Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Bioquímica



Anna Clara Milesi Galdino

Mecanismos de ação anti-*Pseudomonas aeruginosa* de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2019

Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Anna Clara Milesi Galdino

Mecanismos de ação anti-*Pseudomonas aerugino*sa de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona



Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Dr. André Luis Souza dos Santos

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2019

Galdino, Anna Clara Milesi.

Mecanismos de ação anti-*Pseudomonas aeruginosa* de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona / Anna Clara Milesi Galdino – Rio de Janeiro: UFRJ / Julho, 2019. 210

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: André Luis Souza dos Santos

 Pseudomonas aeruginosa, 2. 1,10-fenantrolina-5,6-diona, 3. Compostos de coordenação, 4. Resistência antimicrobiana. 5. Terapia anti-virulência. I. Santos, André Luis Souza dos. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título. O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação do Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos.

Anna Clara Milesi Galdino



Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2019.

André Luis Souza dos Santos, Doutor, IMPG - UFRJ

Marcos Dias Pereira, Doutor, IQ - UFRJ

Ana Luiza de Mattos Guaraldi, Doutora, Microbiologia - UERJ

Renata Cristina Picão, Doutora, IMPG - UFRJ

Fábio Aguiar Alves, Doutor, Patologia - UFF

AGRADECIMENTOS

"Aqueles que passam por nós, não vão sós e não nos deixam sós. Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós" Antoine de Saint-Exupéry

Esta tese marca o final de uma árdua jornada repleta de desafios, superações e amadurecimento. Com o coração transbordando de alegria e gratidão agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Começo agradecendo ao meu querido orientador Prof. André Luis Souza dos Santos. André, serei eternamente grata por todas as experiências que vivi sob a sua orientação. No seu laboratório eu tive o primeiro contato prático com a vida acadêmica e todos os conselhos, esporros e o, já clássico "sugiro fortemente", fizeram de mim uma CIENTISTA. Muito obrigada! Tenho muito orgulho de ter tido o privilégio de iniciar história científica no seu grupo, e quero que saiba que você sempre será referencial de competência e profissionalismo. Você é fonte inesgotável de conhecimento e inspiração!

Aproveito a oportunidade para agradecer à Profa. Marta Helena Branquinha (IMPG-UFRJ) por seus conselhos, sempre muito sensatos. Muito obrigada pelo carinho e paciência de sempre, além das excelentes contribuições científicas.

Aos professores Malachhy McCann (Maynooth University) e Michael Devereux (Technological University Dublin) pela síntese dos compostos utilizados no presente trabalho e pela interação BRASIL-IRLANDA produtiva que construímos nos últimos anos.

Agradeço ao Prof. Teodorico Ramalho e ao Dr. Alexandre Castro, Universidade de Lavras, pela valiosa contribuição nos experimentos de modelagem molecular.

Ao Prof. Marcos Dias e à mestranda Larissa Mattos pela inestimável colaboração com experimentos *in vivo* usando as larvas de *Galleria mellonella*.

Gostaria de agradecer ao Dr. Eoh (University of Southern California) pela oportunidade incrível e pelos valiosos ensinamentos de Bioquímica e Metabolômica. Não posso deixar de agradecer aos meus queridos "labmates" da USC Joey, Juheyon, Warissa e Camila pela convivência gostosa e por todo auxílio e paciência durante minha fase de adaptação.

Deixo registrada minha profunda gratidão a todos os membros e ex-membros do Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (ex-LIP, ex-LEIBM). Sem sombra de dúvidas, o espírito colaborativo e a excelente convivência no laboratório foram decisivas para a conclusão deste trabalho. Em especial, sou extremamente grata pelas amizades que construí durante esses anos no laboratório: Thaís, Lívia Ramos, Simone e Laura, muito obrigada pelo carinho e infindáveis trocas de ideias! Continuem trabalho duro, tenho certeza que o futuro de vocês será brilhante. Contem comigo SEMPRE!

A minha querida amiga Lívia Viganor, que me co-orientou durante a iniciação científica, agradeço por me apresentar o universo fascinante de *Pseudomonas aeruginosa*. Carrego comigo todos os sábios conselhos que você já me deu nestes anos de amizade! Você é mara!

Aos meus amigos Henry, Taissa, Mari C., Phelipe e Laís, que desde o início da graduação, dividem seu amor pela ciência comigo e são companhias maravilhosas para os momentos de descontração: Obrigada galera!

