

# RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE COMPLEJOS DE DESFERRIOXAMINA CON ALUMINIO, GALIO Y HIERRO EN EL RECEPTOR FHUE: UN ESTUDIO *IN SILICO*

Jesús Alvarado-Huayhuaz<sup>a</sup>, Wilmar Puma Zamora<sup>b</sup>, Atualpa C. Braga<sup>c</sup>, Ana Cecilia Valderrama Negrón<sup>\*a</sup>

## RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud a categorizado a *Acinetobacter baumannii* en la categoría de alta prioridad, debido a que urgen estrategias farmacológicas para combatir su resistencia a los antibióticos. La maquinaria bacteriana de adquisición de hierro ha sido empleada exitosamente en estudios previos con diferentes bacterias Gram-negativas, para internalizar metales abiogénicos coordinados a sideróforos mediante el efecto caballo de Troya, sin embargo, aún no hay reportes con *A. baumannii*. En este trabajo se realizó un estudio *in silico* para conocer las posibilidades de aplicación de este efecto en *A. baumannii*, específicamente analizando su receptor de hierro-sideróforo de tipo hidroxamato (FhuE), y el reconocimiento molecular de los complejos de aluminio-desferrioxamina (Al-DFO) y galio-desferrioxamina (Ga-DFO). Se realizó un análisis estructural y energético de los complejos, incluyendo al control hierro-desferrioxamina (Fe-DFO). Encontramos importantes diferencias en la reactividad química de Fe-DFO, que parecen no influir en el reconocimiento molecular en FhuE. La energía de afinidad y las interacciones intermoleculares fueron prácticamente replicadas al intercambiar el metal, según el análisis de acoplamiento. Sin embargo, según las simulaciones de dinámica molecular, Al-DFO se estabilizó principalmente mediante enlaces de hidrógeno, mientras que Ga-DFO lo hizo en menor medida, asemejándose más a Fe-DFO. Estos resultados nos permiten confirmar que FhuE presenta un reconocimiento molecular de Al-DFO y GaDFO análogo al Fe-DFO, por ello, el diseño de nuevos complejos metal-sideróforo podrían ser una vía exitosa para la aplicación del efecto caballo de Troya en *A. baumannii*.

**Palabras clave:** Desferrioxamina, efecto caballo de Troya, aluminio, galio, *in silico*.

<sup>a</sup> Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx.

<sup>b</sup> Centro de Estudios de Plantas Alimenticias y Medicinales (CEPLAM), Vicerrectorado de Investigación, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Av. de la Cultura 733, Perú.

<sup>c</sup> Grupo de Química Computacional Aplicada, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, Brasil

## MOLECULAR RECOGNITION OF DEFEROXAMINE COMPLEXES WITH ALUMINUM, GALLIUM, AND IRON IN THE FHUE RECEPTOR: AN IN SILICO STUDY

### ABSTRACT

The World Health Organization has categorized *Acinetobacter baumannii* in the high-priority category, due to the urgent need for pharmacological strategies to combat its antibiotic resistance. The bacterial machinery for iron acquisition has been successfully employed in previous studies with different Gram-negative bacteria to internalize abiotic metals coordinated to siderophores through the Trojan horse effect. However, there are no reports yet with *A. baumannii*. In this work, an *in silico* study was conducted to explore the possibilities of applying this effect in *A. baumannii*, specifically by analyzing its hydroxamate-type iron-siderophore receptor (FhuE), and the molecular recognition of aluminum-desferrioxamine (Al-DFO) and gallium-desferrioxamine (Ga-DFO) complexes. A structural and energetic analysis of the complexes was carried out, including the control iron-desferrioxamine (Fe-DFO). We found significant differences in the chemical reactivity of Fe-DFO, which seemed not to influence the molecular recognition in FhuE. The affinity energy and intermolecular interactions were largely replicated when exchanging the metal, as per the docking analysis. However, molecular dynamics simulations showed that Al-DFO was primarily stabilized by hydrogen bonds, while Ga-DFO did so to a lesser extent, resembling Fe-DFO more closely. These results confirm that FhuE exhibits a molecular recognition of Al-DFO and Ga-DFO analogous to Fe-DFO. Therefore, the design of new metal-siderophore complexes could be a successful via for applying the Trojan horse effect in *A. baumannii*.

**Keywords:** Deferoxamine, trojan horse effect, aluminum, gallium, *in silico*.

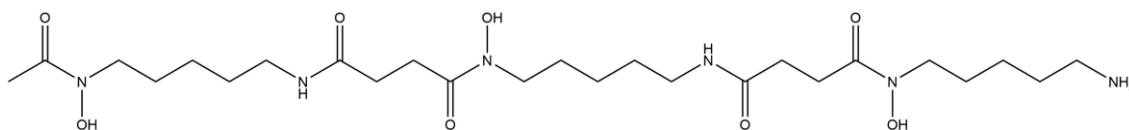
### INTRODUCCIÓN

La estrategia farmacológica llamada efecto caballo de Troya (THA, por sus siglas en inglés: *Trojan Horse Approach*) alude a la Guerra de Troya para explicar cómo se promueve la inserción de un agente tóxico (fármaco) en bacterias, empleando su propio mecanismo bioquímico de adquisición de hierro. En nuestra atmósfera oxidante predomina el  $\text{Fe}^{3+}$ , sin embargo, este presenta una extremadamente baja biodisponibilidad<sup>1</sup>. Las bacterias y otros microorganismos desarrollaron estrategias de quelación para favorecer la formación de complejos de alta estabilidad con  $\text{Fe}^{3+}$ , para ello, sintetizan moléculas quelantes de bajo peso molecular llamadas sideróforos, como por ejemplo, enterobactina en *Escherichia coli* o preacinetobactina en *Acinetobacter*

*baumannii*<sup>2</sup>. El complejo Fe<sup>3+</sup>-sideróforo se puede acoplar en una proteína receptora de sideróforos (endógenos y/o exógenos) localizada en la membrana externa del microorganismo, mediante un conjunto de interacciones intermoleculares con algunos residuos de aminoácidos específicos en la cavidad del receptor que inducen un ajuste dinámico entre el ligando y el receptor<sup>3</sup>. Esta configuración de interacciones, permite el reconocimiento molecular y promueve el proceso de internalización del hierro-sideróforo<sup>4</sup>.

*A. baumannii* es un cocobacilo Gram-negativo oportunista con alta supervivencia y resistencia a los antibióticos, en comparación a otras especies de *Acinetobacter* no *baumannii*. Se asocia principalmente con infecciones nosocomiales en pacientes de cuidados intensivos e inmunocomprometidos. Lamentablemente, la falta de tratamientos eficaces resulta en altas tasas de mortalidad, por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos como una prioridad 1 o crítica, que requiere nuevos antibióticos con urgencia<sup>5,6</sup>.

En nuestro organismo, el mecanismo de defensa promovido por citoquinas, hormonas y proteínas como las lipocalinas<sup>7,8</sup> restringen la disponibilidad de hierro a concentraciones extremadamente bajas (hasta 10<sup>-24</sup> M), en consecuencia, *A. baumannii*, expresa receptores de xenosideróforos tales como desferricoprogen, ácido rodotorúlico y desferrioxamina para incrementar sus posibilidades de captación de hierro<sup>9</sup>. Los sideróforos endógenos identificados en *A. baumannii* son de tipo catecol y son la acinetobactina, la fimsbactina y la baumannoferrina, que son transportadas por diferentes tipos de proteínas receptoras, lo cual destaca su especificidad. En condiciones de alta demanda de hierro, participan proteínas receptoras de sideróforos de otros tipos, como reportaron Grinter y Lithgow en el año 2019<sup>10</sup>, al cristalizar por primera vez el hierro-sideróforo hidroxámico coprogeno (HWS) en la proteína FhuE (por sus siglas en inglés *ferric hydroxamate uptake E*), identificado con 6E4V en el repositorio de proteínas PDB RSCB.



**Figura 1.** Representación molecular de la Desferrioxamina B.

La Desferrioxamina B (DFO, Figura 1) o N-(5-aminopentil)-N-hidroxi-N'-[5-(N-hidroxi-3-{[5-(N-hidroxiacetamido)pentil]carbamoilo}propanamido)pentil]butanodiamida (C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>), es secretada por *Streptomyces pilosus*, y puede ser reconocida por otros microorganismos con receptores de sideróforos de tipo hidroxámico, como es el caso de la proteína FhuE. DFO presenta dos constantes de acidez, 7.92 en los grupos hidroxámicos y 10.23 en el grupo amina, que en medio neutro forma una especie catiónica. La carga total +1 se mantiene al coordinarse con hierro y formar el compuesto Ferrioxamina (Fe-DFO). Se han reportado casos de éxito de aplicación de THA en algunas bacterias Gram

negativas, empleando conjugados de DFO con fármacos o, por otro lado, complejos de DFO coordinando con metales abiogénicos, como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  (Al-DFO)<sup>11</sup> o  $\text{Ga}^{3+}$  (Ga-DFO)<sup>12</sup>, sin embargo, todavía no se estudiaron contra *A. baumannii*.

