

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL

MAYUME MARTINS SANTANA

Interação entre Lipoxina A4 (LXA4) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos
(PAMPs) de *Streptococcus pneumoniae*: análise *in silico* por bioinformática

ITUIUTABA-MG

2024

MAYUME MARTINS SANTANA

Interação entre Lipoxina A4 (LXA4) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) de *Streptococcus pneumoniae*: análise *in silico* por bioinformática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências
Biológicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Karine Rezende
de Oliveira

ITUIUTABA-MG

2024

MAYUME MARTINS SANTANA

Interação entre Lipoxina A4 (LXA4) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos
(PAMPs) de *Streptococcus pneumoniae*: análise *in silico* por bioinformática

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Exatas e Naturais do Pontal da
Universidade Federal de Uberlândia
como requisito para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências
Biológicas

Ituiutaba, 04 de novembro de 2024.

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Luciana Karen Calábria
Universidade Federal de Uberlândia-ICENP

Prof. Dr. Siomar de Castro Soares
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

Profª. Dra. Karine Rezende de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia-ICENP

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Sueli Salete Martins e Valdir Vieira Santana, ao meu irmão Matheus Martins Santana e a minha avó Maria Salete Martins que me apoiaram durante toda minha vida acadêmica, me aconselhando nos momentos em que mais precisei. Além do meu namorado Paulo Henrique do Prado Almeida, por me aconselhar e orientar durante o desenvolvimento da pesquisa.

Devo grandes agradecimentos a minha orientadora Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira por acreditar em meu potencial, no meu trabalho e de me proporcionar diversos ensinamentos tanto profissional quanto acadêmico, pois é uma pessoa e profissional que eu admiro muito.

Agradeço aos colaboradores deste trabalho Prof. Dr. Siomar de Castro Soares, Andrei Giacchetto Felice e Igor Adão Lima, que aceitaram nos ajudar nesta pesquisa dando todo suporte necessário, ensinando e contribuindo na análise dos resultados obtidos.

Agradeço à banca examinadora: Profa. Dra. Luciana Karen Calábria e Prof. Dr. Siomar de Castro Soares pelo aceite e pelas valiosas considerações. Esta pesquisa só foi realizada e finalizada graças a todo trabalho em equipe e tempo investido.

Finalmente, agradeço a instituição Universidade Federal de Uberlândia que me acolheu durante todos estes anos e a todos os meus professores que fizeram parte da minha trajetória, e que me ensinaram tudo o que eu poderia saber para ser uma excelente bióloga.

RESUMO

A *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria diplococo gram-positiva que coloniza a nasofaringe humana sendo um dos principais causadores da pneumonia. A *S. pneumoniae* possui vários patógenos como a pneumolisina, protease de imunoglobulina A1, metaloprotease de zinco (ZmpC), adesina de superfície pneumocócica A (PsaA), peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase que podem desencadear vários tipos de respostas imunes. O mediador lipídico Lipoxina A4 (LXA4) é derivado do Ácido Araquidônico (AA) e está associado aos mediadores especializados pró-resolutivos (SPMs) considerados, nas últimas décadas, como potenciais alvos terapêuticos associados à melhora na resolução do processo inflamatório. Neste trabalho, o objetivo geral é avaliar *in silico* a interação entre a LXA4 e estes PAMPs da bactéria. A revisão literária foi realizada por meio do PubMed, Scielo e Periódicos Capes. Os bancos de dados UniProt, Protein Data Bank, Alphafold Protein Structure Database, LIPID MAPS e KEGG foram utilizados para obter códigos de acesso dos alvos e do ligante (LXA4), visualizar as estruturas proteicas em 3D dos PAMPs, analisar a estrutura química do lipídio e validar a via metabólica da LXA4. Os resultados do *docking* molecular mostraram ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante LXA4 e os PAMPs. Para validar as interações obtidas, dinâmica molecular foi realizada e revelou estabilidade e flutuações suaves entre LXA4 e a ZmpC, pneumolisina e protease de IgA1, sugerindo que o mediador lipídico possa modificar a estrutura e funções destes PAMPs, favorecendo e proporcionando os mecanismos adequados da resposta imune inata e humoral. Para elucidar se as interações identificadas até o presente momento poderiam interferir positivamente na resolução da pneumonia pela bactéria, experimentos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo* serão necessários. No entanto, o presente trabalho fornece novos *insights* sobre a interação entre a LXA4 e os PAMPs descritos do patógeno, sugerindo que o mediador lipídico possa ter um papel positivo na resposta imune contra pneumonia induzida pela bactéria *S. pneumoniae*.

Palavras-chave: ZmpC. Protease de IgA1. Dinâmica molecular

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a gram-positive diplococcus bacterium that colonizes the human nasopharynx and is one of the main causes of pneumonia. *S. pneumoniae* possesses various antigenic molecules, also considered Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), such as pneumolysin, immunoglobulin A1 protease, zinc metalloprotease (ZmpC), pneumococcal surface adhesin A (PsaA), peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, which can trigger different types of immune responses. The lipid mediator Lipoxin A4 (LXA4) is derived from Arachidonic Acid (AA) and has been associated with specialized pro-resolving mediators (SPMs), considered over the past few decades as potential therapeutic targets related to improving the resolution of the inflammatory process. In this study, the general objective is to evaluate, *in silico*, the interaction between LXA4 and these PAMPs of the bacterium using bioinformatics platforms. The literature review was conducted through PubMed, Scielo, and Capes Journals. The UniProt, Protein Data Bank, AlphaFold Protein Structure Database, LIPID MAPS, and KEGG databases were used to obtain the access codes for the targets and the ligand (LXA4), visualize the 3D protein structures of the PAMPs, analyze the lipid's chemical structure, and validate the LXA4 metabolic pathway. The molecular docking results showed hydrogen bonds and hydrophobic interactions between the ligand and the PAMPs. To validate the obtained interactions, molecular dynamics simulations were performed, showing stability and smooth fluctuations between LXA4 and ZmpC, pneumolysin, and IgA1 protease, suggesting that the lipid mediator may modify the structures and functions of these PAMPs, favoring and promoting the mechanisms of appropriate innate and humoral immune responses. To elucidate whether the interactions identified so far could positively interfere with the resolution of pneumonia by the bacterium, *in vivo*, *in vitro* or *ex vivo* experiments will be needed to validate the computational biology data obtained. Nevertheless, the present study provides new insights into the interaction between LXA4 and the described PAMPs of the pathogen, suggesting that the lipid mediator may play a positive role in the immune response against pneumonia induced by *S. pneumoniae*.

Keywords: ZmpC. Protease of IgA1. Molecular dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Via metabólica da Lipoxina A4 (LXA4)18
- Figura 2- Ligações de hidrogênio, aminoácidos com interações e interações hidrofóbicas entre LXA4 e Pneumolisina (A), Protease IgA1 (B) ZmpC (C). Interações químicas em formato em 3D, respectivamente (2D, 2E e 2F).....24
- Figura 3- Ligações de hidrogênio, aminoácidos com interações e interações hidrofóbicas entre LXA4 e PsaA (A) e Peptidoglicano -N-acetilglucosamina desacetilase (B). Interações químicas em formato em 3D, respectivamente (2C e 2D) 24
- Figura 4- Gráficos representativos da dinâmica molecular. (A) O RMSD mostrou a estabilidade de complexo LXA4-IgA1 (linha preta) com variação de posição de 0,015 nm à 0,08 nm e, o RMSF da flutuação (C) com variação de 0,022 nm à 0,035 nm. (B) O RMSD apresentou a estabilidade do complexo LXA4- Pneumolisina (linha preta) e o RMSF da flutuação (D) com variação de 0,04 nm à 0,1 nm..... 27
- Figura 5- Gráficos representativos da dinâmica molecular. (A) O RMSD mostrou a estabilidade do complexo LXA4-ZmpC (linha preta) com variação de posição de 0,001 nm à 0,013 nm. (B) RMSD com escala menor para melhor visualização do resultado. (C) RMSF da flutuação com variação de 0,02 nm à 0,076 nm 28
- Figura 6- Gráficos representativos da dinâmica molecular. (A) O RMSD mostrou a estabilidade de complexo LXA4-Peptidoglicano (linha preta) com variação de posição de 0,015 nm à 0,08 nm e, o RMSF da flutuação (C) com variação de 0,057 nm à 0,12 nm. (B) O RMSD apresentou a estabilidade do complexo LXA4-PsaA (linha preta) e o RMSF da flutuação (D) com variação de 0,03 nm à 0,064 nm.. 29

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Identificação, código de acesso (<i>PDB</i> e do <i>AlphaFold</i>), <i>chemplp</i> (score), ligações de hidrogênio, aminoácidos com interações e interações hidrofóbicas entre LXA4 e PAMPs de <i>S. pneumoniae</i> | 25 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| DPI | Doença pneumocócica invasiva |
| SDRA | Síndrome do desconforto respiratório agudo |
| PAMPs | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> |
| ZmpC | Metaloprotease de zinco |
| PsaA | Adesina de superfície pneumocócica A |
| TLR4 | <i>Toll-like receptor 4</i> |
| TLR2 | <i>Toll-like receptor 2</i> |
| TLR9 | <i>Toll-like receptor 9</i> |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral-alfa |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-23 | Interleucina-23 |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento-beta |
| IgA1 | Imunoglobulina A1 |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| PSGL-1 | Glicoproteína ligante de P-selectina |
| MMP-9 | Metaloproteinase de matriz humana 9 |
| AECs | Células epiteliais das vias aéreas |
| CDs | Células dendríticas |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| MCP-1 | <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> |
| HMGB1 | <i>High mobility group box 1</i> |
| NETs | <i>Neutrophil extracellular traps</i> |
| IRAKs | <i>IL-1 receptor-associated kinase</i> |
| IRF | Fator regulador de interferon |
| NF- κ B | Fator nuclear κ B |
| AP-1 | <i>AP-1-family transcription factors</i> |
| ATFs | <i>Activating transcription factors</i> |
| HIF1 α | <i>Hypoxia-inducible factor-1α</i> |
| AMP | Peptídeos antimicrobianos |
| iNO | Óxido nítrico induzível |

| | |
|----------------------|--|
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| NRF2 | Fator de transcrição oxidativo |
| NE | Elastase de neutrófilos |
| MPO | Mieloperoxidase |
| SPMs | Mediadores especializados pró-resolutivos |
| LXs | Lipoxinas |
| ILC2 | <i>Type 2 innate lymphoid cells</i> |
| ALX/FPR2 | Receptores peptídicos formilados |
| COXs | Ciclooxigenases |
| LOXs | Lipoxigenases |
| CYP450 | Citocromo P450 |
| 5-LO | 5-lipoxigenase |
| 12-LO | 12-lipoxigenase |
| 15-LO | 15-lipoxigenase |
| PTP-CPS4B | Proteína tirosina fosfatase |
| SF-2312 | 1,5-di-hidroxi-2-oxopirrolidin-3-il)-hidroxi-dioxidofosfânio |
| ps | Picosegundos |
| K | Kelvin |
| nm | Nanômetros |
| RMSD | <i>Root-mean-square deviation</i> |
| RMSF | <i>Root-mean-square fluctuation</i> |
| <i>S. pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| <i>T. pallidum</i> | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>M. pneumoniae</i> | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| Asn | Asparagina |
| Lys | Lisina |
| Thr | Treonina |
| Leu | Leucina |
| Ser | Serina |
| Asp | Aspartato |
| Phe | Fenilalanina |
| Val | Valina |
| Gly | Glicina |

| | |
|------|------------------------------|
| Ile | Isoleucina |
| Glu | Glutamato |
| Pro | Prolina |
| His | Histidina |
| Trp | Triptofano |
| mAbs | <i>Monoclonal Antibodies</i> |