Agradeço aos meus pais, Dário e Joseli, por todo o esforço dedicado à minha formação pessoal e profissional e, principalmente, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos (mesmo quando nem eu acreditava). Não posso deixar de agradecer à minha irmã, Anna Beatriz, por ser minha parceira para todas as horas. Apesar da distancia, vocês estiveram, e sempre estarão, ao meu lado a cada passo que eu der. Amo muito vocês!

Ao Matheus, meu companheiro de vida, agradeço por toda dedicação e apoio durante todos estes anos. Você tem sido a fonte de alegria e conforto para todos os momentos e suas palavras de amor e incentivo foram essenciais para que eu chegasse até aqui!

Agradeço aos meus tios, Joseani e Claine, por abrirem as portas da casa para me receber e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos meus avós, José, Gabira, Davi (*in memoriam*) e vovó Cida por serem meus maiores exemplos de determinação.

Meu mais doce agradecimento à minha família, em especial à minha tia Geovana e meus primos Ariel, Matheus, Malu e Dudinha por serem meus companheiros de todas as horas e pela compreensão pelos muitos momentos que tive ausente, principalmente no finalzinho desta jornada.

Ao financiamento concedido pelas agências de fomento, CAPES, FAPERJ e CNPQ, que foi essencial para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

GALDINO, Anna Clara Milesi. Mecanismos de ação anti-*Pseudomonas aeruginosa* de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno humano oportunista. A rápida emergência de mecanismos de resistência em P. aeruginosa resulta em sucessivas falhas terapêuticas, aumentando, assim, as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a este patógeno. Diante da demanda por novas estratégias terapêuticas anti-P. aeruginosa; no presente trabalho, observou-se que os compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), [Ag(fendiona)₂]ClO₄ (Ag-fendiona) e [Cu(fendiona)₃](ClO₄)₂.4H₂O (Cu-fendiona), afetaram significativamente a atividade enzimática da elastase B (LasB), um fator de virulência protagonista na patogênese de P. aeruginosa. As análises in silico (docking molecular) revelaram que fendiona e seus derivados de Ag⁺e Cu²⁺ foram capazes de interagir com resíduos de aminoácidos do sítio ativo de LasB, destacando-se o composto Cu-fendiona, que apresentou os valores de energia de interação mais favoráveis. Adicionalmente, os compostos estudados inibiram in vitro a atividade proteolítica de LasB, sendo Cu-fendiona o composto com atividade inibitória mais potente (K_i = 90 nM). Células bacterianas apresentaram uma inibição considerável na expressão do gene lasB bem como na produção/secreção do produto proteico final (LasB madura), guando incubadas em concentrações sub-inibitórias dos referidos compostos. Ag-fendiona e Cu-fendiona exibiram ação protetiva contra os efeitos tóxicos de LasB em células epiteliais pulmonares, reduzindo os danos na monocamada de A549 em aproximadamente 32% e 42%, respectivamente. Cu-fendiona também neutralizou os efeitos tóxicos induzidos por LasB, aumentando a taxa de sobrevivência de larvas de Galleria mellonella inoculadas tanto com sobrenadante de P. aeruginosa, rico nesta enzima, quanto com a enzima purificada. Portanto, esse conjunto de resultados enfatiza a ação anti-virulência de compostos derivados da fendiona, principalmente Cu-fendiona, um potente inibidor de LasB. Em seguida, a ação dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona foi investigada in vitro sobre o crescimento bacteriano. Nossos resultados revelaram que Ag-fendiona e Cufendiona apresentaram uma exuberante ação bactericida, inibindo o crescimento planctônico de diferentes isolados clínicos de P. aeruginosa. Além disso, Ag-fendiona e Cu-fendiona em combinação com um antimicrobiano clássico pertencente às cefalosporinas, ceftazidima, agiram sinergicamente no controle do crescimento de P. aeruginosa. Os mecanismos de ação anti-P. aeruginosa dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona foram investigados através de diferentes metodologias. Nesse sentido, a indução de estresse oxidativo foi um importante componente para promover a morte das células bacterianas. Verificou-se que os compostos testados induziram a(o): (i) aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, (ii) ativação da resposta antioxidante via produção de catalase e superóxido dismutase, (iii) danos oxidativos a enzimas (inibição da atividade de aconitase), fragmentação do DNA e peroxidação de lipídeos de membrana. Em contrapartida, verificou-se que o co-tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína foi capaz de restaurar o crescimento planctônico de P. aeruignosa incubados na presença de Ag-fendiona e Cufendiona. Os compostos derivados da fendiona promoveram também o colapso das membranas bacterianas (membrana externa e plasmática) bem como alteraram os perfis de estabilidade, permeabilidade e polarização de membrana plasmática. Para uma visão global acerca dos efeitos dos compostos derivados de fendiona, realizamos uma análise metabolômica. Ag-fendiona e Cufendiona promoveram severas alterações no metabolismo bacteriano, dentre as quais destacam-se: a hiperativação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da enzima NADH:ubiquinona oxirredutase, associada à inativação da via das pentoses fosfato e da via de biossíntese de folato. A inibição destas vias (i) promoveu a depleção do conteúdo intracelular de NADPH e (ii) impossibilitou o *turnover* de glutationa, uma importante molécula antioxidante. Por fim, demonstrou-se que as alterações metabólicas induzidas pelos compostos derivados da fendiona estão correlacionados à indução do estresse oxidativo. Coletivamente, nossos resultados destacam que a coordenação da fendiona com íons metálicos, em especial, Ag^+ e o Cu^{2+} , representa um novo grupo promissor de agentes antimicrobianos contra cepas de *P. aeruginosa* não-responsivas à antibioticoterapia clássica. Além disso, a indução de estresse oxidativo na célula bacteriana é um evento-chave para o efeito bactericida destes novos compostos antimicrobianos.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, 1,10-Fenantrolina-5,6-diona, Compostos de coordenação, Resistência antimicrobiana, Terapia anti-virulência, Mecanismos de ação