$\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Ga}^{3+}$ , son parecidos con el ion férrico en el radio iónico (dependiendo de su spin), radio covalente, producto de solubilidad de  $\text{Me}(\text{OH})_3$  (donde Me se refiere al metal) y constante de estabilidad al coordinarse con DFO para formar  $\text{Me}^{\text{III}}$ -DFO (Tabla 1), sin embargo, difieren en configuración electrónica, estructura magnética, temperatura de fusión, densidad y potencial de reducción. En consecuencia, el hierro presenta una marcada diferencia en su abundancia en el universo, en la corteza terrestre y a diferencia de Al y Ga, es esencial su participación en reacciones bioquímicas.

**Tabla 1.** Propiedades de los elementos aluminio, galio y hierro.

	Aluminio	Galio	Hierro
Número atómico	13	31	26
<i>Abundancia (%)</i>			
Universo	0,005	$1 \times 10^{-6}$	0,11
Corteza terrestre	8,1	0,0019	6,3
Humanos	-	-	0,006
<i>Configuración electrónica</i>			
Neutro	$[\text{Ne}] 3s^2 3p^1$	$[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^1$	$[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$
Estado de oxidación 3+	$[\text{Ne}]$	$[\text{Ar}] 3d^{10}$	$[\text{Ar}] 3d^5$
Electronegatividad de Pauling	1,61	1,81	1,83
$I_1 / I_2 / I_3$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	577 / 1816 / 2744	579 / 1979 / 2963	762 / 1562 / 2957
Conductividad eléctrica (S/m)	$3,8 \times 10^7$ (conductor)	$7,1 \times 10^6$ (conductor)	$1,0 \times 10^7$ (conductor)
Tipo magnético	Paramagnético	Diamagnético	Ferromagnético
Temperatura de fusión (°C)	660,32	29,76	1538
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	2,7	5,9	7,8
Potencial de electrodo (V) { $E^\circ$ , $\text{Me}^{3+} + 3e^- \rightarrow \text{Me}$ }	-1,66	-0,549	0,770 ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ )
Radio iónico trivalente (Å), NC=6	0,54	0,62	0,65 d <sup>5</sup> spin alto 0,55 d <sup>5</sup> spin bajo
Radio covalente en $\text{Me}^{3+}$ (Å)	1,18	1,26	1,25
pKa1 del $[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	4,99	2,60	2,20
Log Kps $[\text{Me}(\text{OH})_3]$	-33,5	-37,0	-38,0
Log $\beta$ $[\text{Me}^{\text{III}}\text{-DFO}]$	36,11	38,96	42,33

De los estudios *in vitro* realizados empleando Al, Ga y Fe con DFO (Me-DFO), principalmente se apoyaron de las concentraciones inhibitorias para validar la aplicación de THA, y no se realizó un análisis de las interacciones ligando-receptor. En este trabajo se estudiaron las similitudes y diferencias en reactividad química entre Al-DFO, Ga-DFO y Fe-DFO, y se analizaron sus interacciones intermoleculares con FhuE, empleando cálculo mecánico cuántico, docking molecular y dinámica molecular durante 50 ns, para mejorar la comprensión de los sistemas metal-DFO-FhuE.

## PARTE COMPUTACIONAL

### Optimización estructural y reactividad química

Las coordenadas cartesianas de los átomos de Fe-DFO se obtuvieron de la base de datos cristalográficos de Cambridge (CSD) con el identificador 155586. Se eliminaron las aguas de cristalización y los contraiones. Se usó Gaussian09<sup>13</sup> para optimizar la estructura molecular de Fe-DFO, empleando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT en sus siglas en inglés) al nivel B3LYP<sup>14,15</sup>/6-31G(d,p)<sup>16,17</sup> para los átomos de C, H, O y N, la base SDD<sup>18</sup> adaptada al respectivo pseudopotencial para el átomo metálico. Las correcciones del efecto del solvente han sido consideradas usando el modelo de solvatación implícita SMD<sup>19</sup>. Los estados estacionarios de mínimo no presentaron ninguna frecuencia imaginaria. Se usó el programa Schrödinger<sup>20</sup>, para calcular la desviación cuadrática media de las estructuras superpuestas. Los cálculos con Gaussian09 fueron realizados en el clúster Heimdall del Grupo de Química Computacional Aplicada de la Universidade de São Paulo (Brasil).

Se empleó la estructura de Fe-DFO como plantilla para generar las estructuras de Al-DFO y Ga-DFO. Estas se optimizaron con el mismo nivel de cálculo mencionado y se verificó la ausencia de frecuencias imaginarias. Empleando el Teorema de Koopmans se calcularon los indicadores de reactividad global de Me-DFO (Me: Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup> y Ga<sup>3+</sup>). Para el tratamiento de datos y la generación de gráficas usamos Jmol v14<sup>21</sup>, Matplotlib 3.2.2<sup>22</sup>, Maestro 2023<sup>20</sup> y Chemcraft v1.8<sup>23</sup>.

### Acoplamiento molecular de Me-DFO y FhuE

Empleamos las estructuras optimizadas de Me-DFO y la proteína FhuE, disponible en el banco de datos de proteínas (PDB RCSB) con identificador 6E4V. FhuE recibió un pretratamiento con Wizard de la suite Schrödinger, donde se eliminaron aguas de cristalización y el ligando co-cristalizado HWS (*Ferric coprogen*, C<sub>35</sub>H<sub>53</sub>FeN<sub>6</sub>O<sub>13</sub>). Se editó el estado de protonación del sistema según el pH 7.4 con PropKa y se minimizó la energía del sistema empleando mecánica molecular con el campo de fuerza OPLS. Para la configuración del acoplamiento molecular, se generó el *grid box* empleando HWS como centro de la caja cúbica con 20 Å de arista. El acoplamiento molecular fue realizado con Glide de la suite Schrödinger en modo extra precisión y el análisis de interacciones en dos dimensiones fue realizado con LigPlot+<sup>24</sup>.

### Simulaciones de dinámica molecular

Empleamos las estructuras acopladas en la etapa anterior para preparar los sistemas de dinámica molecular para cada metal-DFO-FhuE. La caja de simulación consistió en una caja ortorrómbica con aristas que distan 10 Å de la parte más externa de la proteína, se adicionaron moléculas de agua usando TIP3P como modelo de solvente, iones de sodio y cloro para neutralizar el sistema y se estableció una concentración salina de 150mM.

Con el campo de fuerza OPLS3, se equilibró el sistema usando Desmond<sup>25</sup> con los ensambles isotérmico-isocórico e isobárico-isotérmico, a temperatura 310K con el termostato de Nosé-Hoover y una presión de 1.01325 bar con el baróstato de Martyna-Tobias-Klein, por 10 y 20 ps, respectivamente. Con este sistema equilibrado se realizó la etapa de producción de 50 ns para cada metal-DFO-FhuE, manteniendo constante el número de partículas, la temperatura (310K) y la presión (1.0 bar) (NPT), con la configuración predeterminada de relajación antes de la simulación<sup>26</sup>.

La animación de la trayectoria fue generada con 1000 frames por sistema y se disponibilizó en nuestro repositorio de Github. Se usó el módulo SID (Simulation interactions diagram) para la generación de la desviación cuadrática media (RMSD), fluctuación cuadrática media de la proteína (RMSF) y del ligando (L-RMSF), diagrama de interacciones intermoleculares y porcentajes, diagrama de barras de la fracción de interacciones, diagrama de contactos ligando-proteína y propiedades del ligando (Ligand-RMSD, radio de giro, interacciones intramoleculares, área de superficie molecular, área de la superficie accesible al solvente y área de la superficie polar). Los cálculos con el programa Schrödinger fueron realizados en LIBIPMET, de la Universidad Nacional de Ingeniería.