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------|----|
| 1-INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2.-OBJETICO GERAL..... | 20 |
| 2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 20 |
| 3-METODOLOGIA..... | 21 |
| 3.1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 21 |
| 3.2- <i>DOCKING</i> MOLECULAR..... | 21 |
| 3.3- DINÂMICA MOLECULAR..... | 22 |
| 4-RESULTADOS..... | 23 |
| 5-DISCUSSÃO..... | 30 |
| 6-CONCLUSÃO..... | 35 |
| 7- REFERÊNCIAS..... | 36 |

1-INTRODUÇÃO

A *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria diplococo Gram-positiva que coloniza a nasofaringe humana (Fraga-Silva *et al.*, 2022), sendo um dos principais causadores da otite média, meningite, septicemia e pneumonia (Marquart, 2021). A *S. pneumoniae* possui mais de 90 sorotipos distintos, com capacidade de causar infecções leves e graves. As doenças pneumocócicas podem ser classificadas como doença pneumocócica invasiva (DPI) e não invasivas, sendo as DPI uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre crianças, idosos e indivíduos com alto risco acometidos por outras doenças (Conicet, 2024). Anualmente, há cerca de 600 mil internações por Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) e no Brasil, no ano de 2022, foi registrado aproximadamente 44.523 mortes por pneumonia (SBPT, 2022).

A *S. pneumoniae* possui vários padrões associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern*) como a pneumolisina, protease de imunoglobulina A1 (IgA1), metaloprotease de zinco (ZmpC), adesina de superfície pneumocócica A (PsaA), peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase que podem desencadear vários tipos de resposta imune. A pneumolisina produzida por *S. pneumoniae* exerce efeitos diversos nas células e tecidos pulmonares, como ruptura da integridade da membrana, estimula produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-12) e adesão celular, participa de processos envolvidos na apoptose, sinalização celular via *Toll-like receptor 4* (TLR4), alterações histopatológicas, necrose, edema e infiltração neutrofílica (Chiu *et al.*, 2019). Além disso a pneumolisina é uma toxina formadora de poros liberada durante o crescimento, sendo um importante PAMP na virulência do patógeno (Gil; Noursadeghi; Brown, 2022).

Outro PAMP importante na infecção pneumocócica é a protease de IgA1 que pode clivar a IgA1 humana, lisando a região dobradiça do fragmento Fc da IgA1 deixando a porção Fab ligada à bactéria (Marquart, 2021) e desta forma, aumentando a adesão às células epiteliais, promovendo a patogênese, contornando os efeitos protetores da IgA1 humana (Janoff *et al.*, 2014).

Foi evidenciado que a ZmpC também contribui para a patogenicidade *S. pneumoniae*. Ao clivar a glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1) encontrada em leucócitos, degradando seu domínio *N*-terminal, a ZmpC diminui a adesão de neutrófilos à P-selectina das células endoteliais, intervindo na migração para os sítios de infecção e inibindo o influxo destes leucócitos para os pulmões de camundongos (Surewaard *et al.*, 2013). Foi demonstrado que camundongos inoculados com a cepa mutante de ZmpC do sorotipo TIGR4 de *S. pneumoniae*, tiveram maior sobrevivência e que o PAMP está envolvido na clivagem da

metaloproteinase de matriz humana 9 (MMP-9) (Oggioni *et al.*, 2003) responsável por modular a barreira hematoencefálica, tendo papel importante em meningites bacterianas, dentre elas, a meningite pneumocócica (Leppert *et al.*, 2000).

A PsaA, uma lipoproteína expressa por todos os sorotipos de *S. pneumoniae*, faz parte do sistema de transporte do cassete de ligação ATP (*ATP-binding cassette*) sendo importante para o crescimento e capacidade de aderir-se às células pulmonares. Animais mutantes para PsaA possuem deficiência no transporte de Mn^{2+} afetando o crescimento, adesão, sensibilidade e estresse oxidativo, sendo importante na sobrevivência do patógeno durante o processo infeccioso (Rajam *et al.*, 2008).

Outros estudos mostraram que a inativação do gene *PDGA* que codifica a peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase de *S. pneumoniae*, pode acarretar na hipersensibilidade da bactéria à lisozima exógena (Vollmer; Tomasz, 2000) uma proteína antimicrobiana com capacidade de hidrolisar o peptidoglicano da parede celular bacteriana e ativar receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês, *NOD-like receptors*) em células epiteliais, conferindo ativação de fagócitos na resposta imune (Ragland; Criss, 2017). A resistência à lisozima deve-se a filamentos de glicanos que possui resíduos de glicosamina não acetilada e, que, ao serem inativados, conferem aos pneumococos a produção de resíduos *N*-acetilados, tornando-os hipersensíveis à lisozima (Vollmer; Tomasz, 2000; Vollmer; Tomasz, 2002).

Em relação à resposta imune à *S. pneumoniae*, após a infecção, observa-se que há uma interação entre esta bactéria e células epiteliais das vias aéreas (AECs) tipo II, macrófagos alveolares e células dendríticas (CDs) por meio do reconhecimento de PAMPs por receptores de reconhecimento de padrões (PRR). TLR2, TLR4 e TLR9 podem reconhecer constituintes da parede celular do patógeno, como ácido lipoteicoico pneumocócico e peptideoglicanos, pneumolisina e *motifs* de CpG respectivamente. Ao serem ativadas, as CDs produzem o fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas, como CXCL1 e CXCL2 (Fraga-Silva *et al.*, 2022) que atuam no recrutamento de neutrófilos (Raquil *et al.*, 2008).

AECs podem produzir S100A9 e S100A8, alarminas que induzem o influxo de neutrófilos e que estimulam as AECs a produzirem citocinas MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein- 1*), IL-6 e a quimiocina (CXCL8) envolvidas na sobrevivência destes leucócitos (Kim *et al.*, 2020). Ao se ligar com TLR4, a S100A9 estimula ainda mais a sua produção e da HMGB1 (*High mobility group box 1*), uma pró-alarmina inflamatória, que juntas promovem a liberação de NETs (*Neutrophil extracellular traps*), utilizadas para restringir a propagação bacteriana. A adesão pneumocócica e o fator de virulência A, auxiliam no reconhecimento e fagocitose de pneumococos por CDs, que liberam IL-1 β , IL-6, IL-23 e

TGF- β promovendo a diferenciação das células T CD4⁺ em células Th17. Esta subpopulação de células produz a citocina IL-17 que induz inflamação rica em neutrófilos e estimula a produção de substâncias antimicrobianas, além da IL-22, que participa da contração da musculatura lisa das vias aéreas, bem como na deposição de colágeno e produção da S100A9 (Fraga-Silva *et al.*, 2022).

Na imunidade adaptativa às bactérias extracelulares como *S. pneumoniae*, os mecanismos efetores usados pelos anticorpos para combater infecções incluem neutralização (mediada por IgG, IgM e IgA), opsonização (por meio das subclasses IgG1 e IgG3 da IgG) e ativação do complemento (por meio de IgM, IgG1 e IgG3) (Abbas; Lichtman; Pillai, 2023). Em um estudo, Wilson e colaboradores (2015) mostraram que a imunidade celular mediada por células de perfil Th17 são importantes contra patógenos ao promoverem o recrutamento de neutrófilos a partir da produção da citocina IL-17. Além disso, utilizando modelo murino de colonização nasofaríngea pela cepa EF3030 de *S. pneumoniae* do sorotipo 19F, os níveis de IgG aumentaram significativamente nos animais infectados com esta cepa em comparação ao grupo controle, evidenciando que além da resposta imune promovida por células Th17, também é necessário resposta imune humoral para a proteção contra *S. pneumoniae*.

Macrófagos que expressam TLR4 podem atuar na defesa antimicrobiana, uma vez que este receptor está envolvido na produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios (que atuam de forma parácrina e autócrina) nestas células. TLRs sinalizam com auxílio de proteínas adaptadoras, como MyD88 e TRIF, que juntamente com os IRAKs (*IL-1 receptor-associated kinase*), forma um complexo de sinalização que ativa proteínas quinases ERK, JNK e p38, membros da família MAP quinase. A via de sinalização TRIF ativa o fator regulador de interferon (IRF) e o fator nuclear κ B (NF- κ B). Já a via de sinalização por MyD88 ativa o fator de transcrição AP-1 (*AP-1-family transcription factors*), ATFs (*activating transcription factors*) e HIF1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*). Toda esta sinalização e ativação de fatores de transcrição desencadeiam a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (AMP), óxido nítrico induzível (iNO), síntese de iNOS e proteínas de autofagia. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a sinalização, pode acarretar em estresse oxidativo que leva à ativação do fator de transcrição oxidativo (NRF2), levando à expressão de genes associados a síntese de ROS, metabólitos e também autofagia, regulando positivamente a transdução de sinal e regulação transcricional na defesa antibacteriana (Sweet *et al.*, 2024).

Nas últimas décadas, os mediadores especializados pró-resolutivos (SPMs) vem sendo considerados como novos alvos terapêuticos (Papanicolaou *et al.*, 2020), pois medeiam a depuração de leucócitos além de restaurar a integridade da barreira epitelial, promovendo a

resolução do processo inflamatório, reduzindo o tráfego adicional de leucócitos, eliminação de células em processo apoptótico, dentre outros. Existe na literatura cinco famílias que constituem os SPMs, sendo as lipoxinas (LXs) derivadas do ácido araquidônico (AA), resolvinas derivadas do ácido eicosapentaenóico (EPA) e as do ácido docosahexaenóico (DHA), denominadas protetinas e maresinas (Dalli *et al.*, 2015).