ABSTRACT

GALDINO, Anna Clara Milesi. Mechanisms of anti-*Pseudomonas aeruginosa* action of coordination compounds derived from 1,10-phenanthroline-5,6-dione. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunist human pathogen. The rapid emergence of mechanisms of resistance in *P. aeruginosa* results in successive therapeutic failure, raising the morbidity and mortality rates related to this pathogen. Given the demand for novel anti-P. aeruginosa therapeutical alternatives, it was observed, in this current study, that coordination compounds derived from 1,10-phenantroline-5,6-dione (phendione), [Ag(phendione)₂]ClO₄ (Agphendione) and Cu(phendione)₃](ClO₄)₂.4H₂O (Cu-phendione) significantly affected the activity of elastase B (LasB), which is a well-known protagonist in the P. aeruginosa pathogenesis. Analysis *in silico* (molecular docking) has shown that phendione and its Ag⁺ and Cu²⁺ derivative compounds were able to interact with amino acid residues into the LasB active site, particularly Cu-phendione that exhibited the most favorable interaction energy parameters. Additionally, the test compounds in vitro inhibited the LasB enzymatic activity, in which Cu-phendione had the most potent inhibitory effect ($K_i = 90$ nM). Bacterial cells treated with a sub-inhibitory concentration ($\frac{1}{2} \times MIC$ value) of the test compounds caused a significant reduction on both expression of the *lasB* gene and final proteic product (the mature LasB protein). Ag-phendione and Cu-phendione exhibited protective action against the LasB-iduced toxic effects, reducing A549 monolayer damage by approximately 32% and 42%, respectively. Also, Cu-phendione neutralized the LasB-induced toxic effects, increasing the survival rate of Galleria mellonella larvae when inoculated with either LasB-enriched pseudomonal supernatant or purified LasB. Therefore, these data emphasize the anti-virulence action of phendione-derivative compounds, especially Cu-phendione, which is a powerful LasB inhibitor. Subsequently, it was investigated the in vitro effects of Ag-phendione and Cu-phendione on bacterial growth. Our results revealed that Ag-phendione and Cu-phendione presented a strong bactericidal effect, inhibiting the planktonic growth of different clinical isolates of P. aeruginosa. Further, Ag-phendione and Cuphendione in combination with ceftazidime, a classical antimicrobial agent, acted synergistically to control the P. aeruginosa growth. The anti-P. aeruginosa mechanisms of action of Agphendione and Cu-phendione were also investigated using different methodologies. In this sense, the induction of oxidative stress was an important component that triggers the bacterial killing. In this way, the test compounds induced an: (i) increase in the intracellular reactive oxygen species production, (ii) activation of antioxidant response via catalase and superoxide dismutase, (iii) oxidative damage of enzymes (e.g., aconitase inhibition), DNA fragmentation and membrane lipid peroxidation. In contrast, it was found that the co-treatment with the antioxidant N-acetylcysteine was able to restore the planktonic growth of P. aeruignosa when incubated with either Agphendione or Cu-phendione. Phendione-derivative compounds also promoted collapse of the bacterial membranes (both outer and plasmatic membranes), affecting their stability, permeability and polarization profiles. For an overview on the effects of phendione-derivative compounds, it was carried out a metabolomic approach. Our results showed that Ag-phendione and Cu-phendione promoted extensive alterations on the bacterial metabolism, such as the hyperactivation of both tricarboxylic acids and NADH:ubiquinone oxireductase enzyme, meanwhile the compounds inhibited pentose phosphate pathway and folate biosynthesis. The inhibition of these pathways