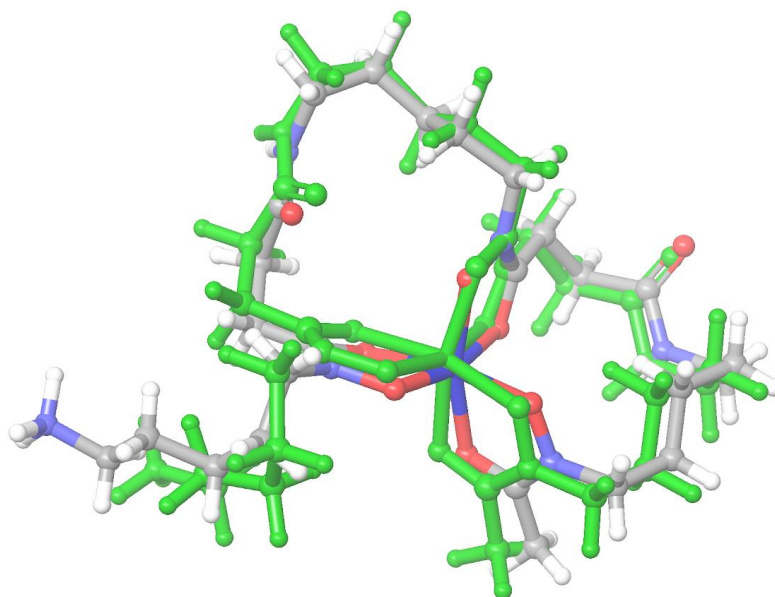
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización estructural y reactividad química

Se obtuvo un RMSD de 0.8 Å entre la estructura cristalizada y la optimizada de Fe-DFO (Figura 2). Esto nos permitió validar el nivel cálculo para usarlo posteriormente en las moléculas de Al-DFO y Ga-DFO.

Las distancias promedio de Fe<sup>3+</sup>-O(C), Fe<sup>3+</sup>-O(N) y N-C(hidroxamato) fueron de 2.12, 2.00 y 1.33 Å respectivamente, con similitud a lo reportado en la literatura<sup>27,28</sup>. Las frecuencias promedio de estiramiento de los grupos amida e hidroxamato fueron 1678 y 1505 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, que son valores aproximados a los reportados por Edwards y colaboradores<sup>29</sup>. Se observan magnitudes análogas en las cargas de Mulliken de casi todos los átomos, siendo más marcada la diferencia en los átomos de N y O en el hidroxamato (átomos 1, 2, 5, 6, 9 y 10 de la Figura 3) y principalmente, en los átomos metálicos, donde observamos 1.6, 1.2 y 0.7 para Al, Ga y Fe, respectivamente. El vector momento dipolar de los complejos no es paralelo, sin embargo, presenta una

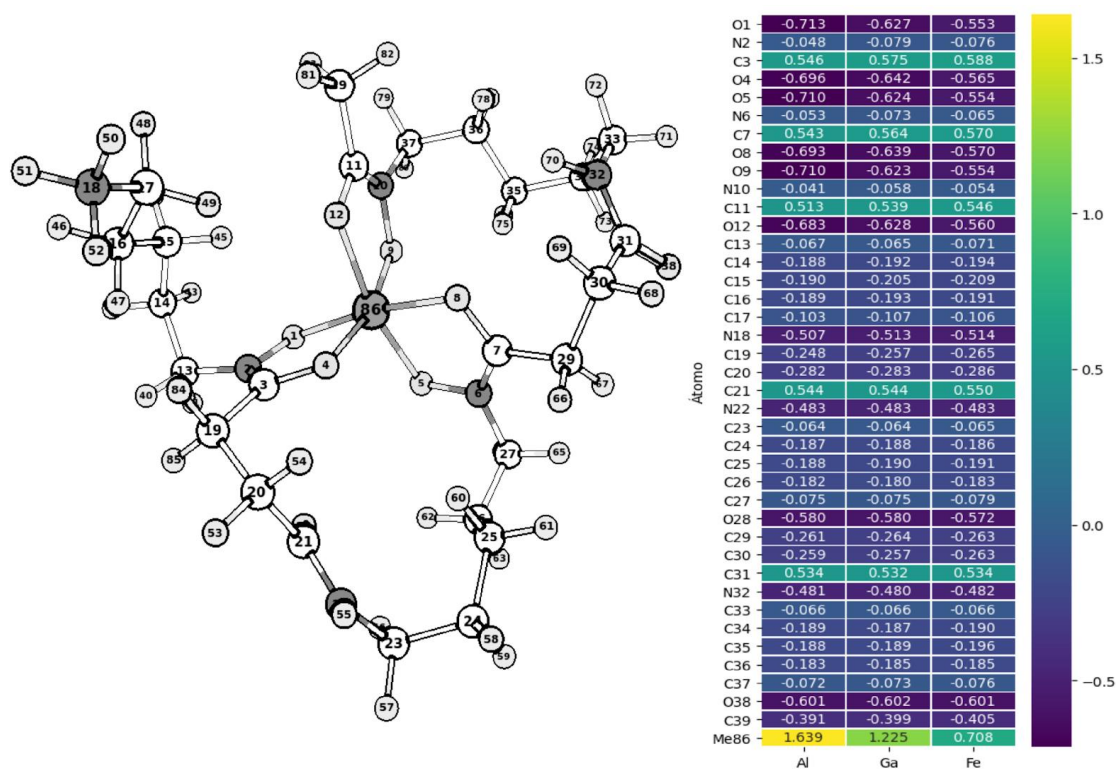
direccionalidad aproximada al grupo amina y un módulo mayor en Al-DFO, que en Ga-DFO y Fe-DFO, que son más cercanos en magnitud (Figura 4).



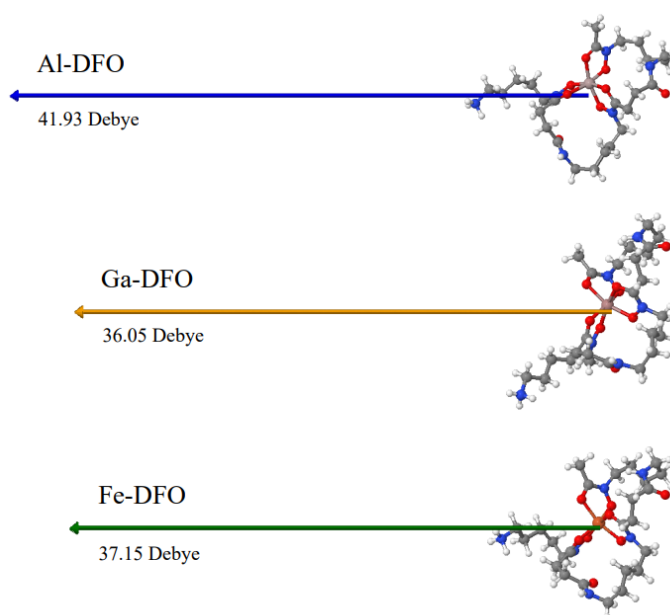
**Figura 2.** Superposición de la estructura optimizada y cristalizada (verde) de Fe-DFO.

Fe-DFO, presentó una menor barrera energética entre sus orbitales frontera HOMO y LUMO ( $E_{\text{gap}}$ ) en comparación con los otros complejos (Tabla 2). Aunque los orbitales HOMO, son análogos en magnitud, LUMO es  $-2.47$  eV para el Fe-DFO mientras que para Al-DFO y Ga-DFO es positivo, con  $0.13$  y  $0.09$ , respectivamente. De acuerdo con el Teorema de Koopmans, encontramos que la reactividad química de los complejos es muy distinta (Figura 5). En comparación con los complejos de aluminio y galio, encontramos que Fe-DFO presenta una menor energía de ionización, mayor potencial químico electrónico, mayor energía de afinidad, menor dureza, mayor blandura y mayor índice de electrofilicidad.

Este mayor grado de polarizabilidad y afinidad por regiones apolares, es favorable en el reconocimiento molecular de Fe-DFO, ya que las cavidades de interacción son predominantemente hidrofóbicas en las proteínas receptoras de membrana, como por ejemplo, en FoxA de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>4</sup> o en FhuA de *Escherichia coli*<sup>30</sup>.



**Figura 3.** Cargas de Mulliken de los átomos en Me-DFO (Me=Al<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> o Fe<sup>3+</sup>). Se suprimieron los hidrógenos para mejorar la visualización.