O ácido 5,6,15L-trihidroxi-7,9,11,13-icosatetraenóico foi descoberto em 1984 quando pesquisadores descreveram uma série de compostos derivados do AA com estruturas tetraeno conjugadas (Serhan; Hamberg; Samuelsson, 1984a). Em outro estudo, propuseram o nome Lipoxina A4 (LXA4) para este ácido (Serhan; Hamberg; Samuelsson, 1984b), tratando-se de um mediador lipídico com ação anti-inflamatória que atua na resolução da inflamação (Planagumà *et al.*, 2008) e como agonista dos receptores peptídicos formilados ALX/FPR2, que são expressos por vários leucócitos (Barnig; Levy, 2013).

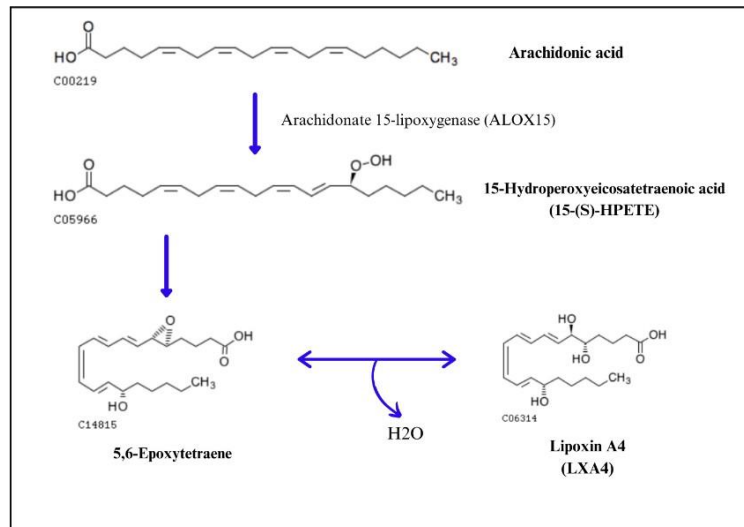
Estudos mostram que Lipoxina A4 (LXA4) pode contribuir na evolução da pneumonia induzida por *S. pneumoniae* (Papanicolaou *et al.*, 2020; Siegel *et al.*, 2021). Camundongos com lesão pulmonar aguda causada por infecção pneumocócica induzida por *S. pneumoniae*, mostraram que a inibição da LXA4 e do receptor de resolvina D1 (RvD1) prejudica a resposta do hospedeiro à lesão. Os receptores ALX/FPR2 do mediador lipídico LXA4 foram bloqueados pelo seu antagonista WRW4 provocando piora da lesão pulmonar e outros sintomas, associando o WRW4 aos níveis aumentados de bacteremia (ou septicemia), além de diminuir os níveis de várias citocinas sintetizadas (IL-1 β , IL-2, CXCL9, CXCL10, IFN- γ e TNF- α). Tal ocorrência evidencia que LXA4 e RvD1 estejam relacionadas à resolução da lesão, já que a sua presença poderia promover redução do edema, restauração da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar pulmonar e aumento da depuração bacteriana, podendo ser utilizados para fins terapêuticos a fim de melhorar a defesa do indivíduo e reduzir a gravidade da patologia mencionada (Siegel *et al.*, 2021).

Dalli e colaboradores (2015) analisaram a regulação da pró-resolução nos perfis de mediadores lipídicos por meio da inoculação do monóxido de carbono (CO) no modelo de pneumonia induzida por *S. pneumoniae*. Antes da infecção pela bactéria, leucócitos do sangue periférico de babuínos exibiam um fenótipo pró-resolutivo com níveis elevados de SPMs (incluindo lipoxinas). Após a infecção, os animais tiveram níveis plasmáticos de mediadores lipídicos reduzidos, como as lipoxinas, e, estes foram restabelecidos após o tratamento com CO, além de diminuir os mediadores pró-inflamatórios. Este reestabelecimento promoveu melhora na resposta imune de leucócitos, podendo servir também como uma nova medida terapêutica no tratamento de inflamação pulmonar aguda (Dalli *et al.*, 2015).

Em outras doenças pulmonares, as características resolutivas da LXA4 também já foram descritas. Na asma foi demonstrado que a LXA4 pode atuar como antagonista das ações broncoconstritoras mediadas por leucotrieno C4 (LTC4) (Christie; Spur; Lee, 1992; Planagumà *et al.*, 2008). Ademais, a exposição à LXA4 aumenta os mecanismos de apoptose de células *natural killer* (NK), tanto para eosinófilos quanto para neutrófilos, além de inibir a produção da citocina IL-13 pela subpopulação ILC2 (*Type 2 innate lymphoid cells*), já que ambas as populações de células expressam o receptor ALX/FPR2 da molécula lipídica (Barnig *et al.*, 2013). As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 associadas ao perfil Th2 também são atenuadas pela molécula (Liu *et al.*, 2021). Na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), a administração de LXA4 inibe a produção de ROS e reduz a produção de NETs. Conseqüentemente, a LXA4 diminui a liberação de elastase de neutrófilos (NE) e a produção de mieloperoxidase (MPO) destas mesmas células por meio da ligação com seu receptor (Pan *et al.*, 2022) que também é expresso nestes leucócitos (Papanicolaou *et al.*, 2020). Além disso, o mediador lipídico aumenta a fagocitose mediada por neutrófilos contra outras bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Pan *et al.*, 2022).

Para compreender os efeitos da LXA4 é importante entender como ocorre o seu metabolismo (Figura 1). A LXA4 é derivada do AA que é ácido graxo insaturado essencial para o organismo, originado a partir das clooxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) e citocromo P450 (CYP450). A 5-lipoxigenase (5-LO), 12-lipoxigenase (12-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO) são as principais enzimas do grupo LOXs que catalisam o AA em eicosanóides. A 5-LO é responsável pela produção de leucotrienos (LTs) e é codificada pelo gene *ALOX5* e se expressa em leucócitos. A 12-LO produz LTs e lipoxinas (LXs) e é codificada pelo gene *ALOX12*, sendo expressa na medula óssea, plaquetas, pele e células do epitélio (Luo *et al.*, 2022).

Além disso, possui a isoforma 12R-LOX codificada pelo gene *ALOX12B* e que é expressa em células do epitélio e na pele. Por último, a 15-LO possui duas isoformas (15-LO1 e 15-LO2) que participam do metabolismo das LXs (Luo *et al.*, 2022). A 15-LO1 é codificada pelo gene *ALOX15* expresso em leucócitos, epitélio brônquico e eosinófilos, enquanto a 15-LO2, pelo gene *ALOX15B*, que pode ser expresso em leucócitos e epitélios e na próstata. A interação entre 5-lipoxigenase (5-LO) de leucócitos e 15-lipoxigenase (15-LO) de células epiteliais é uma das vias de biossíntese de LXs em superfícies mucosas (Planagumà *et al.*, 2008).

Figura 1: Via metabólica da Lipoxina A4.

Fonte: Adaptado do KEEG (2024).

A bioinformática é a ciência computacional inovadora e tecnológica utilizada como ferramenta para melhor compreensão de estruturas de moléculas orgânicas. A literatura tem mostrado a importância dessa ferramenta na construção de *docking* molecular investigando interações entre patógenos e os possíveis alvos terapêuticos associados à determinada doença (Hassan *et al.*, 2021; Suvaithenamudhan; Parthasarathy, 2017). Em um recente estudo, Khan e colaboradores (2023) desenvolveram compostos derivados de ftalimidas quirais, visando controlar o crescimento de cepas resistentes de algumas bactérias patogênicas gram-negativas, com a finalidade de explorar estas proteínas causadoras de resistência e analisando a interação de ligação por meio de ciência computacional. Foi observado nos resultados de *docking*, pontos de ligação com alta afinidade, como diferentes aminoácidos e compostos (Khan *et al.*, 2023).

Em um estudo, envolvendo simulações de dinâmica e *docking* molecular, novos compostos inibidores para a proteína de ligação à penicilina 2B 5204 e proteína de ligação à penicilina 2B R6 destas cepas de *S. pneumoniae* foram determinados. Em ambas as proteínas das cepas, os resultados revelaram que houve ligações de hidrogênio e estabilidade, respectivamente, na interação com os compostos em estudo. Dentre as análises de dinâmica utilizadas para avaliar a estabilidade dos complexos ligante-alvo, os gráficos de RMSD (*Root-mean-square deviation*) e RMSF (*Root-mean-square fluctuation*) foram empregados e, de acordo com os resultados, os compostos poderiam ser utilizados para futuras terapias anti-pneumocócicas (Suvaithenamudhan; Parthasarathy, 2017).

A ciência computacional também tem um papel importante na interação de *S. pneumoniae* com outros compostos potenciais associados à terapia da comorbidade da pneumonia (Zaman *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2021; Shami *et al.*, 2023). A proteína tirosina fosfatase (PTP-CPS4B) é uma enzima de sinalização essencial para a célula, atuando em seu metabolismo, proliferação, sobrevivência e motilidade. Estudos de simulação associados à dinâmica molecular mostraram que a presença de um inibidor dentro do sítio ativo reduz a flexibilidade da proteína. A dinâmica molecular identificou uma transição de deslocamento no *loop* $\alpha 6$ do PTP-CPS4B durante sua ligação. Além disso, a energia livre de afinidade de ligação e os padrões de interação obtidos no decorrer da dinâmica indicaram que os compostos de zinco ZN1 (ZINCO32016792), ZN2 (ZINCO38139390) e ZN3 (ZINCO98207796) são potenciais candidatos a medicamentos contra a proteína tirosina fosfatase na infecção por *S. pneumoniae* (Zaman *et al.*, 2021).

Em outro estudo, com o objetivo de prever potenciais inibidores da alfa-enolase para reduzir a ligação do plasminogênio de *S. pneumoniae*, o *docking* molecular mostrou que o sódio 1,5-di-hidroxi-2-oxopirrolidin-3-hidroxi-dioxidofosfânio (SF-2312) é um inibidor promissor, visto que há forte interação por meio de cargas atrativas e ligações de hidrogênio com a alfa-enolase de *S. pneumoniae*. Dessa forma, sugere-se que o SF-2312 é o inibidor natural mais potente para essa enzima de *S. pneumoniae* e que novas abordagens terapêuticas futuras e a descoberta de outros inibidores serão necessários para elucidar estes mecanismos associados à patogenia da bactéria (Hassan *et al.*, 2021).

Mediante os dados da literatura apresentados, observa-se os efeitos benéficos de LXA4 na ação anti-inflamatória, atuando na resolução da inflamação, no entanto, a sua interação com PAMPs de *S. pneumoniae* ainda não é bem compreendido. Portanto, o objetivo central deste estudo é evidenciar essas interações e sugerir outros possíveis efeitos resolutivos da LXA4 na pneumonia induzida pela *S. pneumoniae*.

2-OBJETIVO GERAL

Analisar *in silico* a interação entre o mediador lipídico pró-resolutivo Lipoxina A4 (LXA4) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) de *Streptococcus pneumoniae* utilizando ferramentas de bioinformática.