promoted the depletion of NADPH intracellular content and also impaired the turnover of glutathione, which is an important antioxidant molecule. Finaly, it was demonstrated that metabolic changes induced by phendione-derivative compounds were correlated with the induction of the oxidative stress on *P. aeruginosa* cells. Collectively, our results accentuate that the coordination of fendione with metal ions, especially Ag⁺ and Cu²⁺, represent a promising new group of antimicrobial drugs against *P. aeruginosa*, including resistant strains, Also, the induction of oxidative stress in bacterial cells is a key event for bactericidal effects of these new compounds.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, 1,10-Phenanthroline-5,6-dione, Coordination compounds, Antimicrobial resistance, Antivirulence therapy, Mechanisms of action.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Local de isolamento e perfil de suscetibilidade das amostras de P. aeruginosa	
utilizadas no presente estudo	6
Tabela 2- Primers utilizados na reação de RT-PCR para a quantificação da expressão	
gênica de lasB e rpoD	3
Tabela 3 - Energias de interação entre os compostos derivados da fendiona e o sítio ativo	
da LasB de P. aeruginosa	0
Tabela 4 – CMIs dos compostos derivados da fendiona no crescimento planctônico de P.	
aeruginosa (ATCC 27853) em diferentes meios de cultivo	0
Tabela 5 – CMIs e CMBs dos compostos derivados da fendiona no crescimento	
planctônico de isolados clínicos P. aeruginosa com perfil de resistência a antimicrobianos	
clássicos	1
Tabela 6 – Valores de FIC index das combinações de derivados da fendiona e ceftazidima	
sobre o crescimento de <i>P. aeruginosa</i>	6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tendência nas taxas de prevalência média de microrganismos resistentes	a
antimicrobianos entre os anos de 2005 e 2030.	24
Figura 2 – Distribuição geográfica da prevalência de cepas de <i>P. aeruginosa</i> resisten	ite aos
carbapenêmicos entre os anos de 2009 e 2011 (HONG et al., 2015)	
Figura 3 – Pseudomonas aeruginosa	
Figura 4 – Fatores de virulência produzidos por <i>P. aeruginosa</i>	
Figura 5 – Sequência de aminoácidos de LasB de <i>P. aeruginosa</i> .	
Figura 6 – Participação da LasB em múltiplos processos fisiopatológicos de P. aerug	rinosa.
Figura 7 – Número de novos antimicrobianos aprovados para o uso clínico nos últin	105
anos.	
Figura 8 – Numero crescente de publicações relacionadas a estrategia anti-virulenci	a 38
Figura 9 – Estudos de docking molecular entre LasB e 1,10-fenantrolina.	
Figura 10- Estrutura basica de compostos de coordenação e principais metalofarma	icos de
Figura 12 – Estrutura química da 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados: 1,10 $f_{1,1}$)-
tenantrolina-5,6-diona (A), [Cu(tendiona)3](ClO4)2.4H2O (Cu-tendiona) (B) e	- 7
[Ag(fendiona) ₂]CIU ₄ (Ag-fendiona) (C).	
Figura 15 – Representação esquemática do alinnamento das sequencias de GAPDH	()
produzida por numanos e <i>P. aeruginosa</i> .	
Figura 14 – Interações moleculares entre o sitio ativo de LasB de P. deruginosa e os	01
compostos derivados da lendiona.	ði
Figura 15 – Eleitos dos compostos derivados da lendiona na atividade enzimatica de	
produzida por P. aeruginosa.	83
rigura 10 – Eleitos dos compostos derivados da lendiona na expressão do gene <i>lasb</i>	е па
Figure 17 Efeites des compostes derivades de fondiene sobre denes colulares com	03 adas
rigura 17 – Eleitos dos compostos derivados da lendiona sobre danos celulares caus	auos 07
Figure 18 Efaites de compostos derivados de fondione na texisidade induzida nor	0/
am larvas do <i>G. mallanalla</i>	
Eigura 10 Curve tompo morte dos compostos derivados de fondione em <i>P. agrugiu</i>	(1, 1)
rigura 17 – Curva tempo-morte dos compostos derivados de rendiona em 1. <i>derugu</i>	<i>iosu</i> . 1). 03
Figura 20 – Curva tempo-morte dos compostos derivados da fendiona em cenas clín	icas de
P apruginosa	
Figura 21 – Curva tempo-morte da combinação de Ag-fendiona e ceftazidima em ce	
clínicas de <i>P aeruginosa</i>	pus 97
Figura 22 – Curva tempo-morte da combinação de Cu-fendiona e ceftazidima em ce	> nas
clínicas de <i>P aeruginosa</i>	98
Figura 23 – Efeitos de N-acetilcisteína (NAC) na tolerância de P <i>aeruginosa</i> aos der	ivados
da fendiona.	100
Figura 24 – Efeitos de <i>N</i> -acetilcisteína (NAC) na tolerância de cenas clínicas de <i>P</i> .	
aeruginosa aos derivados da fendiona	101
Figura 25 – Acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em célula	is de <i>P</i> .
<i>aeruginosa</i> tratadas com compostos de coordenação derivados da fendiona	102
g	