**Figura 4.** Módulo y dirección del momento dipolar en Me-DFO (Me=Al<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> o Fe<sup>3+</sup>)

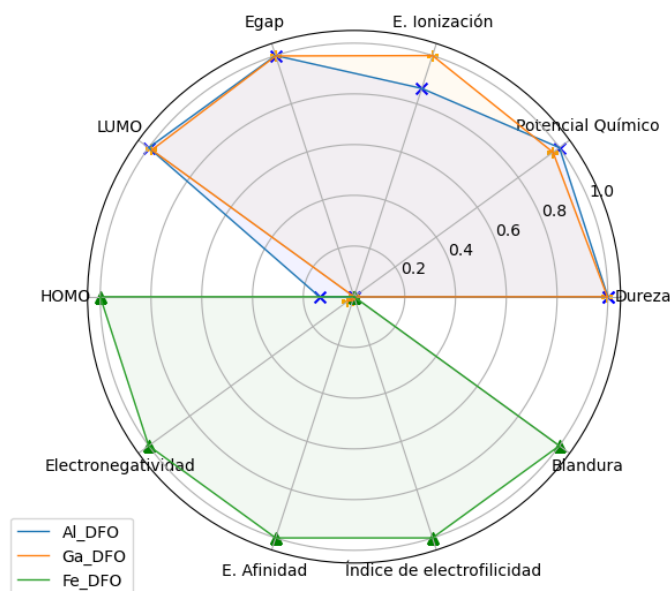


**Tabla 2.** Reactividad global de los complejos Me-DFO.

Compuesto	HOMO / eV	LUMO / eV	Energía gap / eV	Energía de ionización	Afinidad Electrónica
Al-DFO	-5.83	0.13	5.96	5.83	-0.13
Ga-DFO	-5.87	0.09	5.96	5.87	-0.09
Fe-DFO	-5.62	-2.47	3.15	5.62	2.47

Continuación de la Tabla 2.

Compuesto	Potencial químico	Electronegatividad	Dureza	Blandura	Índice de electrofilicidad
Al-DFO	-2.85	2.85	2.98	0.17	1.37
Ga-DFO	-2.89	2.89	2.98	0.17	1.4
Fe-DFO	-4.04	4.04	1.57	0.32	5.19

**Figura 5.** Diagrama de radar de la reactividad global normalizada.

### Acoplamiento molecular de Me-DFO y FhuE

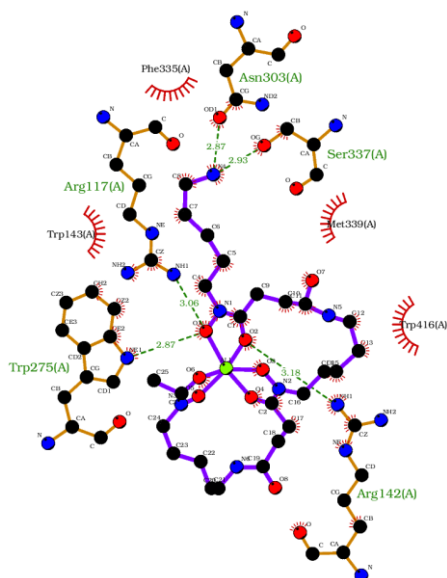
Aunque hay una marcada diferencia en la reactividad química de los iones metálicos en estudio y también de sus complejos con DFO, estas propiedades parecen no influir en el reconocimiento molecular en el receptor FhuE, ya que en las poses de acoplamiento con mayor afinidad entre Me-DFO y FhuE, encontramos ligeras diferencias energéticas y estructurales. Como, por ejemplo, 5.880 kcal/mol de Fe-DFO frente a -5.772 y -5.926 kcal/mol para Al-DFO y GaDFO, respectivamente (Tabla 3). Y en cuanto a la estructura ligando-receptor (Figura 6), se tienen prácticamente los mismos aminoácidos

interactuando, incluso considerando al coprogeno (HWS) cocrystalizado en FhuE: Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337 y Met339 por enlaces de hidrógeno; y Trp143 y Trp416, por interacciones lipofílicas.

**Tabla 3.** Docking score e interacciones intermoleculares de Me-DFO con FhuE.

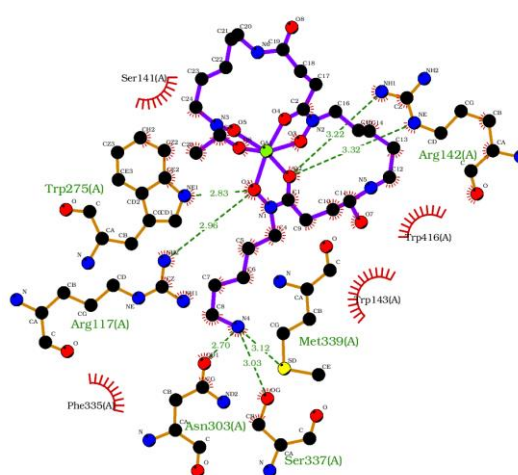
Compuesto	Docking score / kcal.mol <sup>-1</sup>	Enlace de hidrógeno	Lipofílico
HWS	-5.814	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337, Met339	Ser141, Trp143, Gly371, Trp416
Al-DFO	-5.772	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337	Trp143, Phe335, Met339, Trp416
Ga-DFO	-5.926	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337, Met339	Ser141, Trp143, Phe335, Trp416
Fe-DFO	-5.880	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337, Met339	Ser141, Trp143, Phe335, Trp416

Al-DFO

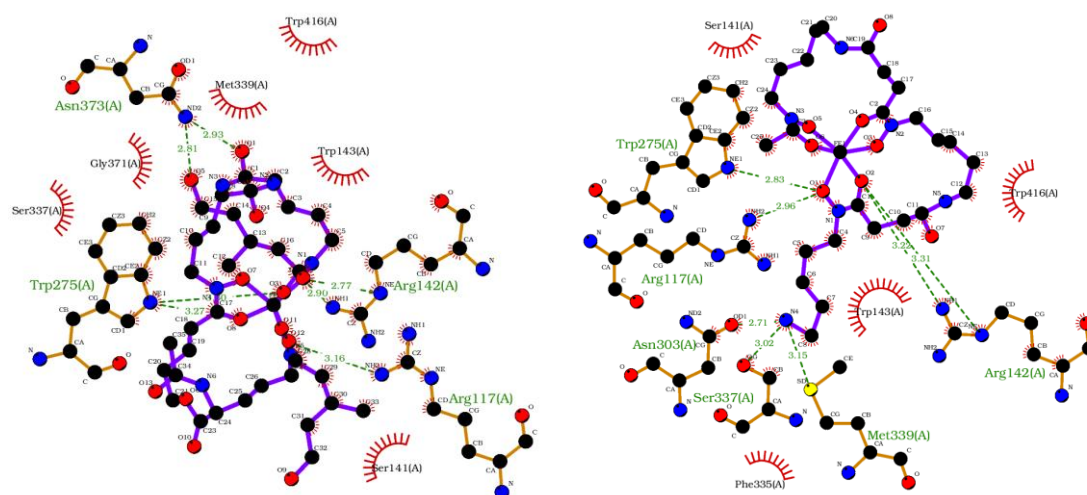


HWS

Ga-DFO



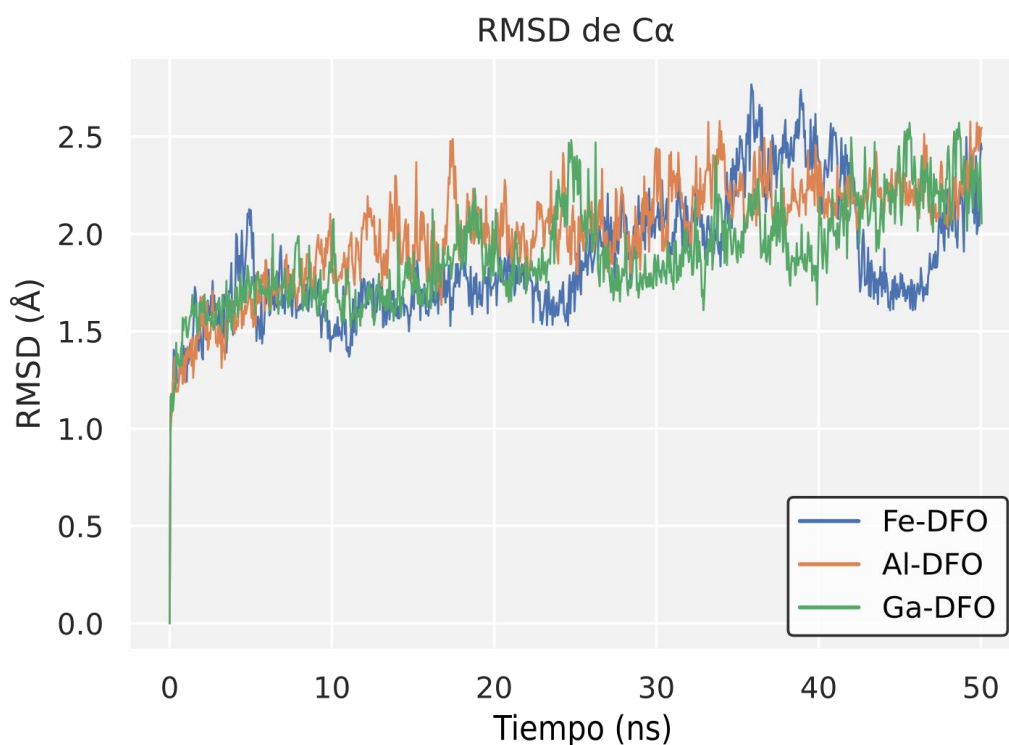
Fe-DFO



**Figura 6.** Diagrama de interacciones intermoleculares entre Me-DFO (Me= $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ) y FhuE.