2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o *docking* e a dinâmica molecular entre a LXA4 e os PAMPs de *S. pneumoniae*;
- Visualizar a interação do ligante LXA4 e PAMPs por meio dos diagramas e imagens de estruturas tridimensionais obtidas a partir do *docking* molecular;
- Descrever as interações e ligações químicas obtidas a partir do *docking* molecular;
- Correlacionar os resultados obtidos *in silico* com dados da literatura científica;
- Compreender e sugerir possíveis efeitos pró-resolutivos da LXA4 na pneumonia induzida por *S. pneumoniae*.

3-METODOLOGIA

3.1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada de Março a Agosto de 2024 utilizando as plataformas *Google Scholar*, Periódicos Capes e PubMed com os descritores em português e em inglês: “pneumonia”, “lipoxina”, “*S.pneumoniae*” e “*docking* molecular” juntamente com o operador booleano “AND”.

3.2- DOCKING MOLECULAR

Para filtrar os PAMPs de interesse para realizar o *docking* e a dinâmica molecular, foram obtidos os códigos de acesso dos antígenos de *S. pneumoniae* por meio do banco de dados *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>), onde também foi feita a análise prévia das características bioquímicas das moléculas-alvo. No *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) e *AlphaFold Protein Structure Database* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) foram possíveis visualizar as estruturas proteicas em 3D, possibilitando o *download* dos arquivos em formato *.pdb*, essencial para a realização do *docking* e dinâmica molecular.

Para obter e avaliar o mediador lipídico (LXA4), banco de dados *LIPID Metabolites and Pathways Strategy* (<https://www.lipidmaps.org/>) forneceu informações relacionadas à nomenclatura lipídica e fórmula molecular e, para comparar os dados, foi utilizado o *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) que indicou a estrutura química em 2D e 3D do lipídio, além da massa molecular. O *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG* (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) permitiu analisar e visualizar as vias metabólicas nas quais a LXA4 participa, validando com os dados obtidos a partir da revisão bibliográfica.

No *DeepSite* (<https://open.playmolecule.org/landing>) foi possível prever bolsões de ligação entre o ligante (LXA4) e os PAMPs de *S. pneumoniae*, bem como os possíveis locais de interação através de coordenadas (X,Y e Z) que prediz o posicionamento do *grid* (posicionamento no sítio ativo da interação com o ligante) após a submissão dos arquivos em *.pdb* obtidos no *Protein Data Bank*. Os arquivos em formato *.pdb* (dos PAMPs) e *.sdf* (do ligante) foram submetidos ao *Gold* (versão 3.0 - <https://bdec.dotlib.com.br/>) para preparar e limpar as moléculas. No *Goldscore* foi possível obter os valores dos *scores* para cada molécula-alvo, que são parâmetros de pontuação definidos como “*chemplp*”. Com estes resultados e com as coordenadas e a predição do sítio ativo de interação, foi possível realizar o *docking* molecular.

Os arquivos gerados pelo *Gold* foram submetidos ao *software LigPlot*, permitindo a visualização das interações químicas entre o ligante e os PAMPs por meio de imagens de diagramas, evidenciando as ligações com aminoácidos, bem como a quantidade de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals (interações hidrofóbicas). Finalmente, a plataforma *Chimera* (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) foi utilizada para visualizar as estruturas tridimensionais de cada interação.

3.3- DINÂMICA MOLECULAR

Os arquivos que continham as proteínas estruturais foram submetidos ao programa *Charmm-Gui* (Jo *et al.*, 2014; Park, *et al.*, 2023) para que os erros da estrutura e possíveis átomos sobrepostos fossem corrigidos. A análise de parametrização e correção de erros estruturais da LXA4 foi realizada utilizando o programa *CGenFF web* (Vanommeslaeghe; MacKerell, 2012). Após este processo foi realizada a análise da dinâmica molecular, utilizando o programa *Gromacs v 2023.1* (Abraham *et al.*, 2015).

O *Gromacs* analisou as vibrações das macromoléculas e projetou a dinâmica de interação entre a proteína e as estruturas do receptor lipídico. A simulação do sistema foi realizada com o campo de força de todos os átomos *CHARMM36* (Huang; MacKerell, 2013). Posteriormente, o complexo foi solvatado com o modelo de água *SPC/E 216* em uma caixa cúbica com uma distância de 1,8 nm da borda do complexo e íons do *NaCl* foram adicionados para neutralizar o sistema. Além disso, a minimização de energia e a fase de equilíbrio com temperatura em torno de 300k e pressão em torno de 1 bar foram realizadas para avaliar o equilíbrio do sistema.

A produção da dinâmica molecular foi realizada em 100 nanosegundos (ns), entre cada uma das proteínas com e sem o lipídio, na hipótese de compreender se o complexo PAMP-ligante pode ser considerado mais estável, em comparação somente com a LXA4. Finalmente, foram utilizados os programas *Plip* (Adasme, *et al.*, 2021) e *Ligplot v. 2.2* (Laskowski; Swindells, 2011) para verificar as regiões de interação entre as proteínas e o lipídio, para que os cálculos de *RMSD* (*Root-mean-square deviation*) e *RMSF* (*Root-mean-square fluctuation*) fossem gerados para a região de ligação.

4-RESULTADOS

Por meio das imagens dos diagramas obtidos a partir dos resultados do *docking* molecular foi possível observar na interação entre LXA4 e pneumolisina, seis ligações de hidrogênio, com interações em cinco aminoácidos: asparagina (Asn56D e Asn85D), lisina (Lys164D), treonina (Thr57D) e leucina (Leu83D). Além disso, houve interações hidrofóbicas na serina (Ser167D e Ser61D), aspartato (Asp59D), fenilalanina (Phe165D e Phe344D), asparagina (Asn346D), treonina (Thr55D), valina (Val163D), glicina (Gly166D) e isoleucina (Ile60D) (Figura 2A).

Na interação entre a LXA4 e a protease de IgA1, foi possível observar apenas interações hidrofóbicas nos aminoácidos isoleucina (Ile25A), glutamato (Glu23A e Glu24A), leucina (Leu44A), aspartato (Asp20A), fenilalanina (Phe21A) e glutamina (Gln22A)(Figura 2B).

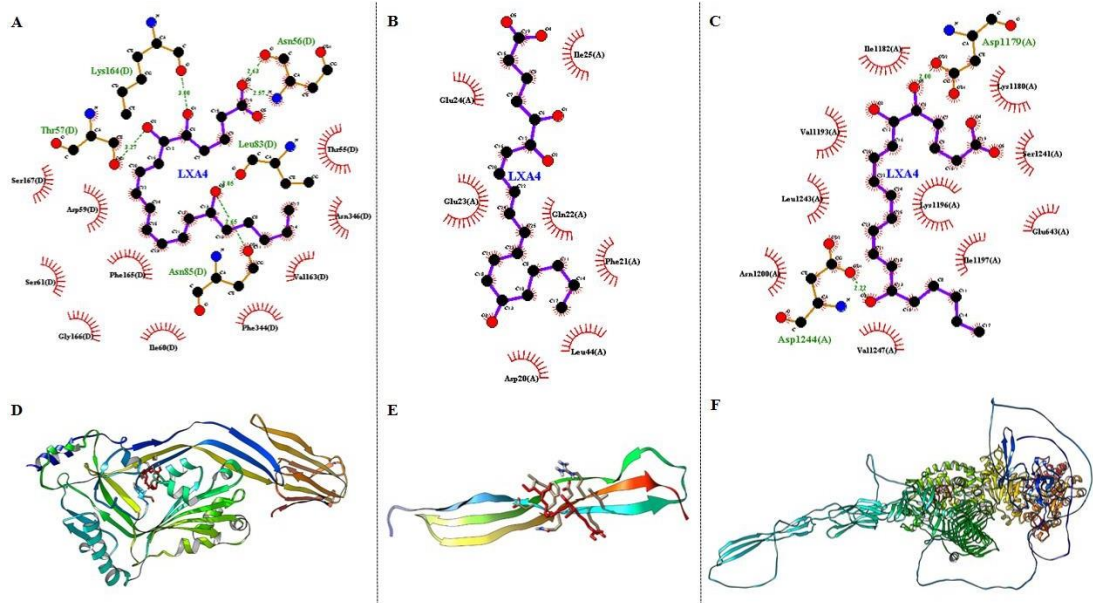
Entre LXA4 e ZmpC obteve-se duas ligações de hidrogênio, com duas interações nos aminoácidos aspartato (Asp1179A e Asp1244A) e dez interações hidrofóbicas na isoleucina (Ile1182A e Ile1197A), valina (Val1193A e Val1247A), leucina (Leu1243A), asparagina (Asn1200A), lisina (Lys1196A e Lys1180A), serina (Ser1241A) e glutamato (Glu643A) (Figura 2C).

Por outro lado, a interação de LXA4 e a PsaA mostrou cinco ligações de hidrogênio com interações em isoleucina (Ile59B e Ile62A) e serina (Ser58B). Já as interações hidrofóbicas foram vistas em leucina (Leu72B), glicina (Gly63A), glutamato (Glu74B, Glu284A e Glu284B), aspartato (Asp75B), valina (Val60B), isoleucina (Ile59A e Ile62B), serina (Ser58A), prolina (Pro61A e Pro61B) e tirosina (Tyr69B) (Figura 3A).

A interação entre a LXA4 e a peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase mostrou quatro ligações de hidrogênio em fenilalanina (Phe162A e Phe213A) e histidina (His154A), além de interações hidrofóbicas nos aminoácidos prolina (Pro161A), valina (Val153A), glutamato (Glu94A), leucina (Leu95A), lisina (Lys152A), serina (Ser149A, Ser209A e Ser91A), aspartato (Asp214A), asparagina (Asn212A), treonina (Thr163A) e triptofano (Trp211A) (Figura 3B).