Figura 26 – Acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cepas clínicas
de P. aeruginosa tratadas com compostos de coordenação derivados da fendiona103
Figura 27 - Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da catalase em <i>P</i> .
aeruginosa
Figura 28 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade de catalase em cepas
clínicas de <i>P. aeruginosa</i> . 106
Figura 29 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima
antioxidante superóxido dismutase (SOD) em P. aeruginosa107
Figura 30 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima
antioxidante superóxido dismutase (SOD) em P. aeruginosa. 108
Figura 31 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima aconitase
de P. aeruginosa. 110
Figura 32 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima aconitase
em cepas clínicas de P. aeruginosa
Figura 33 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na fragmentação do DNA de cepas
clínicas de <i>P. aeruginosa</i> . 112
Figura 34 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na fragmentação do DNA de cepas
clínicas de <i>P. aeruginosa</i> . 112
Figura 35 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na peroxidação de lipídeos em P.
aeruginosa
Figura 36 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na peroxidação de lipídeos em <i>P</i> .
aeruginosa
Figura 37 – Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a ultraestrutura de <i>P</i> .
aeruginosa
Figura 38 – Desestabilização da membrana externa de P. aeruginosa118
Figura 39 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na integridade de membrana
plasmática de P. aeruginosa
Figura 40 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na polarização de membrana
plasmática de <i>P. aeruginosa</i>
Figura 41 – Curva tempo-morte dos compostos derivados da fendiona em culturas de P.
aeruginosa com alta densidade celular
Figura 42 – <i>Heatmap</i> representando a regulação metabólica de <i>P. aeruginosa</i> após o
tratamento por 1 h em concentrações bactericidas dos compostos derivados da fenadiona,
Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fenadiona (Cu-fen). 122
Figura 43 – Comparação dos metabólitos e vias metabólicas alteradas por Ag-fendiona e
Cu-fendiona em <i>P. aeruginosa</i>
Figura 44 – Alterações do ciclo de ácidos tricarboxílicos induzidos por compostos derivados
da fendiona em <i>P. aeruginosa</i>
Figura 45 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade de enzimas
relacionados ao TCA
Figura 46 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na cadeia transportadora de
elétrons de <i>P. aeruginosa.</i> 127
Figura 47 – Alterações da via da pentose fosfato induzidos por compostos derivados da
fendiona
Figura 48 – Alterações na via de biossíntese de folato induzidos por compostos derivados
da fendiona em <i>P. aeruginosa</i>

Figura 49 – Esquema ilustrando a via de biossíntese de folato.	131
Figura 50 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na proporção NADP ⁺ /NADPI	I em
P. aeruginosa.	132
Figura 51- Alterações na via do metabolismo relacionado à glutationa induzida por	
compostos derivados da fendiona em <i>P. aeruginosa</i>	133
Figura 52 – Esquema ilustrando a via de biossíntese de glutationa	134
Figura 53 – Efeitos da combinação de compostos derivados da fendiona e antioxidante	s no
metabolismo de <i>P. aeruginosa.</i>	136

