrechamente empaquetadas contra Trp-88, un elemento conservado del sitio de unión de la proteína LasR.

Predicciones farmacocinéticas

Las propiedades farmacocinéticas se describen como la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) de un fármaco y brindan información clave sobre las propiedades terapéuticas. Esta información puede utilizarse para determinar el metabolismo de moléculas candidatas a fármacos (Daina et al., 2017). La regla de Lipinski de 5 predice la similitud con un fármaco en base a los criterios: peso molecular < 500 Dalton, lipofiliidad expresada como LOGP (LOGP < 5), donadores de puentes de hidrógeno (HBD < 5), aceptores de puentes de hidrógeno (HBA < 10) y refractividad molar debe estar entre 40 y 130, lo que indica una buena absorción y permeación a través de la membrana celular (Tabla 2). Para que un fármaco sea eficaz para su administración por vía oral, debe satisfacer al menos cuatro de los cinco criterios, lo que permite distinguir una molécula de un fármaco o de un no fármaco (Bhowmik et al., 2021). Nuestros resultados muestran que las moléculas DC12, PEA12 y AFF presentan valores de AB% $> 50\%$ (Tabla 2). Tanto las *N*-acil amidas sintéticas DC12 como PEA12 cumplen con los criterios de Lipinski, así como la molécula natural AFF (Tabla 2). El coeficiente de permeabilidad en la piel (K_p) indica que cuanto más negativo sea el log K_p (con K_p en cm s^{-1}), menos permeabilidad a la piel tendrá la molécula (Daina et al., 2017). Las moléculas mostraron una predicción de permeabilidad en la piel similar, solo PEA12 tuvo un valor más alto de log K_p .



Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los ligandos seleccionados

Código	Peso Molecular (g mol ⁻¹)	Número de Enlaces Rotables	Número de Aceptores Enlaces-H	Número de Donadores Enlaces-H	TPSA (Å ²)	Absorción (%)	Biodisponibilidad	Accesibilidad Sintética	Solubilidad en Agua
DC12	301.38	14	3	3	69.56	85.00	0.55	2.44	Moderadamente soluble
AFF	221.34	8	1	1	29.1	98.96	0.55	3.02	Soluble
OHN	297.39	12	4	1	72.47	84.00	0.55	3.05	Moderadamente soluble
PEA12	303.48	14	1	1	29.1	98.96	0.55	2.19	Poco soluble

Fuente: <http://www.swissadme.ch/index.php>

Las predicciones muestran que DC12, PEA12 y AFF exhiben una buena capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB absorption) y una excelente absorción intestinal humana (GI absorption). Estos resultados confirman la predicción de buena absorción del fármaco (AB%). Por otro lado, las predicciones muestran que no todas las moléculas son sustratos de la glicoproteína P (P-gp). El conocimiento sobre la interacción de los fármacos con los citocromos P450 (CYP) es esencial. Esta superfamilia de isoenzimas es un actor clave en la eliminación de fármacos a través de la biotransformación metabólica (Daina et al., 2017; Testa & Krämer, 2007). La inhibición de estas isoenzimas puede provocar efectos adversos tóxicos u otros efectos adversos no deseados debido a la menor depuración y acumulación del fármaco o sus metabolitos (Kirchmair et al., 2015).

La predicción de la inhibición de los CYP muestra que AFF es la única molécula que no inhibe ninguno de los cuatro CYP. Por otro lado, se predice que DC12 inhibe CYP2C19, CYP2C9 y CYP3A4; PEA12, cuatro de los cinco CYP (1A2, 2C19, 2D6 y 3A4); mientras que el ligando nativo OHN, CYP1A2 y CYP2C19. Se sabe que el CYP1A2 se expresa en el hígado y representa aproximadamente del 13-15% del contenido total de CYP, contribuyendo al metabolismo de aproximadamente el 4% de los fármacos comercializados (Kato, 2020). La familia CYP2C representa aproximadamente el 20% de los P450 hepáticos, y el CYP2C9 es responsable de la depuración hepática del 15% de los fármacos clínicamente relevantes (Kato, 2020).

Tabla 3. Predicciones de las propiedades farmacocinéticas de los ligandos seleccionados

Código Interno	Violaciones Lipinski	Absorción GI	Permeabilidad BBB	Sustrato P-gp	Inhibidor CYP1A2	Inhibidor CYP2C19	Inhibidor CYP2C9	Inhibidor CYP2D6	Inhibidor CYP3A4	log Kp (cm/s)
DC12	0	Alta	Si	No	Si	No	No	Si	Si	-5.19
AFF	0	Alta	Si	No	No	No	No	No	No	-5.12
OHN	0	Alta	Si	No	Si	Si	No	No	No	-5.2
PEA12	1	Alta	Si	No	Si	Si	No	Si	Si	-3.42

Fuente: <http://www.swissadme.ch/index.php>



El CYP2D6 metaboliza aproximadamente el 30% de todos los fármacos comercializados, aunque representa solo del 2-4% de todos los CYP hepáticos humanos (Kato, 2020). El CYP3A4 es la isoforma de CYP hepático humano más abundante y es responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos conocidos (Kato, 2020). Los resultados anteriores brindan información sobre las propiedades ADMET de las N-acil amidas teorizadas y ayudan a reducir el riesgo de interacciones fármaco-fármaco debido a la inhibición e inducción del CYP. Sin embargo, todas las predicciones de estos métodos *in silico* en la web deben considerarse con cautela (Guéniche et al., 2021).