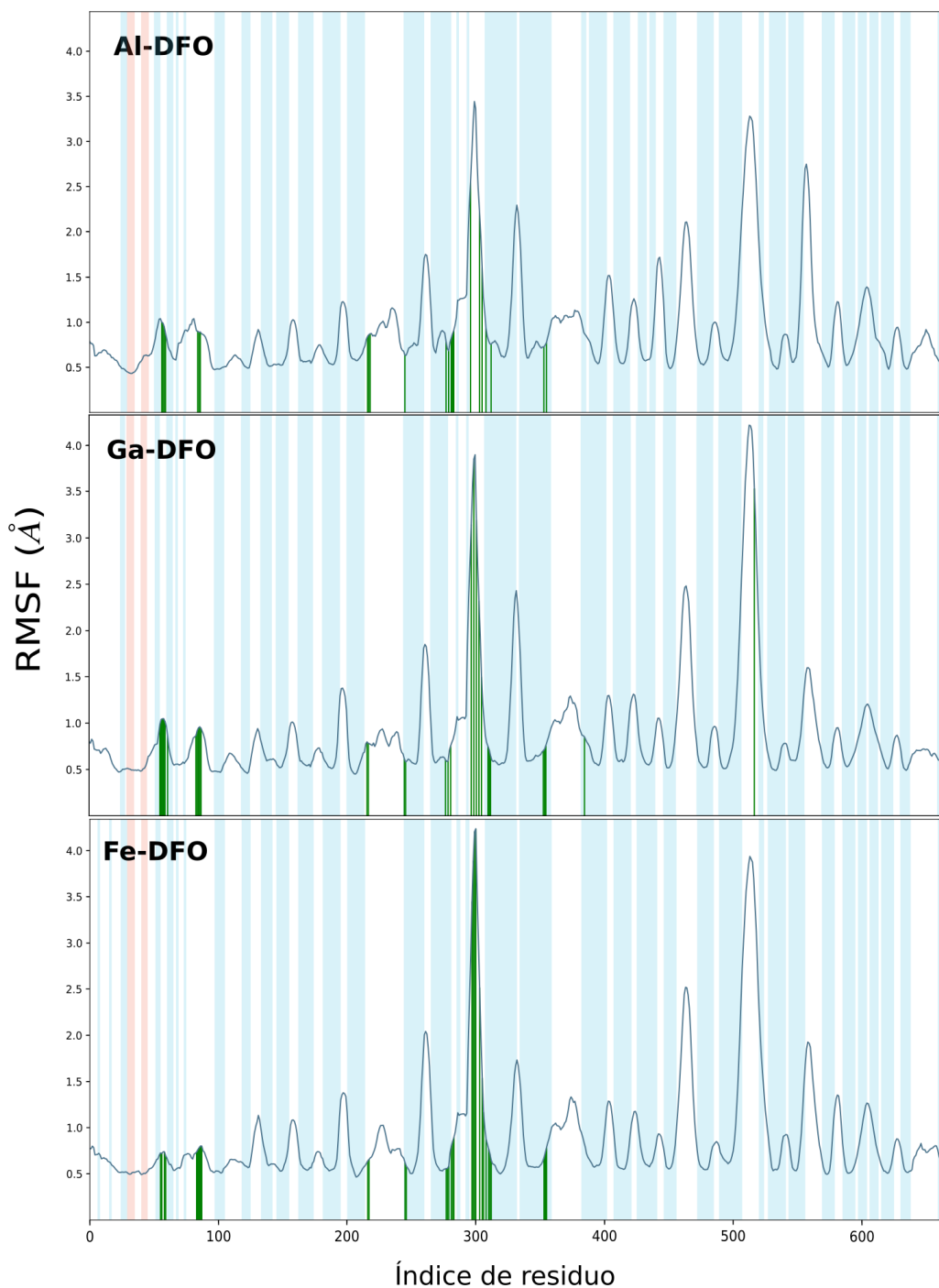
### Simulaciones de dinámica molecular

La Figura 7 muestra que los carbonos  $\alpha$  en el receptor evolucionan hacia 2.0-2.5 Å de RMSD en los 3 casos. No se observan grandes diferencias entre los sistemas evaluados.



**Figura 7.** Desviación cuadrática media (RMSD) de los carbonos  $\alpha$  para los complejos Me-DFO.

La desviación cuadrática media de las fluctuaciones de los residuos (RMSF) permitieron reconocer un perfil análogo entre Me-DFO (Figura 8), y coincidencias en los puntos de contacto (línea vertical de color verde). No se observaron cambios conformacionales (celeste: hoja beta y anaranjado: alfa) durante los 50 ns.



**Figura 8.** RMSF de los residuos de aminoácidos en FhuE.

Identificamos interacciones intermoleculares destacadas durante la simulación. La Figura 9, muestra únicamente las mayores al 30%. A continuación, se analizan las interacciones con aminoácidos que se han conservado o no de acuerdo con la información proveniente del docking molecular, empleando las Figuras 9 y 10.

*Interacciones intermoleculares recurrentes conservadas:*

Arg117: Se ha mantenido con interacción de tipo iónica, debido a su naturaleza catiónica, dirigida hacia los átomos negativos en los hidroxamatos y también mediante enlace de hidrógeno directamente a un oxígeno hidroxámico en Al-DFO, mientras que en Ga-DFO y Fe-DFO, a través de una molécula de agua como intermediaria (puente de agua).

Arg142: Altamente relevante en Al-DFO, mediante enlace de hidrógeno con el oxígeno neutro de dos hidroxamatos, en 44 y 99% (Figura 9). En Ga-DFO y Fe-DFO no hay enlace de hidrógeno, encontramos interacciones menores a 30% empleando aguas como intermediarios, como se observa en color azul en la Figura 10.

Trp143: Interacciones lipofílicas en los tres casos (Me-DFO), incluso también en HWS.

Trp275: En Al-DFO ocurre apilamiento  $\pi$  en un 73% y enlace de hidrógeno en 31%. Esto se intensifica en Ga-DFO: 87 y 89%; y Fe-DFO con 91 y 94%, respectivamente.

Trp416: No aparece en Al-DFO, pero sí en los complejos de Ga y Fe, mediante interacciones hidrofóbicas.