LISTA DE ABREVIAÇÕES

4-HNE	– 4-Hidroxi-2(E)-nonenal
8-oxo-G	– 8-Oxoguanina
ABS	– Absorbância
AEM	 Agência Europeia de Medicamentos
[Ag(fendiona) ₂]ClO ₄	– Ag-Fendiona (ou Ag-fen)
ANOVA	– Análise de variância
BHL	– N-Butirilhomoserina lactona
BSA	 Albumina de soro bovino
CAZ	– Ceftazidima
CCBS	 Centro Ciências Biológicas e da Saúde
CEPCD	- Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
CLSI	- Instituto de Padronização Clinica e Laboratorial (do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CMB	– Concentração mínima bactericida
CMI	 Concentração mínima inibitória
[Cu(fendiona) ₃](ClO ₄) ₂ .4H ₂ C	D – Cu-fendiona (Cu-fen)
DARMD	 Droga antirreumática modificadora da doença
DCFHDA	 Diclorofluoresceína diacetato
DCIP	 – 2,6-Dicloroindofenol sódico salitrato de sódio
$DiOC_2(3)$	 Iodeto de 3,3-dietiloxacarbocianina
DMEM	 Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DPTA	 Ácido dietileno triamina penta-acético
EARS-net	- Rede Européia de Viligancia de Resistencia Antimicrobiana (do inglês, <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>)
EDTA	 Ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	 Ácido diamino glicol eter tetraacético
ENA-78	- Proteína epitelial ativador de neutrófilos-78 (do inglês, <i>epithelial neutrophil activating protein-78</i>)
EROs	– Espécies reativas de oxigênio

EUA	– Estados Unidos da América
FC	- Taxa de alteração (do inglês, Fold-change)
FCCP	– Carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FDA	 Agência americana de administração de fármacos e alimentos (do inglês, American Food and Drug Administration)
FIC	 – Índice de concentração inibitória fracionada
FMN	 Mononucleótideo de flavina
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosafato desidrogenase
GHS	– Glutationa reduzida
GSSG	– Glutationa oxidada
HAART	– Terapia antirretroviral altamente ativa (do inglês, <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HCV	– Vírus da hepatite C
HIV	 Vírus da imunodeficiência humana
H_2O_2	– Peróxido de hidrogênio
HNC	– Hidroxínitrocumarina
HPI	– N-(1-carboxi-3-fenilpropil)-fenilalanil-alfa-asparagina
HSV-1	– Herpes simplex vírus
IDSA	- Sociedade de Doenças Infecciosas da América (do inglês, Infectious Diseases Society of America)
IFN-γ	– Interferon-gama
Ig	– Imunoglobulina
IL	– Interleucina
IMP	– Imipenem
INICC	- Consórcio internacional de controle de infecção nosocomial (do inglês, <i>International Nosocomial Infection Control Consortium</i>)
IQS	- 2-(2-Hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído
LasB	– Elastase B
LB	– Luria-Bertani
LC	– Cromatografia líquida
LPS	– Lipopolissacarídeo
LTBM	- Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês <i>monocyte chemotactic protein-1</i>)

MDA	– Malondialdeído
MDR	- Resistência múltipla a drogas (do inglês, multi-drug resistant)
MEC	– Matriz extracelular
MER	– Meropenem
MHA	– Ágar Mueller-Hinton
MHB	– Caldo Mueller-Hinton
MS	– Espectrometria de massas
MTT	– 4,5-Dimetil-2-(tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MVD	– Molegro Virtual Docker
NAC	– N-acetilcisteína
NADH	 Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
ONOO-	– Peroxinitrito
O2-•	 Radical superóxido
OH•	 Radical hidroxila
OCDE	 – Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico
OD	– Densidade ótica
OdDHL	– N-(3-Oxododecanoil)-homoserina lactona
OMS	 Organização Mundial da Saúde
ORF	- fases de leitura aberta (do inglês, Open read frame)
PBP	 Proteína ligadora de penincilina (do inglês, <i>penicillin binding proteins</i>)
PCA	– Análise de componentes principais (do inglês, <i>principal component analysis</i>)
PES	- Fenazina etosulfato (do inglês, phenazine ethosulfate)
PGS	– 2-Heptil-3-hidroxi-4-quinolona
PI	 – Iodeto de propídeo
QS	– Quorum sensing
RPM	– Rotação por minuto
RT-PCR	- Reação em cadeia de polimerase em tempo real
SCFM	- Meio sintético de escarro de fibrose cística (do inglês, <i>synthetic cystic fibrosis sputum medium</i>)
SDS	 Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	- Gel de eletroforese de poliacrilamida contendo SDS
SFB	– soro fetal bovino
SMP	– São Paulo metalo- β -lactamase
SOD	 Superóxido dismutase
SP	- Proteína surfactante (do inglês, surfactant protein)
TBA	 Ácido tiobarbitúrico
TBARS	 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBE	– Tris-borato-EDTA
TCA	 Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TNF-α	– Fator de necrose tumoral-alfa
TOF	- Tempo de vôo (do inglês, time of flight)
TSA	 Ágar triptona de soja
TSB	– Caldo triptona de soja
TUNEL	 Marcadoção de fragmentação do DNA via dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (do inglês, <i>Transferase dUTP Nick End Labeling</i>)
UA	– Unidades arbitrárias
UAF	– Unidades arbitrárias de fluorescência
UFC	– Unidade formadora de colônia
UPEC	– Escherichia coli uropatogênicas
UTI	 Unidades de terapia intensiva
UV	– Ultravioleta
WST-1	-2-(4-Iodofenil)-3-(4 nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio)