Conclusiones

El presente estudio presenta evidencia teórica de que las moléculas candidatas presentan una mayor afinidad, lo que sugiere una mayor probabilidad de interacción y, por lo tanto, un potencial efecto biológico. El análisis de interacciones mostró que DC12 y PEA12 interactúan con aminoácidos estructuralmente importantes, así como altamente conservados en proteínas homólogas, lo cual puede indicar selectividad que es importante para minimizar los efectos secundarios. Las simulaciones de las dinámicas moleculares mostraron estabilidad de los complejos proteína-ligando, lo cual sugiere una interacción más duradera y un potencial efecto terapéutico. Las predicciones farmacocinéticas indican que DC12 y PEA12 tienen cualidades similares a los fármacos y aprueban la regla de 5 de Lipinski; sin embargo, en el caso de PEA12 hay que poner especial atención, ya que puede interactuar con proteínas asociadas a la desintoxicación durante el metabolismo del fármaco.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.

Referencias

- Bhowmik, D., Sharma, R. D., Prakash, A., & Kumar, D. (2021). Identification of Nafamostat and VR23 as COVID-19 drug candidates by targeting 3CLpro and PLpro. *Journal of molecular structure*, 1233, 130094. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130094>
- Bottomley, M. J., Muraglia, E., Bazzo, R., & Carfi, A. (2007). Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13592-13600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700556200>



- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., & Burden of AMR Collaborative Group (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, *19*(1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Chugani, S., & Greenberg, E. P. (2014). An evolving perspective on the *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum sensing regulator QscR. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *4*, 152. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00152>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, *7*, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, *67*(3), 351–368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, *20*(9), 2444–2449. <https://doi.org/10.1021/bi00512a013>
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., & Givskov, M. (1996). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Molecular microbiology*, *20*(1), 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02495.x>
- Geske, G. D., Wezeman, R. J., Siegel, A. P., & Blackwell, H. E. (2005). Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(37), 12762–12763. <https://doi.org/10.1021/ja0530321>
- Guéniche, N., Huguet, A., Bruyere, A., Habauzit, D., Le Hégarat, L., & Fardel, O. (2021). Comparative in silico prediction of P-glycoprotein-mediated transport for 2010–2020 US FDA-approved drugs using six Web-tools. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, *42*(8), 393–398. <https://doi.org/10.1002/bdd.2299>
- Hernando-Amado, S., Alcalde-Rico, M., Gil-Gil, T., Valverde, J. R., & Martínez, J. L. (2020). Naringenin Inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Response Is Based on Its Time-Dependent Competition With



- N-(3-Oxo-dodecanoyl)-L-homoserine Lactone for LasR Binding. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 25. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00025>
- Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*, 10(4), 441–451. <https://doi.org/10.1586/erp.10.49>
- Kato, H. (2020). Computational prediction of cytochrome P450 inhibition and induction. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 35(1), 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2019.11.006>
- Kirchmair, J., Göller, A. H., Lang, D., Kunze, J., Testa, B., Wilson, I. D., ... & Schneider, G. (2015). Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? *Nature reviews Drug discovery*, 14(6), 387-404. <https://doi.org/10.1038/nrd4581>
- Kirchmair, J., Göller, A. H., Lang, D., Kunze, J., Testa, B., Wilson, I. D., ... & Schneider, G. (2015). Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? *Nature reviews Drug discovery*, 14(6), 387-404. <https://doi.org/10.1038/nrd4581>
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., & Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular microbiology*, 21(6), 1137–1146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00063.x>
- Leishman, E., & Bradshaw, H. B. (2015). N-acyl amides: Ubiquitous endogenous cannabimimetic lipids that are in the right place at the right time. En V. Di Marzo & J. Wang (eds.), *The Endocannabinoidome: The World of Endocannabinoids and Related Mediators* (pp. 33-48). Academic Press.
- Liu, X., Shi, D., Zhou, S., Liu, H., Liu, H., & Yao, X. (2018). Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 13(1), 23-37. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., & Ramírez-Chávez, E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4700–4704. <https://doi.org/10.1021/jf034374y>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature reviews. Microbiology*, 17(6), 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Mulholland, E.K.; Adegbola, R.A. (2005) Bacterial infections—a major cause of death among children in Africa. *The New England journal of medicine*, 352(1) 75–77. <https://doi.org/10.1056/nejme048306>



- O'Brien, K. T., Noto, J. G., Nichols-O'Neill, L., & Perez, L. J. (2015). Potent irreversible inhibitors of LasR quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS medicinal chemistry letters*, 6(2), 162-167. <https://doi.org/10.1021/ml500459f>
- Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., Mccready, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., et al. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>
- Testa, B., & Krämer, S. D. (2007). The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chemistry & biodiversity*, 4(3), 257–405. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790032>
- Vázquez-Martínez, J., Nieto-Álvarez, E., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2018). Enzymatic method for N-acyl homoserine lactones synthesis using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Catalysis Letters*, 148, 62-67. <https://doi.org/10.1007/s10562-017-2261-8>
- Wagner, V.E., Li, L.L., Isabella, V.M., and Iglewski, B.H. (2007). Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 469–479. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0964-6>
- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313-320. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
- Wysoczynski-Horita, C. L., Boursier, M. E., Hill, R., Hansen, K., Blackwell, H. E., & Churchill, M. E. (2018). Mechanism of agonism and antagonism of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator QscR with non-native ligands. *Molecular microbiology*, 108(3), 240-257. <https://doi.org/10.1111/mmi.13930>