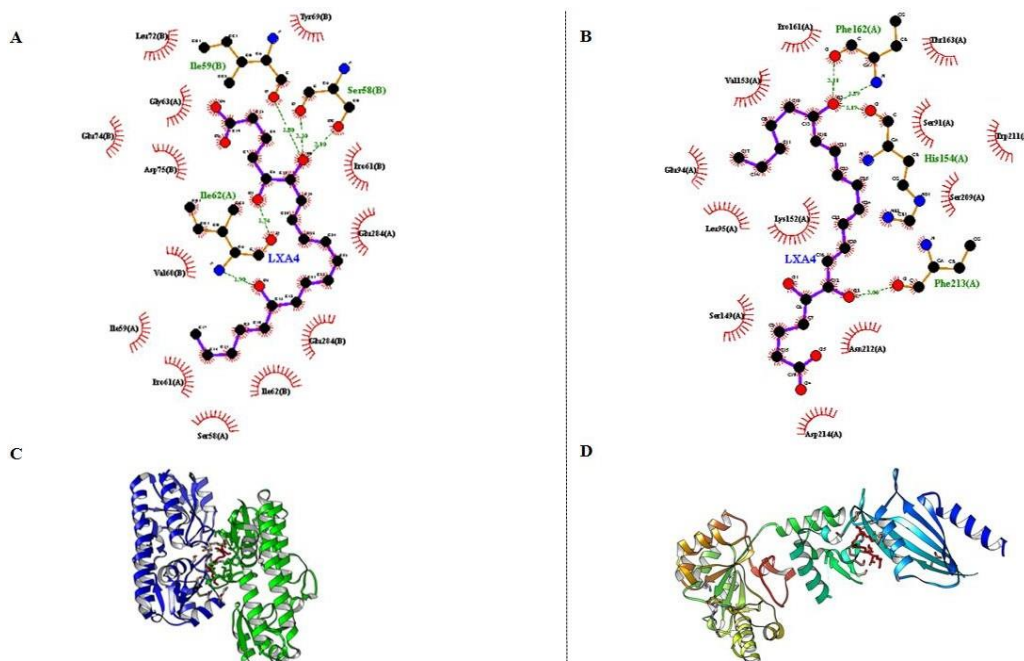
Finalmente, as interações químicas e o posicionamento com os PAMPs pneumolisina (Figura 2D), protease de IgA1 (Figura 2E), ZmpC (Figura 2F), PsaA (Figura 3C) e peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase (Figura 3D) também puderam ser observadas em formato 3D.

Figura 2: Ligações de hidrogênio, aminoácidos com interações e interações hidrofóbicas entre LXA4 e Pneumolisina (A), Protease IgA1 (B) ZmpC (C), com suas respectivas interações químicas em formato em 3D (2D, 2E e 2F)



Fonte: Adaptado do LigPlot (2024).

Figura 3: Ligações de hidrogênio, aminoácidos com interações e interações hidrofóbicas entre LXA4 ePsaA (A) e Peptideoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase (B), com suas respectivas interações químicas em formato em 3D (2C e 2D)



Fonte: Adaptado do LigPlot (2024).

Os códigos de acesso foram obtidos a partir dos bancos de dados *PDB - Resolução* ou *AlphaFold* (escrita com a inicial “AF”), sendo pneumolisina (5CR6-1.98A), protease de IgA1 (6OH1-NMR), ZmpC (AF-Q97T80), PsaA (2C1I-1.35A) e peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase (3ZK9-190A). Com estes dados foi possível realizar tanto o *docking* molecular quanto a dinâmica molecular, possibilitando a construção da tabela 1.

Nesta tabela, também consta os *scores* para cada molécula-alvo, que são parâmetros de pontuação definidos como “*chemplp*”, obtidos a partir do *Goldscore*. O *chemplp* é o *score*, que avalia quatro componentes básicos: a energia de ligação de hidrogênio externa da proteína-ligante, energia externa de Van der Waals (vdW), energia de vdW interna do ligante e energia de torção interna. Dessa forma, para escolher os resultados para cada *docking* molecular realizado, leva-se em consideração a viabilidade e o melhor desempenho revelado a partir da maior pontuação do *chemplp (score)* dada pelo *Gold*. Portanto, o *chemplp (score)* obtidos por meio do *Goldscore* para cada PAMP foram: 66,8148 (Pneumolisina), 36,9724 (Protease de imunoglobulina A1), 59,5030 (ZmpC), 76,3524 (PsaA) e 53,4208 (Peptidoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase).

Tabela 1: Identificação, código de acesso (*PDB-Método experimental* e do *AlphaFold*), *chemplp (score)*, quantidade de ligações de hidrogênio, aminoácidos com interação e possíveis interações hidrofóbicas entre LXA4 e PAMPs de *S. pneumoniae*.

| Identificação | Código de Acesso (<i>PDB-Resolução</i> ou <i>Alphafold</i>) | <i>Chemplp</i> (<i>score</i>) | Quantidade de ligações de hidrogênio | Aminoácidos com interações | Interações hidrofóbicas |
|---------------------|--|------------------------------------|--|--|---|
| Pneumolisina | 5CR6-XRD | 66,8148 | 6 | Asn56D, Asn85D, Lys164D, Thr57D e Leu83D | Ser167D, Ser61D, Asp59D, Phe165D, Phe344D, Asn346D, Thr55D, Val163D, Gly166D e Ile60D |
| Protease de IgA1 | 6OH1-NMR | 36,9724 | - | - | Ile25A, Glu23A, Glu24A, Leu44A, Asp20A, Phe21A e Gln22A |
| ZmpC | AF-Q97T80 | 59,5030 | 2 | Asp1179A e Asp1244A | Ile1182A, Ile1197, Val1193A, Val1247A, Leu1243A, Glu643A, Asn1200A e Lys1196A |

| | | | | | |
|--|----------|---------|---|---------------------------------|--|
| | | | | | Lys1180A e Ser1241A |
| PsaA | 2C11-XRD | 76,3524 | 5 | Ile59B, Ile62A e Ser58B | Leu72B, Gly63A, Glu74B, Glu284A, Glu284B, Asp75B Val60B, Ile59A, Ile62B, Ser58A, Pro61A, Pro61B e Tyr69B |
| Peptideoglicano <i>N</i> - acetilglicosamina desacetilase | 3ZK9-XRD | 53,4208 | 4 | Phe162A, Phe213A, His154A | Pro161A, Val153A, Glu94A, Leu95A, Lys152A, Ser149A, Ser209A, Ser91A, Asp214A, Asn212A Thr163A e Trp211A |

Fonte: A autora. Tabela construída com dados extraídos do PDB e Alphafold (2024).

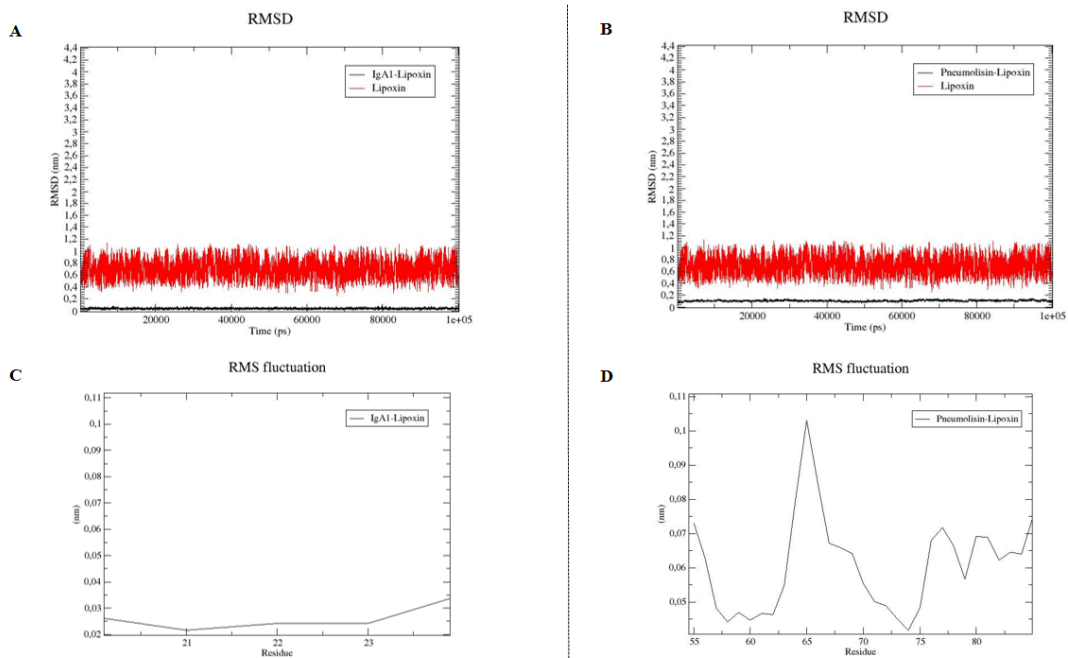
Para validar as interações obtidas no *docking* molecular, dinâmica molecular foi realizada entre a LXA4 e a pneumolisina, protease de IgA1, PsaA e peptideoglicano *N*-acetilglicosamina desacetilase. A estabilidade de interação entre o ligante e os PAMPs foi avaliada usando o Gromacs v 2023.1. Na simulação da dinâmica, a primeira fase, para minimização da energia, foi realizada para garantir que as proteínas estivessem adequadas e estabilizadas para a realização da simulação, bem como as fases de equilíbrio de pressão e temperatura para cada complexo.

Na primeira fase foi possível obter os valores da minimização de energia de todos os complexos. LXA4-IgA1, LXA4-Pneumolisina e LXA4-ZmpC apresentaram estabilidade de energia final de aproximadamente 4465.09 kJ/mol em torno de 2093 ps, 11.414,29 kJ/mol em torno de 2434 ps, e 62.531,01 kJ/mol em torno de 2012 ps, respectivamente. Já os complexos LXA4-Peptidoglicano e LXA4-PsaA apresentaram estabilidade de energia final de aproximadamente 1985.85 kJ/mol em torno de 1066 ps e 10.946,09 kJ/mol em torno de 1575 ps, respectivamente. Além disso, os resultados em relação à pressão ficaram em torno de 1 bar e a temperatura em torno de 300 K, para todos os complexos (dados não mostrados).

Na etapa final, o RMSD foi utilizado para analisar a estabilidade dos complexos e o RMSF para a flutuação dos resíduos de aminoácidos, à 100.000 ps (100 ns), gerando os resultados dos complexos (linha preta) e da LXA4 sozinha (linha vermelha), revelando variações de 0,25 nm à 1,15 nm. Dessa forma, os valores do complexo e somente ligante foram comparados em relação à sua estabilidade. O RMSD mostrou que no complexo LXA4-IgA1

(Figura 4A), a região de interação apresentou maior estabilidade, com variação de posição de 0,015 nm à 0,08 nm. O RMSF deste complexo mostrou menor flutuação dos resíduos de aminoácidos na região de interação, com variações de 0,022 nm à 0,035 nm (Figura 4C). O RMSD do complexo LXA4-Pneumolisina (Figura 4B) mostrou variação de 0,07 nm à 0,15 nm em relação à LXA4 sozinha, enquanto o RMSF deste complexo mostrou menor flutuação dos resíduos de aminoácidos na região de interação, com variações de 0,04 nm à 0,1 nm (Figura 4D).