	SUMARIO	
1- INT	RODUÇÃO	
1.1-	Resistência a antimicrobianos	
1.2-	Pseudomonas aeruginosa	

SUMÁRIO

	1.1-	Resistência a antimicrobianos	23
	1.2-	Pseudomonas aeruginosa	26
	1.3-	Mecanismos de patogenicidade	28
	1.4-	Elastase B (LasB)	30
	1.5-	Antibioticoterapia clássica contra P. aeruginosa	34
	1.6-	Novas abordagens terapêuticas	36
	1.7-	Terapia anti-virulência	37
	1.8-	Inibidores de LasB: potencial compostos com ação anti-virulência	38
	1.9 - 1.9.1	Novos compostos com ação bactericida - Compostos de coordenação: ação antimicrobiana	40 41
	1.9.2	- Novos compostos derivados da 1,10-fenantrolina com ação anti-bacteriana	45
	1.10-	Mecanismos de ação propostos para compostos de coordenação derivados da 1,10-	
	fenantr	olina	47
	1.10.	1- Estresse Oxidativo	4/ 50
	1.10.	2- Danos a membrana bacteriana	50
2-			54
2	081		
3-		•	
	3.1- Ob		55
	3.2- Ob	jetivos específicos	55
4-	• MET	ODOLOGIA	56
	4.1- Mi	crorganismos	56
	4.2- Cu	ltivo dos microrganismos	56
	4.3- Co	mpostos de coordenação	57
	4.4- An	álise <i>in silico</i> das interações moleculares dos derivados da fendiona e o sítio ativo de Las	B
	•••••		57
	4.5- Ob 4.5.1 4.5.2	otenção dos sobrenadantes de cultivo bacteriano - Crescimento planctônico - Crescimento em biofilme	59 59 59
	4.5.3	-Dosagem de proteina	59
	4.6- Do	sagem de atividade elastinolítica	60
	4.7- Ziı	nografia	60
	4.8- Im	unodetecção de LasB	60
	4.9- Ex	pressão do gene <i>lasB</i> por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)	62

	4.10 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB em células epiteliais pulmonares (A549)	3
	4.11- Efeitos de compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB contra larvas de <i>Galleria mellonella</i>	4
	4.12- Cálculo da CIM	5
	4.13- Curva tempo-morte	5
	4.14- Efeitos das combinações de compostos derivados da fendiona com antimicrobianos clássico sobre a viabilidade bacteriana	6
	4.15- Efeitos de antioxidante na tolerância bacteriana aos compostos derivados da fendiona 6	7
	4.16- Efeitos de compostos derivados da fendiona sobre a produção de EROs6	7
	4.17- Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade de enzimas antioxidantes de P. aeruginosa	8 8 8 9
	4.18 – Aconitase	9
	4.19- Perfil de fragmentação do DNA em gel de agorose70	0
	4.20- Análise de fragmentação do DNA por TUNEL ("Transferase dUTP Nick End Labeling") 7	1
	4.21 – Peroxidação lipídica	1
	4.22- Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a ultraestrutura bacteriana72	2
	4.23 - Desestabilização da membrana externa	3
	4.24 - Integridade da membrana plasmática bacteriana73	3
	4.25 - Polarização de membrana plasmática bacteriana7	3
	4.26 – Análise do perfil metabólico74	4
	4.27 – Detecção da atividade de isocitrato desigrogenase	5
	4.28- Detecção da atividade de malato desidrogenase70	6
	4.29 – Detecção da atividade de NADH:ubiquinona oxiredutase7	7
	4.30- Avaliação da proporção NAD ⁺ /NADH	7
	4.31- Análises estatísticas	8
5-	- RESULTADOS	9
	5.1- Análise <i>in silico</i> da interação entre compostos derivados da fendiona e o sítio ativo da enzina LasB	a 9
	5.2- Efeitos dos compostos à base de fendiona na atividade <i>in vitro</i> de LasB88	2
	5.3- Efeitos dos compostos derivados de fendiona na expressão do gene <i>lasB</i> e na produção/secreção da enzima LasB	4
	5.4- Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a indução de danos celulares (células epiteliais pulmonares A549) causados por LasB	5