*Interacciones intermoleculares recurrentes no conservadas:*

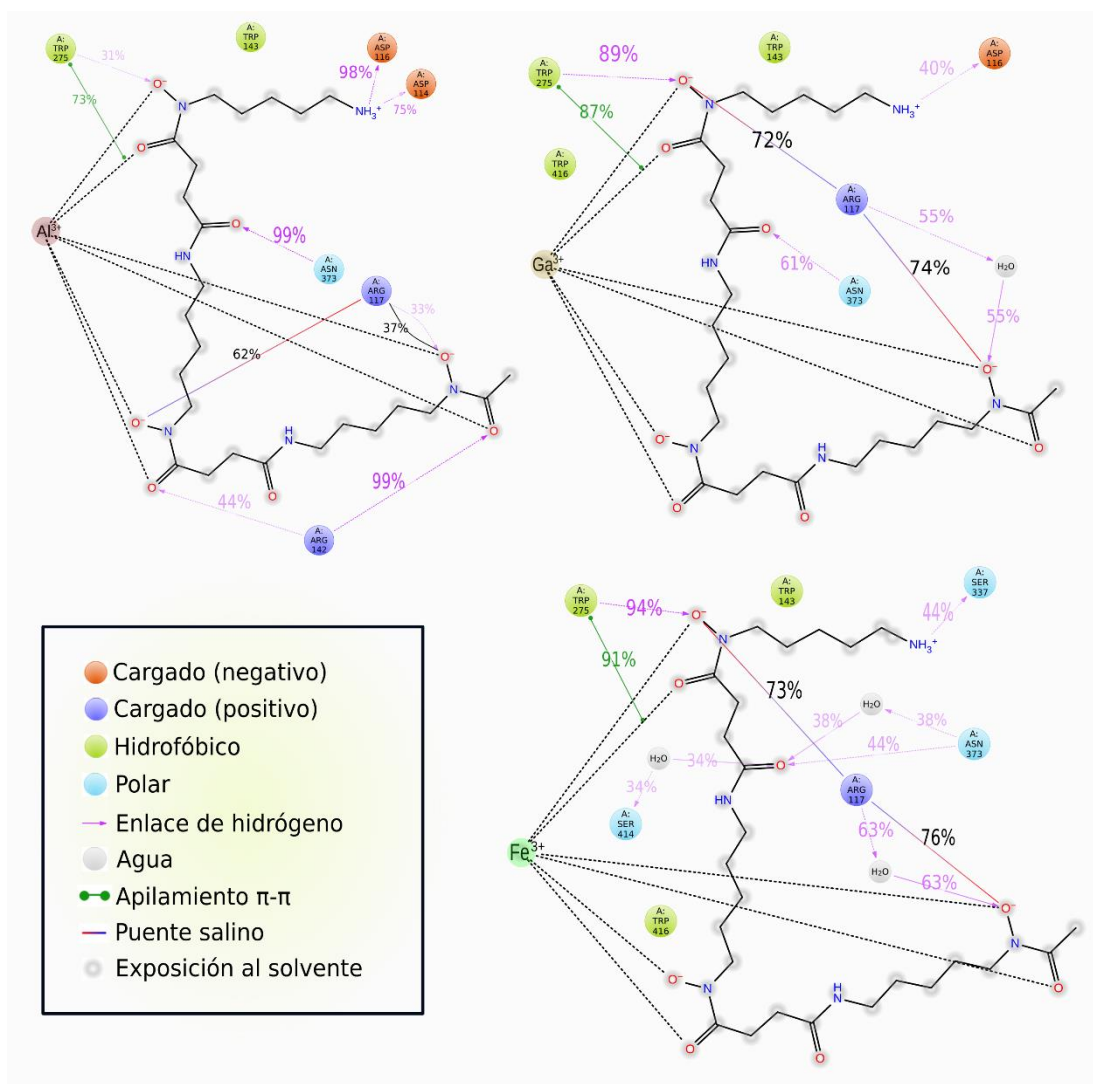
Ser141, Asn303, Phe335, Ser337 y Met339 aparecen en el acoplamiento en la Tabla 3 de Me-DFO, sin embargo, no durante la dinámica molecular.

*Otras Interacciones intermoleculares recurrentes:*

Asn373: Mediante enlace de hidrógeno, con 99% en Al-DFO, 61% en Ga-DFO y 44% en Fe-DFO, dependiente de una molécula de agua en los complejos de Ga y Fe.

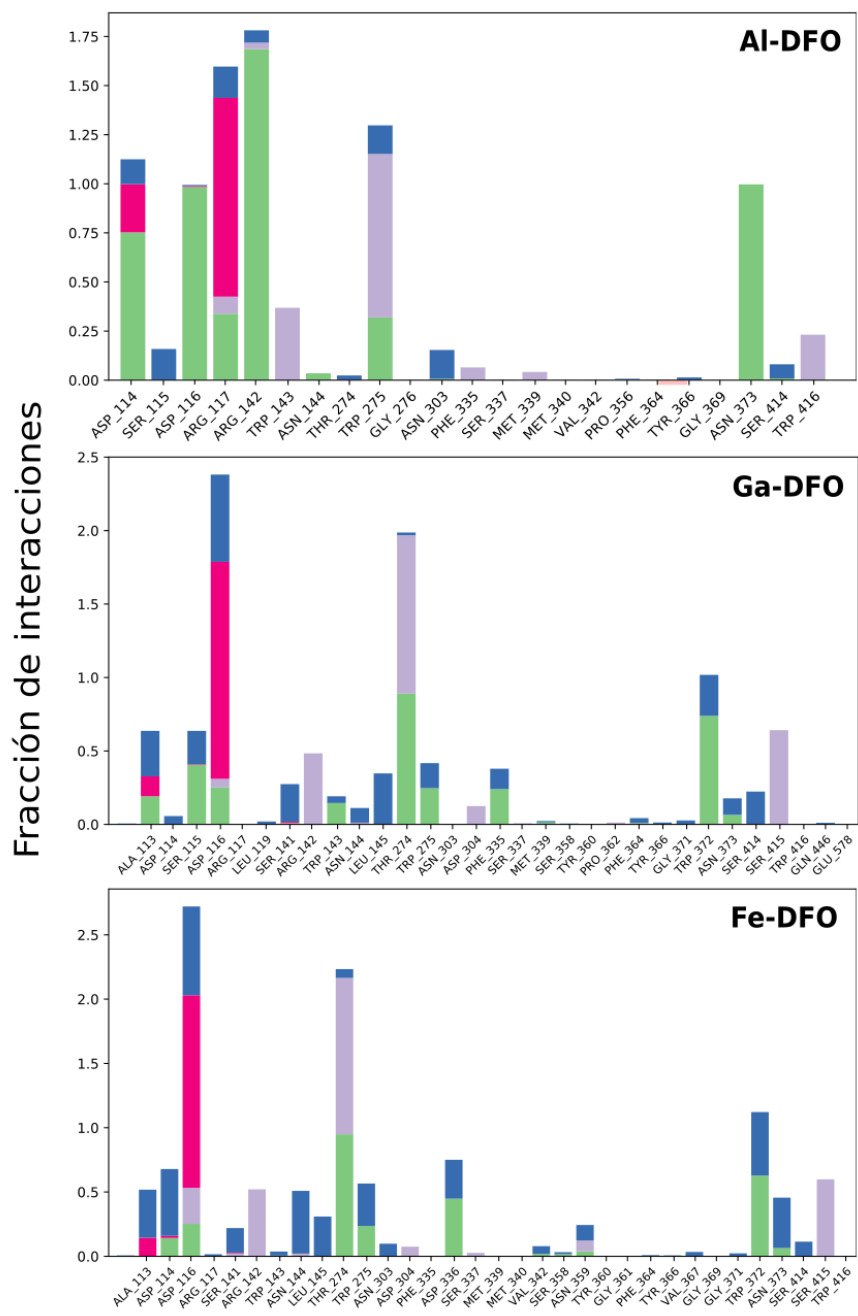
Asp114: Enlace de hidrógeno con la amina de Al-DFO (75%).

Asp116: Con Al-DFO (98%) y Ga-DFO (40%) mediante enlace de hidrógeno.



**Figura 9.** Diagrama de interacciones intermoleculares y porcentajes.

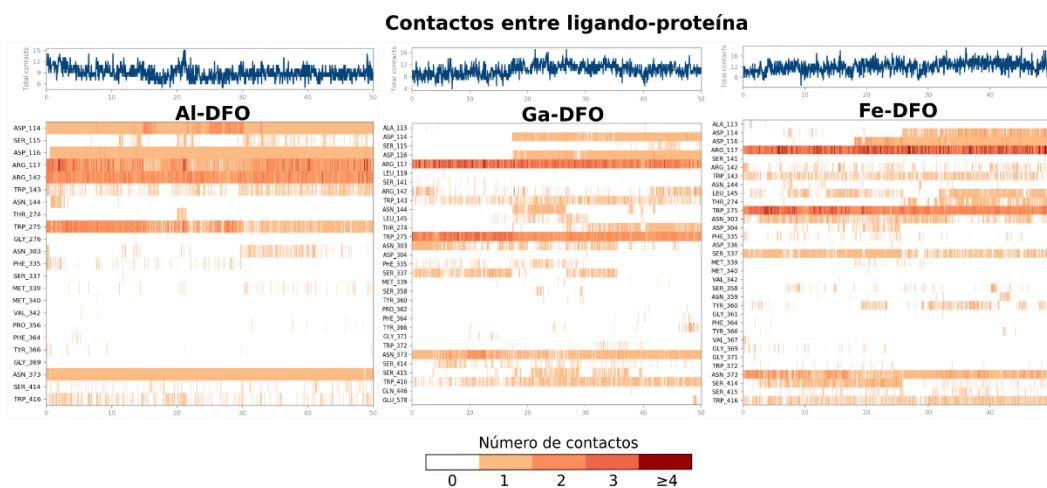
En la Figura 10, en general, observamos un perfil de la fracción de interacciones más parecido entre Ga-DFO y Fe-DFO. En Al-DFO se observa como principal aporte el enlace de hidrógeno (barras verdes).