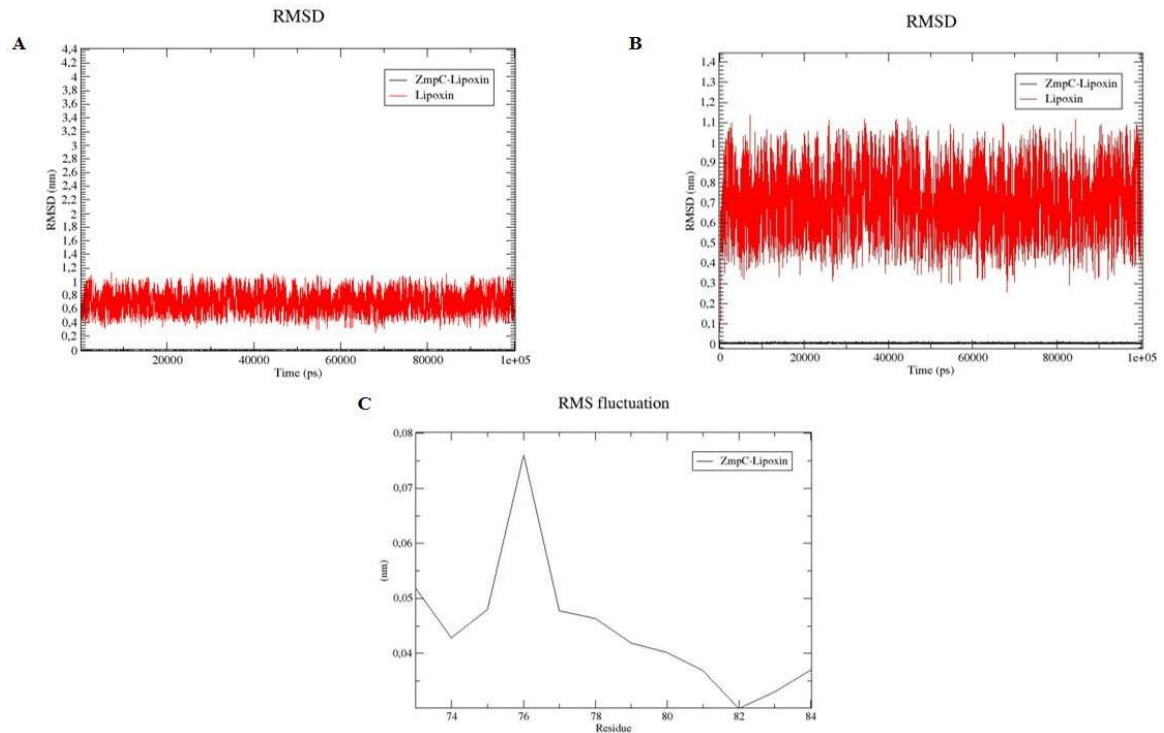
Figura 4: Gráficos representativos da dinâmica molecular. (A) O RMSD mostrou a estabilidade de complexo LXA4-IgA1 (linha preta) com variação de posição de 0,015 nm à 0,08 nm e, o RMSF da flutuação (C) com variação de 0,022 nm à 0,035 nm. (B) O RMSD apresentou à estabilidade do complexo LXA4-Pneumolisina (linha preta) e o RMSF da flutuação (D) com variação de 0,04 nm à 0,1 nm.



Fonte: Adaptado do GROMACS (2024).

No complexo LXA4-ZmpC (Figura 5A-5B), o RMSD mostrou a região de interação com maior estabilidade (em comparação com LXA4-IgA1 e LXA4-Pneumolisina), com variação de posição de 0,001 nm à 0,013 nm. O RMSF deste complexo mostrou poucas flutuações dos resíduos de aminoácidos na região de interação, com variações de 0,02 nm à 0,076 nm (Figura 4C).

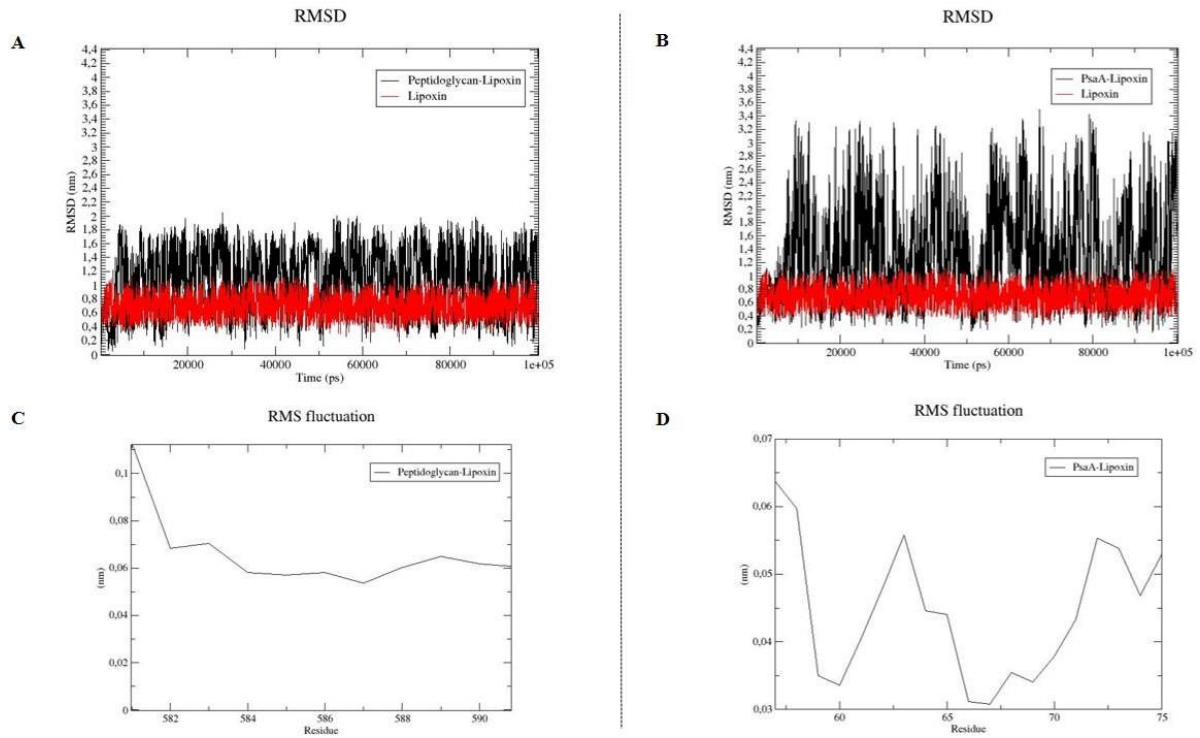
Figura 5: Gráficos representativos da dinâmica molecular. (A) O RMSD mostrou a estabilidade do complexo LXA4-ZmpC (linha preta) com variação de posição de 0,001 nm à 0,013 nm. (B) RMSD com escala menor para melhor visualização do resultado. (C) RMSF da flutuação com variação de 0,02 nm à 0,076 nm



Fonte: Adaptado do GROMACS (2024).

Já no complexo LXA4-Peptidoglicano (Figura 6A), o RMSD mostrou que a região de interação apresentou menor estabilidade, em relação à LXA4 sozinha, com variação da posição de 0,025 nm à 2 nm. Seu RMSF apresentou maior flutuação dos resíduos de aminoácidos na região de interação, com variações de 0,057 nm à 0,12 nm (Figura 6C). Da mesma forma, o RMSD do complexo LXA4-PsaA (Figura 6B) mostrou variação de 0,2 nm à 3,5 nm em relação à LXA4 sozinha. Os valores do RMSF deste complexo mostraram maior flutuação dos resíduos de aminoácidos na região de interação, com variações de 0,03 nm à 0,064 nm (Figura 6D).

Figura 6: Gráficos representativos da dinâmica molecular. (A) O RMSD mostrou a estabilidade de complexo LXA4-Peptidoglicano (linha preta) com variação de posição de 0,015 nm à 0,08 nm e, o RMSF da flutuação (C) com variação de 0,057 nm à 0,12 nm. (B) O RMSD apresentou a estabilidade do complexo LXA4-PsaA (linha preta) e o RMSF da flutuação (D) com variação de 0,03 nm à 0,064 nm



Fonte: Adaptado do GROMACS (2024).

5-DISCUSSÃO

Conforme visto na literatura, fatores de virulência da *S. pneumoniae* podem contribuir com a sua transmissão, colonização, evasão imunológica e invasão tecidual, os quais são fatores chave na patogênese da infecção. A cápsula polissacarídica pode impedir a opsonização e fagocitose bacteriana, sendo este evento um importante mecanismo de escape do sistema imune (WEISER; FERREIRA, 2018; BROOKS; MIAS, 2018). Devido a estes fatores de virulência de *S.pneumoniae* e de outras bactérias, estudos de bioinformática utilizam análises *in silico* para investigar e descrever interações moleculares entre substâncias químicas consideradas como novos mecanismos terapêuticos (Suvaitenamudhan; Parthasarathy., 2017; Zaman *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2021; Shami *et al.*, 2023; Khan *et al.*, 2023) ou que podem ser novos candidatos na produção de vacinas (Rodrigues *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022) e proteínas bacterianas.

Neste estudo, evidenciamos interações moleculares utilizando de simulações de *docking* e dinâmica molecular entre o mediador lipídico pró-resolutivo LXA4 e PAMPs de *S.pneumoniae*, objetivando descrever outros possíveis efeitos resolutivos da LXA4 na pneumonia. Por meio dos resultados do *docking* molecular, os diagramas dos complexos LXA4-ZmpC, LXA4-pneumolisina, LXA4-IgA1, LXA4-PsaA e LXA4-peptidoglicano mostraram interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio para vários aminoácidos de cada proteína bacteriana. Estas interações e ligações podem ser vistas em outros estudos. Hassan e colaboradores descreveram novos inibidores da alfa-enolase, dentre eles o composto 1,5-di-hidroxi-2-oxopirrolidin-3-hidroxi-dioxidofosfânio (SF-2312). Por meio das análises *in silico*, o *docking* molecular mostrou fortes interações moleculares entre a bactéria e o composto, além de fortes cargas atrativas, sugerindo o composto como novo potencial inibidor da alfa-enolase, podendo alterar sua função durante a doença pneumocócica invasiva (DPI) causada pela *S.pneumoniae* (Hassan *et al.*, 2021).

Em um estudo recente, compostos derivados de ftalimida foram testados contra cepas de bactérias gram-negativas como: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* que produzem a enzima beta lactamase. Os resultados do *docking* molecular mostraram ligações de hidrogênio entre os aminoácidos da enzima e os compostos, sendo abordados como novos agentes terapêuticos antimicrobianos (Khan *et al.*, 2023). Por meio de análises *in silico*, Zaman e colaboradores investigaram interações moleculares entre a enzima PTB-APS4B e os compostos ZN1, ZN2 e ZN3. Os resultados do *docking* mostraram ligações

de hidrogênio e interações hidrofóbicas com boa afinidade de ligação entre os compostos e a enzima, podendo ser considerados como potenciais inibidores (Zaman *et al.*, 2021).