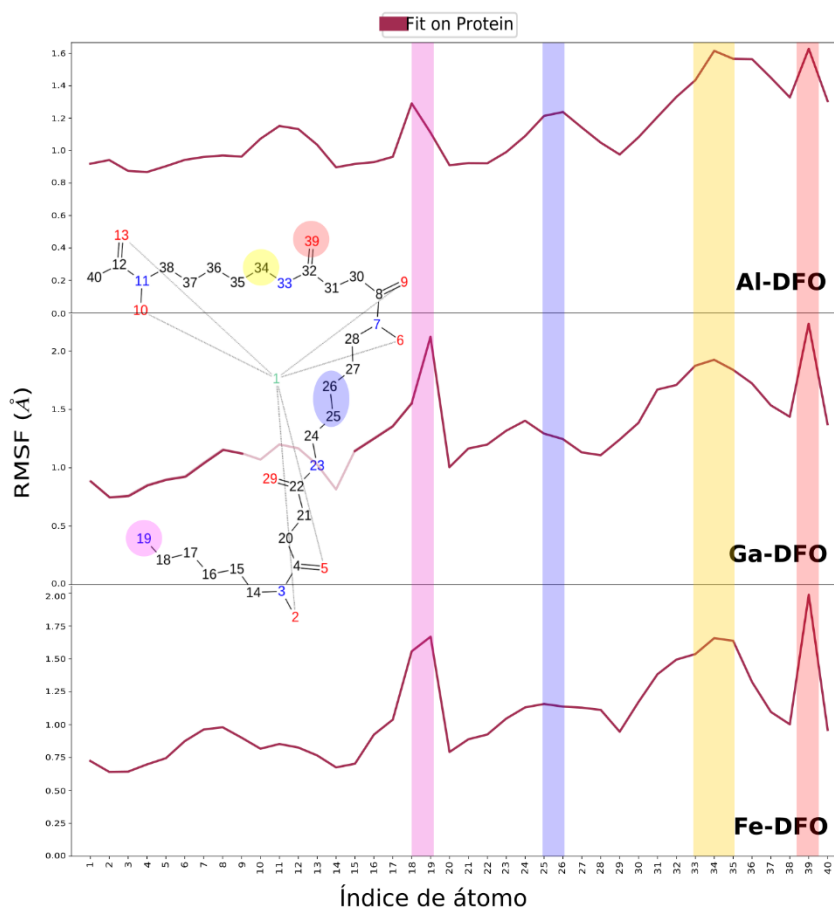
**Figura 10.** Diagrama de barras de la fracción de interacciones. Paleta de colores usadas en las interacciones: enlace de hidrógeno (verde), puente de agua (azul), iónicas (rojo) e hidrofóbicas (morado).

La Figura 11 muestra los momentos (o frames) en que ocurren las interacciones y en asociación con el número de contactos entre Me-DFO y la cavidad de FhuE, se observa como Al-DFO presenta un perfil más distante respecto de Ga-DFO y Fe-DFO.

La Figura 12 muestra que los átomos 19, 25, 26 y 39 en Me-DFO tienen mayor movilidad durante la dinámica molecular, mientras que el metal (átomo 1) y su esfera de coordinación (átomos 2, 5, 6, 9, 10 y 13) son los de menor fluctuación.



**Figura 11.** Diagrama de contactos ligando-proteína.

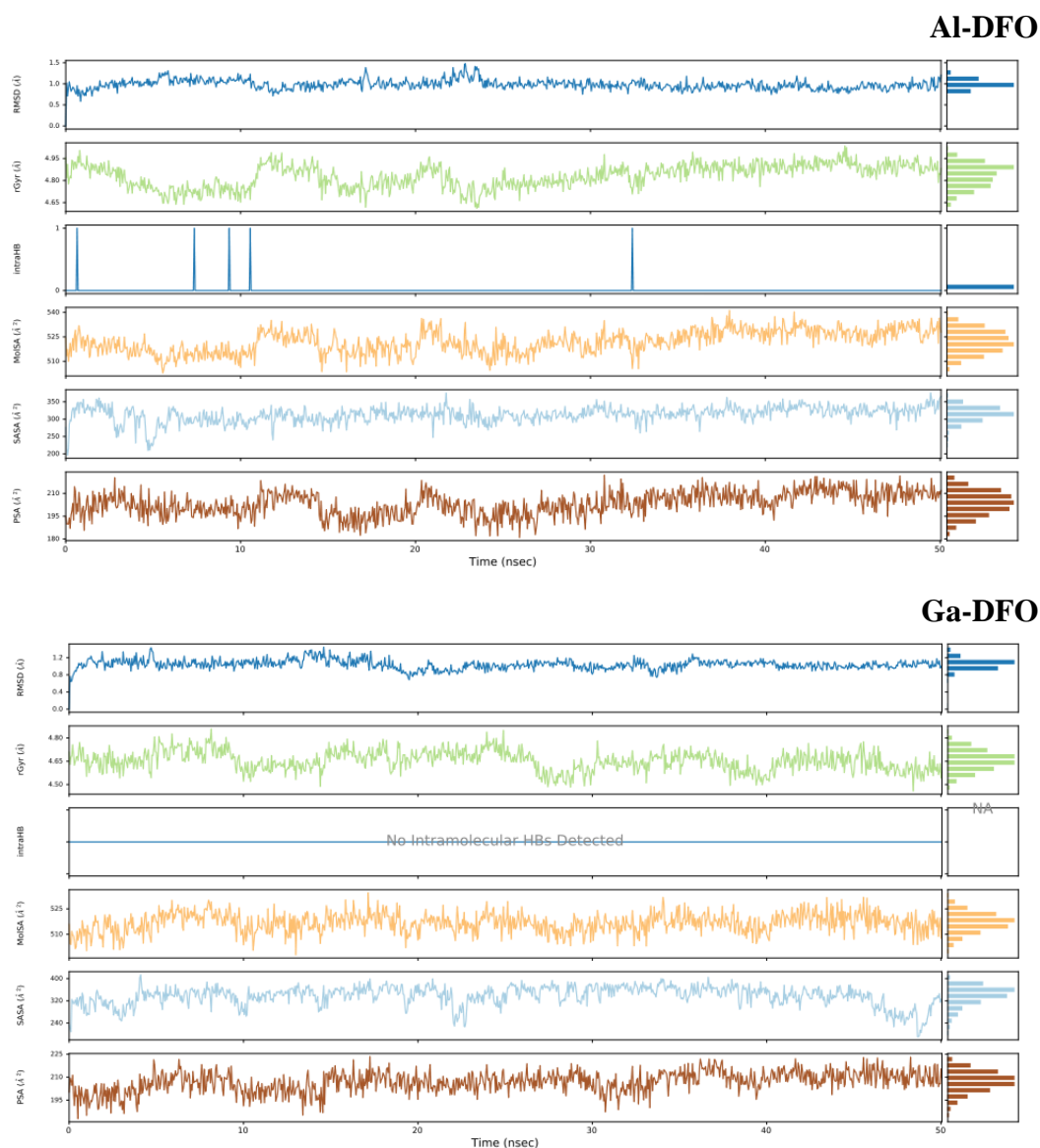


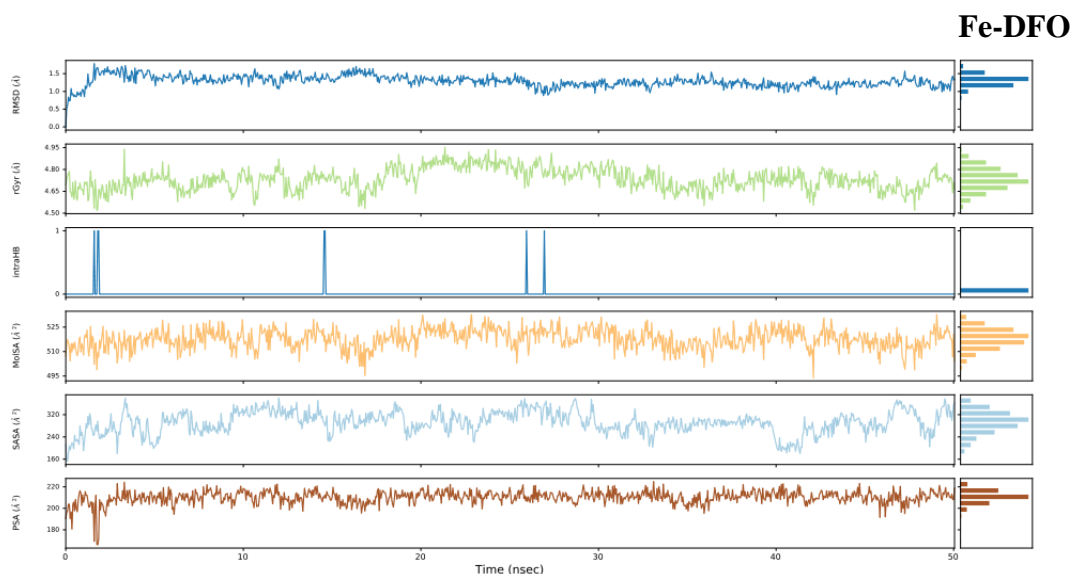
**Figura 12.** Fluctuación cuadrática media del ligando Me-DFO (L-RMSF).



El comportamiento de los ligandos a través de los frames nos permite evaluar qué tantas diferencias presentan entre ellos cuando se encuentran en el sistema de simulación. De esta manera, se observa en los boxplots mostrados en la Figura 13, que presentan ligeras diferencias. Prácticamente no hay interacciones intramoleculares (intraHB), el RMSD de Me-DFO se encuentra en torno de 1 Å, el radio de giro se encuentra alrededor de 4.65-4.85 Å, el área de la superficie molecular (MolSA) alrededor de 520 Å<sup>2</sup> considerando el radio de van der Waals, el área superficial de una molécula accesible por una molécula de agua (SASA) entre 300 a 320 Å<sup>2</sup> y finalmente, el área de la superficie accesible al solvente en una molécula aportada solo por átomos de oxígeno y nitrógeno (PSA), en torno de 200 Å<sup>2</sup>.

En general, nuevamente encontramos que estos se comportan de manera análoga, a pesar de presentar interacciones intermoleculares diferentes como se observó en la Figura 10.





**Figura 13.** Propiedades de Me-DFO: Ligand-RMSD, radio de giro, interacciones intramoleculares, área de superficie molecular, área de la superficie accesible al solvente y área de la superficie polar.

## CONCLUSIONES

Los cálculos realizados con DFT nos han permitido obtener una estructura con RMSD 0.8 Å con respecto del cristal de Fe-DFO, de esta manera, el nivel de cálculo adoptado ha sido suficiente y nos sirvieron en la optimización de las estructuras de Al-DFO y Ga-DFO. Encontramos que los complejos de aluminio y galio presentan diferencias en reactividad química con Fe-DFO, sin embargo, obtenemos energías de afinidad análogas con la proteína FhuE, esto parece indicar que el sideróforo DFO logra apantallar el intercambio de  $\text{Fe}^{3+}$  por  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Ga}^{3+}$ . Descubrimos que durante la simulación de dinámica molecular los complejos Al-DFO y Ga-DFO se comportan de forma análoga con el Fe-DFO, como se puede observar en las fluctuaciones de los átomos del ligando (L-RMSF) o en las interacciones intermoleculares con los residuos de aminoácidos, sin embargo, el tiempo de interacción es diferente y en el caso de Al-DFO, se hace predominante el enlace de hidrógeno, mientras que en Ga-DFO ocurre en menor magnitud, asemejándose más al caso de Fe-DFO. En conclusión, estos resultados nos permiten confirmar que FhuE presenta un reconocimiento molecular de Al-DFO y GaDFO análogo al Fe-DFO, por ello, el diseño de nuevos complejos metal-sideróforo podrían ser una vía exitosa para la aplicación del efecto caballo de Troya en *A. baumannii*.

## AGRADECIMIENTO

JAAH agradece a FONDECYT (Convenio 237- 2015-FONDECYT) por la concesión de la beca de doctorado. Agradecemos también a la profesora Dra. Karina Machado dos Santos (FURG, Brasil) por el apoyo con las simulaciones de dinámica molecular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Codd R. Siderophores and iron transport. In: Comprehensive Inorganic Chemistry III. Elsevier; 2023. p. 3–29.
2. Moynié L, Serra I, Scorciapino MA, Oueis E, Page MG, Ceccarelli M, et al. Preacinetobactin not acinetobactin is essential for iron uptake by the BauA transporter of the pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Elife*. 2018; 7:e42270. doi: 10.7554/eLife.42270.
3. Barreiro EJ, Fraga CAM. Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. 3rd ed. São Paulo, Brazil: Artmed Editora; 2015. 608 p.
4. Josts I, Veith K, Tidow H. Ternary structure of the outer membrane transporter FoxA with resolved signalling domain provides insights into TonB-mediated siderophore uptake. *Elife*. 2019;8:e48528. doi: 10.7554/eLife.48528.
5. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018. 18(3):318–27.
6. OMS. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. [Internet]. 2021 [citado el 17 de julio del 2023]. Disponible en: [bit.ly/43qCuzP](https://bit.ly/43qCuzP)
7. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol*. 2014;5:152. doi: 10.3389/fphar.2014.00152.
8. Khan A, Singh A, Singh P, Kumar R, Ojha KK, Singh VK, et al. LCN2-Fungal siderophore-iron binding and uptake leads to oxidative stress and cell death in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biomol Struct Dyn*. 2023. 10;1–20.
9. Uppalapati SR, Sett A, Pathania R. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Front Microbiol*. 2020;11:589234. doi: 10.3389/fmicb.2020.589234.
10. Grinter R, Lithgow T. Determination of the molecular basis for coprogen import by Gram-negative bacteria. *IUCrJ*. 2019. 1;6(3):401–11.
11. Huayhuaz JAA, Vitorino HA, Campos OS, Serrano SHP, Kaneko TM, Espósito BP. Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;41:16–22.
12. Banin E, Lozinski A, Brady KM, Berenshtein E, Butterfield PW, Moshe M, et al. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci*. 2008. 28;105(43):16761–6.

13. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. G. Gaussian 09. Vol. 121. Wallingford CT.: Gaussian Inc.; 2009. p. 150–66.
14. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*. 1993. 98(7):5648–52.
15. Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J Phys Chem*. 1994 1;98(45):11623–7.
16. Hehre WJ, Ditchfield R, Pople JA. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J Chem Phys*. 1972. 56(5):2257–61.
17. Hariharan PC, Pople JA. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor Chim Acta*. 1973;28(3):213–22.
18. Bergner A, Dolg M, Küchle W, Stoll H, Preuß H. Ab initio energy-adjusted pseudopotentials for elements of groups 13–17. *Mol Phys*. 1993. 20;80(6):1431–41.
19. Marenich A V, Cramer CJ, Truhlar DG. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J Phys Chem B*. 2009 7;113(18):6378–96.
20. Schrödinger Release 2023. New York, NY: LLC; 2023.
21. Hanson RM, Lu X-J. DSSR-enhanced visualization of nucleic acid structures in Jmol. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W528–33.
22. Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput Sci Eng*. 2007;9(3):90–5.
23. Chemcraft - Graphical program for visualization of quantum chemistry computations [Internet]. [citado 10 ene 2023]. Disponible en: <https://www.chemcraftprog.com/>
24. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*. 2011. 24;51(10):2778–86.
25. Bergdorf M, Kim ET, Rendleman CA, Shaw DE. Desmond/GPU Performance as of November 2014. *Shaw Res Tech Rep DESRES/TR-2014-01*. 2014.
26. Rosy J, Babkiewicz E, Maszczyk P, Mrówka P, Kumar B, Murugesan S, et al. l-Ornithine-N5-monooxygenase (PvdA) Substrate Analogue Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa* Infections Treatment: Drug Repurposing Computational Studies. *Biomolecules*. 2022. 25;12(7):887. doi: 10.3390/biom12070887.
27. Dhungana S, White PS, Crumbliss AL. Crystal structure of ferrioxamine B: a comparative analysis and implications for molecular recognition. *JBIC J Biol Inorg Chem*. 2001. 20;6(8):810–8.
28. Domagal-Goldman SD, Paul KW, Sparks DL, Kubicki JD. Quantum chemical study of the Fe(III)-desferrioxamine B siderophore complex—Electronic structure, vibrational frequencies, and equilibrium Fe-isotope fractionation. *Geochim Cosmochim Acta*. 2009.73(1):1–12.

29. Edwards DC, Nielsen SB, Jarzęcki AA, Spiro TG, Myneni SCB. Experimental and theoretical vibrational spectroscopy studies of acetohydroxamic acid and desferrioxamine B in aqueous solution: Effects of pH and iron complexation. *Geochim Cosmochim Acta*. 2005. 69(13):3237–48.
30. Alvarado-Huayhuaz JA, Quispe RIH, Miguel-Calderón KV, Carrascal-Márquez PN, Negrón ACV. Búsqueda de complejos de Fe con potencial actividad vía el Efecto caballo de Troya en *Escherichia coli*. *Rev ECIPerú*. 2021;18(2). doi: 10.33017/RevECIPeru2021.0013/