Para validar as interações obtidas do *docking* molecular, foram feitas dinâmicas moleculares entre a LXA4 e os PAMPs. A simulação mostrou para todos os complexos, uma temperatura de 300 K e pressão em torno de 1 bar, indicando que o sistema se manteve em equilíbrio durante todo o tempo da simulação. Estes resultados podem ser vistos em estudos recentes. Rodrigues e colaboradores (2022) projetaram uma vacina multiepítipo entre a bactéria *Mycoplasma pneumoniae* (agente etiológico da pneumonia) e o receptor TLR2. Na dinâmica molecular, a temperatura e a pressão se manteve em torno de 300 K e 1 bar (Rodrigues *et al.*, 2022). Em outro estudo, onde projetaram um imunógeno multiepítipo contra *Treponema pallidum*, causador da sífilis, a dinâmica molecular, mostrou valores de temperatura e pressão que também ficaram em torno de 300 K e 1 bar, respectivamente (Gomes *et al.*, 2022).

No presente estudo, os valores para RMSD principalmente dos complexos LXA4-ZmpC (0,001 nm à 0,013 nm), LXA-IgA1 (0,015 nm à 0,08 nm) e LXA4-pneumolisina (0,07 nm à 0,15 nm) se mostraram promissores, com poucas variações em comparação aos outros complexos e, além de maior estabilidade quando comparado com a LXA4 sozinha, com flutuações suaves nos resíduos de aminoácidos. Estes resultados são semelhantes em outro estudo, onde os gráficos de RMSD e RMSF mostraram boa estabilidade durante a simulação e houve poucas flutuações em resíduos de aminoácidos sugerindo que a vacina multiepítipo contra *M. pneumoniae* poderia ser boa candidata contra a bactéria (Rodrigues *et al.*, 2022).

Em relação aos valores, observamos em nossos resultados de RMSF, que os complexos LXA4-ZmpC, LXA4-IgA1, LXA4-pneumolisina, LXA4-peptidoglicano e LXA4-PsaA apresentaram os seguintes valores: 0,02 nm à 0,076 nm; 0,022 nm à 0,035 nm; 0,04 nm à 0,1 nm; 0,057 nm à 0,12 nm e 0,03 nm à 0,064 nm respectivamente. Observa-se que entre os complexos, houve pequenas diferenças nos picos de flutuações e que possivelmente, a quantidade de resíduos de aminoácidos nas regiões de interação entre cada um dos complexos pode ser um fator interferente, gerando essas pequenas variações.

Foi observado que dados de RMSD do complexo LXA4-PsaA (Figura 5B) apresentou a menor estabilidade em comparação aos outros complexos, tendo variação de 0,2 nm até 3,5 nm. Shami e colaboradores descreveram três proteínas bacterianas (*DNA binding response regulator*, *UDP-N-acetylmuramate—L-alanine ligase* e *RNA polymerase sigma factor*) da cepa *S. pneumoniae* D39 como alvos dos novos compostos que poderiam ter ações antibacterianas. Cada alvo foi nomeado de acordo com o ID do PDB, sendo 4KFC, 7BVA e

4LK1, respectivamente. Assim, foram feitas análises de dinâmica molecular entre as proteínas e os compostos. Na dinâmica molecular, o RMSD mostrou que cinco dos seis inibidores tiveram variações de até 5 nm, conferindo uma estabilidade favorável. Os dados do RMSF dos complexos 4KFC-Quercetina, 4KLI-Mezlocillin e 7BVA-Cloxacilina do estudo, apresentaram maiores flutuações, em comparação aos outros complexos. Ao realizar a análise geral, todos apresentaram flutuações favoráveis com picos de flexibilidade entre ligantes-alvo (Shami *et al.*, 2023). Os resultados deste estudo assemelham-se com os dados obtidos por nosso grupo.

Análises de dinâmica molecular realizada em outro estudo envolvendo a produção de um imunógeno contra a bactéria *T. pallidum*, mostraram que o RMSD variou de 0,13 nm à 1,6 nm, indicando estabilidade favorável do complexo (Gomes *et al.*, 2022). Os resultados dos nossos complexos LXA4-ZmpC, LXA4-IgA1 e LXA4-pneumolisina, possuem variação de RMSD próxima a estes valores, ou ainda menor, em comparação com este estudo, mostrando-se promissores. Em um estudo recente, evidenciaram flutuações suaves (por meio do RMSF) das cadeias laterais dos aminoácidos, sendo em torno de 0,5 nm, indicando interações ininterruptas entre ligante-alvo, além de picos mais altos em torno de 2,0 nm (Gomes *et al.*, 2022). Os valores do RMSF de todos os nossos complexos tiveram valor mínimo de 0,02 nm e máximo de 0,076 nm, também indicando flutuações suaves.

Além disso, outros complexos deste estudo como LXA4-peptidoglicano e LXA4-PsaA, apresentaram valores de RMSD de 0,025 nm à 2 nm e 0,2 nm à 3,5 nm, respectivamente, tendo menor estabilidade em comparação com a LXA4 sozinha, mostrando diferenças em relação ao RMSF entre ambos os complexos. Estas variações de estabilidade entre os complexos podem ser vistas em outro estudo, onde novos compostos inibidores para a proteína de ligação à penicilina 2B 5204 e proteína de ligação à penicilina 2B R6 de *S. pneumoniae* foram determinados. Os compostos em estudo foram ZINC59376795, ZINC60175365, ZINC36922620, ZINC39550705, ZINC36953975 e Penicilina G. A dinâmica molecular entre os compostos e a proteína 2B 5204 mostrou que os dois primeiros tiveram maior estabilidade (em relação aos valores de RMSD) do que os outros compostos. Apesar do composto ZINC59376795 apresentar maior estabilidade que os demais, todos apresentaram uma estabilidade favorável durante todo o período de simulação, principalmente em relação à proteína 2B 5204. Todos tiveram variações nos picos de flutuação no RMSF (Suvaitenamudhan; Parthasarathy., 2017).

As características resolutivas da LXA4 já foram descritas na pneumonia (Siegel *et al.*, 2021; Dalli *et al.*, 2015), mas também em outras doenças pulmonares como na asma (Christie;

Spur; Lee., 1992; Planagumà *et al.*, 2008; Barnig *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2021) e na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Pan *et al.*, 2022). Sabe-se que o TLR4 pode reconhecer a pneumolisina (Chiu *et al.*, 2019), uma enzima citoplasmática que é liberada devido à ação da autolisina de superfície do pneumococo (Jedrzejewski., 2001) e que ativa a via de sinalização deste receptor (Fraga-Silva., 2022).

TLRs sinaliza com auxílio de MyD88 (que ativa proteínas quinases ERK, JNK e p38 e consequentemente AP-1, ATFs e HIF1 α), além do fator de transcrição NF- κ B e TRIF (que ativa IRF e NF- κ B). Toda essa sinalização, ativação de fatores de transcrição e expressão de genes de substâncias com ação antimicrobiana irão regular positivamente a transdução de sinal e regulação transcricional na resposta imune (Sweet, M. J; Ramnath, D; Singhal, A; Kapetanovic, R., 2024). Dessa forma, ao analisar a via de sinalização envolvendo receptores TLRs, o trabalho atual sugere que o mediador lipídico possa atuar como imunomodulador na via de sinalização mediada por TLR4 ao se ligar à bactéria por meio da pneumolisina e que esta ligação pode modificar a estrutura e função da proteína bacteriana, reduzindo sua virulência. Além disso, já que as AECs expressam TLR4 (Fraga-Silva., 2022) sugere-se que, com a possível inibição ou diminuição da ligação da pneumolisina a este receptor por meio da LXA4, ocorra redução da secreção de alarminas que induz o influxo de neutrófilos, diminuindo o infiltrado neutrofilico.

Foi evidenciado que a ZmpC degrada o domínio N-terminal da (PSGL-1) diminuindo a adesão de neutrófilos à P-selectina das células endoteliais, intervindo na migração destes leucócitos para os sítios de infecção e inibindo o seu influxo para os pulmões de camundongos (Surewaard *et al.*, 2013). Além disso, a LXA4 pode reduzir a produção de NETs, por meio da ligação com seu receptor expresso em neutrófilos (Papanicolaou *et al.*, 2020) e consequentemente a liberação de NE e MPO (Pan *et al.*, 2022), que de forma exacerbada podem provocar dano tecidual em AECs (Fraga-Silva *et al.*, 2022). Dessa forma, sugere-se também que a ligação entre LXA4 e pneumolisina, possa influenciar na liberação de NETs de forma indireta, em consequência da possível redução da ligação entre este PAMP e o TLR4 e, logo, a ativação da cascata de sinalização deste receptor, reduzindo a neutrofilia e consequentemente, seu dano ao epitélio.

A imunização passiva com mAbs (*monoclonal antibodies*) de IgA1 humana em modelo murino deficiente para protease IgA1 de *S. pneumoniae*, pode bloquear a colonização bacteriana atuando na defesa de mucosa (Roche *et al.*, 2015). No entanto, sabendo que a protease IgA1 de *S. pneumoniae* pode clivar a IgA1 humana (Marquart., 2021), aumentando a adesão às células epiteliais e promovendo a patogênese (Janoff *et al.*, 2014), sugere-se que a

ligação da LXA4 com a protease de IgA1 possa impedir ou diminuir a interação do PAMP à IgA humana e, logo, na clivagem do anticorpo. Além disso, pode atuar como possível opsonina e neutralizar o microrganismo, favorecendo e proporcionando os mecanismos da resposta imune humoral adequados.

A PsaA faz parte de um sistema (*ATP-binding cassette*) sendo importante para o crescimento bacteriano devido estar relacionada ao transporte de Mn^{2+} , podendo promover a adesão às células pulmonares (Rajam *et al.*, 2008). Além disso, a Peptidoglicano-N-acetilglucosamina possui filamentos glicanos que possui resíduos de glucosamina não acetilados e que ao serem inativados, conferem aos pneumococos a produção de resíduos N-acetilados, tornando-os hipersensíveis à lisozima (Vollmer, W; Tomasz, A., 2000) (Vollmer, W; Tomasz, A., 2002) que é capaz de hidrolisar o peptidoglicano da parede celular bacteriana e ativar receptores do tipo NOD em células epiteliais (Ragland, S.A; Criss, A.K., 2017).

No presente estudo o *docking* entre LXA4 e Peptidoglicano-N-acetilglucosamina e PsaA demonstrou que o mediador lipídico pode se ligar em ambos os PAMPs. No entanto, na dinâmica molecular, estes últimos apresentaram baixa estabilidade (em comparação aos outros complexos), durante todo tempo de simulação à 100.000 ps (100 ns). Estudos já mencionados anteriormente (Suvaitenamudhan; Parthasarathy., 2017; Shami *et al.*, 2023) mostram que apesar das diferenças de estabilidade e flutuação dos resíduos de aminoácidos durante a simulação, os compostos/substâncias ainda podem trazer benefícios no combate a outras bactérias. Nesse quesito, sugere-se que um dos mecanismos para validar e analisar os resultados obtidos com estes PAMPs, seria aumentar o tempo de duração da simulação, a fim de obter alguma estabilidade em um determinado período no decorrer da dinâmica.

Nossa investigação apresenta limitações, pois é inteiramente baseada em análise *in silico*, carecendo de validações em modelos experimentais murinos (*in vivo*) e culturas de células (*in vitro*) ou amostras biológicas oriundas de pacientes hospitalizados (*ex vivo*). Além disso, o foco do trabalho foi apenas um patógeno (*S. pneumoniae*) não considerando outras bactérias causadoras de pneumonia. No entanto, o estudo fornece novos *insights* sobre a interação entre a LXA4 e os PAMPs descritos do patógeno, sugerindo que o mediador lipídico possa ter um papel positivo na resposta imune durante quadro de pneumonia induzida pela bactéria *S. pneumoniae*.

6-CONCLUSÃO

As interações moleculares mostradas por meio do *docking* e dinâmica molecular entre a LXA4 e os PAMPs pneumolisina e protease de IgA1, evidenciam que o mediador lipídico pode favorecer positivamente a resposta imune inata e humoral. No entanto, experimentos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo* serão necessários para validar os dados obtidos por biologia computacional para traçar o panorama de resposta imune frente ao *S. pneumoniae*.

7-REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 10. ed. Rio de Janeiro-RJ: Grupo GEN, 2023. *E-book*. ISBN 9788595158924. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595158924/>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- ABRAHAM, M.J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Software X**. v.1-2, p. 19-25, jul. 2015.
- ADASME, M.F. *et al.* PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v.49, p.530-534, jul. 2021
- BARNIG, C.; LEVY, B. D. Lipoxin A4: a new direction in asthma therapy? **Expert Review of Clinical Immunology**, ed. 6, v.9, p. 491-493, jan. 2013.
- BARNIG, C. *et al.* Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 154, p. 1-25, feb. 2013.
- BROOKS, L. R.; MIAS, G. I. *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. **Frontiers Immunology**, v. 9, p. 1-29, jun. 2018.
- CHIU, F. F. *et al.* Domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* is a multifunctional domain contributing TLR4 activating and hemolytic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**., v. 4, n. 517, p. 596-602, oct, 2019.
- CHRISTIE, P. E.; SPUR, B. W.; LEE, T. H. The Effects of Lipoxin A4 on Airway Responses in Asthmatic Subjects. **American Review of Respiratory Disease**, ed. 6, v. 145, p. 1281-1284, jun. 1992.
- CONICET. Vacina Pneumocócica Conjugada 13-valente para imunização de crianças de até cinco anos de idade contra doença pneumocócica invasiva e pneumonia. **Ministério Da Saúde**. Jun. 2023. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/brisa/resource/en/biblio-1509356/> Acesso em: 15 jan. 2024.
- DALLI, J. *et al.* The Regulation of Proresolving Lipid Mediator Profiles in Baboon Pneumonia by Inhaled Carbon Monoxide. **American Thoracic Society**, v. 53, n. 3, p. 314-325, sep. 2015.
- FRAGA-SILVA, T. F. de C. *et al.* Asthma-associated bacterial infections: Are they protective or deleterious? **Journal of Allergy and Clinical Immunology: Global**, 1. ed, v. 2, p. 14-22, feb. 2022.
- GIL, E.; NOURSADEGHI, M.; BROWN, J. S. *Streptococcus pneumoniae* interactions with the complement system. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 12, n. 929483, jul. 2022.
- GOMES, L. G. R. *et al.* In Silico Designed Multi-Epitope Immunogen “Tpme-VAC/LGCM-2022” May Induce Both Cellular and Humoral Immunity against *Treponema pallidum* Infection. **Vaccines**, ed.7 v. 10, jul. 2022.

HASSAN, M. *et al.* Molecular *docking* of alpha-enolase to elucidate the promising candidates against *Streptococcus pneumoniae* infection. **DARU**. v. 29, n. 1, p. 73-84, jun. 2021.

HUANG, J; MACKERELL, A.D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, ed. 25, v. 34, p. 2135–2145, sep. 2013

JANOFF, E. N. *et al.* Pneumococcal IgA1 Protease Subverts Specific Protection By Human IgA1. **Mucosal Immunology**. v. 7, n. 2, p. 249-256, mar. 2014.

JEDRZEJAS, M.J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 187-207, jun, 2001.

JO, S. *et al.* CHARMM-GUI PDB Manipulator for Advanced Modeling and Simulations of Proteins Containing Non-standard Residues. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v.96, p.235-265, aug. 2014.

KEGG, Table of Contents. Arachidonic acid metabolism. Disponível em: <https://www.kegg.jp/pathway/map00590>. Acesso em: 17 jan. 2024.

KHAN, M. *et al.* Molecular *docking* and in vitro antibacterial activity of chiral phthalimide on ESBL producing gram negative bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 35, n. 2, p. 681-697, mar. 2023.

KIM, D.H. *et al.* Suppressive effects of S100A8 and S100A9 on neutrophil apoptosis by cytokine release of human bronchial epithelial cells in asthma. **International Journal of Medical Sciences**, ed. 4, v. 17, p. 498-509, feb. 2020.

LASKOWSKI, R; SWINDELLS, M.B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, ed.10, v. 51, p.2778-2786, oct. 2011.

LEPPERT, D. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. **Clinical Infectious Diseases**. v. 31, p. 80-84, jul. 2000.

LIGPLOT. Versão 2.2.4. Hinxton: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions 1996. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

LIPID MAPS, Lipid Metabolites And Pathways Strategy. Disponível em: <https://www.lipidmaps.org/>. Acesso em: 03 fev. 2024 .

LIU, Y. *et al.* Lipoxin A4 inhibits ovalbumin-induced airway inflammation and airway remodeling in a mouse model of asthma. **Chemico-Biological Interactions**, v. 349, p. 1-9, nov. 2021.

LUO, Y. *et al.* Role of arachidonic acid lipoyxygenase pathway in Asthma. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 158, p. 1-7, may. 2022.

MARQUART, M. E. Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Cutting to the chase on proteases. **Virulence**. v. 12, n. 1, p. 766-787, feb. 2021.

OGGIONI, M. R. Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. **Molecular Microbiology**. v. 49, n. 3, p. 795-805, apr. 2003.

PAN, W-H *et al.* The Effect and Mechanism of Lipoxin A4 on Neutrophil Function in LPS-Induced Lung Injury. **Inflammation**, v. 45, n. 5, p.1950-1967, oct. 2022.

PAPANICOLAOU, A. *et al.* Novel Therapies for Pneumonia-Associated Severe Asthma Phenotypes. **Trends in Molecular Medicine**, ed. 11, v. 26, p. 1047-1058, nov. 2020.

PARK, S. J. *et al.* CHARMM-GUI PDB Manipulator: Various PDB Structural Modifications for Biomolecular Modeling and Simulation. **Journal of Molecular Biology**, ed.14 v. 435, jul. 2023

PLANAGUMÀ, A. *et al.* Airway Lipoxin A4 Generation and Lipoxin A4 Receptor Expression Are Decreased in Severe Asthma. **American Thoracic Society**, v. 178, p. 574–582, sep. 2008.

RAGLAND, S. A.; CRISS, A. K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. **PLOS Pathogens**. v. 13, n. 9, p. 1-22, sep. 2017.

RAJAM, G. *et al.* Pneumococcal Surface Adhesin A (PsaA): A Review. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 34, n. 3, p. 131-142, dec. 2008.

RAQUIL, M.A. *et al.* Blockade of Antimicrobial Proteins S100A8 and S100A9 Inhibits Phagocyte Migration to the Alveoli in Streptococcal Pneumonia. **The Journal of Immunology**, ed. 5, v.180, p. 3366-3374, mar. 2008.

ROCHE, S. *et al.* Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination. **Mucosal Immunology**, ed.1, v. 8, p.176-185, jan. 2015.

RODRIGUES, T. C. V. *et al.* An immunoinformatics-based designed multi-epitope candidate vaccine (mpme-VAC/STV-1) against *Mycoplasma pneumoniae*. **Computers in Biology and Medicine**, v. 142, p.1-13, mar. 2022.

SBPT, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. nov, 2022. Disponível em: <https://sbpt.org.br/portal/dia-mundial-da-pneumonia-2022/>. Acesso em: 30 de outubro, 2024.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: Novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 5335- 5339, may. 1984b.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, ed.3, v. 188, p. 943-949, feb. 1984a.

SHAMI, A. *et al.* *In Silico* Subtractive Proteomics and Molecular *Docking* Approaches for the Identification of Novel Inhibitors against *Streptococcus pneumoniae* Strain D39. **Life (Basel)**.

v. 13, n. 5, p. 1-25, may. 2023.

SIEGEL, E. R. *et al.* Inhibition of the lipoxin A4 and resolvin D1 receptor impairs host response to acute lung injury caused by pneumococcal pneumonia in mice. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 320, n. 6, p. 1085-1092, apr. 2021.

SUREWAARD, B. G. J. *et al.* Pneumococcal immune evasion: ZmpC inhibits neutrophil influx. **Cellular Microbiology**. v. 15, n. 10, p. 1753-1765, may. 2013.

SUVAITHENAMUDHAN, S.; PARTHASARATHY, S. Molecular Dynamics Simulations of Novel Potential Inhibitors for Penicillin Binding Protein 2B of the Resistant 5204 Strain of *Streptococcus Pneumoniae*. **Current computer-aided drug design**, ed. 3, v. 13, p. 234-248, 2017.

SWEET, M. J. *et al.* Inducible antibacterial responses in macrophages. **Nature reviews immunology**, sep. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01080-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-024-01080-y>. Acesso em: 04 nov. 2024.

UNIPROTKB, Uniprot Knowledgebase. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

VANOMMESLAEGHE, K; MACKERELL, A. D. JR. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. **Journal of Chemical Information and Modeling**, ed. 52, v. 12, p. 3144–3154, dec. 2012

VOLLMER, W.; TOMASZ, A. Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase, a Putative Virulence Factor in *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 12, p. 7176-7178, dec. 2002.

VOLLMER, W.; TOMASZ, A. The pgdA Gene Encodes for a Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 275, n. 27, p. 20496-20501, jul. 2000.

WILSON, R. *et al.* Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 3, p. 627-639, may. 2015.

WEISER, J. N.; FERREIRA, D. M.; PATON, J. C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. **Nature Reviews Microbiology**, ed. 6, v. 16, p. 355-367, jun. 2018.

ZAMAN, Z. *et al.* Targeting protein tyrosine phosphatase to unravel possible inhibitors for *Streptococcus pneumoniae* using molecular docking, molecular dynamics simulations coupled with free energy calculations. **Life Sciences**. v. 118621, p. 1-8, jan. 2021.