ŧ	5.5- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB em larvas de <i>G. mellonella</i>
4	5.5- Avaliação do efeito antimicrobiano em diferentes meios de cultivo
5	5.6- Avaliação dos efeitos antimicrobianos em diferentes cepas clínicas
5	5.7- Curva tempo-morte dos compostos derivados de fendiona em <i>P. aeruginosa</i> 92
5	5.8 – Efeitos da combinação de compostos derivados da fendiona e ceftazidima sobre o crescimento planctônico de <i>P. aeruginosa</i>
5	5.9 – Efeitos de antioxidante na tolerância bacteriana aos compostos derivados da fendiona 99
5	5.9- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na geração de EROS em <i>P. aeruginosa</i> 101
5	5.10- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na atividade de enzimas antioxidantes 104 5.10.1- Catalase
5	5.10.2- SOD
4	5.11- Danos oxidativos induzidos por compostos derivados da fendiona em <i>P. aeruginosa</i> 108 5.11.1- Atividade aconitase
5	5.12- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na ultraestrutura bacteriana
5	5.13- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na estabilidade de membrana externa 117
Ę	5.14- Efeitos de compostos derivados da fendiona na estabilidade de membrana plasmática 117
5	5.15- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na polarização de membrana plasmática 119
4	5.16- Alterações no perfil metabólico induzidos por derivados da fendiona
5	5.13- Efeitos da combinação de compostos derivados da fendiona e antioxidantes no metabolismo le <i>P. aeruginosa</i>
6-	DISCUSSÃO
7-	CONCLUSÕES
8-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
<u>9</u> -	ANEXOS

1- INTRODUÇÃO

1.1- Resistência a antimicrobianos

A introdução de antimicrobianos na prática médica revolucionou a medicina moderna, reduzindo drasticamente a mortalidade infantil e aumentando a expectativa de vida da população mundial. Além disso, a utilização de antimicrobianos possibilita o sucesso de cirurgias invasivas e é crucial para o sucesso de quimioterapias imunossupressoras, como as empregadas nos transplantes de órgãos (HAMPTOM, 2013; BLAIR et al., 2015). Assim, para atender o uso de antibióticos na medicina humana e como aditivos nas rações utilizados na agroindústria, milhões de toneladas de antibióticos são produzidos anualmente (THANNER et al., 2016). Entretanto, nas últimas décadas, a eficácia da terapia antimicrobiana foi comprometida pela rápida emergência de cepas multirresistentes a drogas (MDR) (BROWN & WRIGHT, 2016). A disseminação de cepas resistentes a agentes antimicrobianos é um fenômeno natural, que se desenvolve como consequência da pressão seletiva exercida por estes compostos químicos (BROWN & WRIGHT, 2016). A prescrição indiscriminada de antimicrobianos na prática médica acelerou à emergência de cepas MDR (BASSETTI et al., 2015). Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que pelo menos 30% das prescrições de antimicrobianos foram desnecessárias ou inapropriadas (FLEMING-DUTRA et al., 2016). Além disso, os agentes antimicrobianos frequentemente utilizados para o tratamento e prevenção de doenças no setor agropecuário também são associados à rápida propagação de microrganismos resistentes com impacto na saúde humana (THANNER et al., 2016).

Em termos econômicos, a resistência a múltiplos antimicrobianos resulta em altos gastos aos sistemas de saúde (públicos e privados) em todo o mundo (HOFER *et al.*, 2018). Atualmente, cerca de 50.000 mortes por ano nos EUA e na Europa se devem às infecções microbianas resistentes a pelo menos um antimicrobiano (TACCONELLI *et al.*, 2018). Porém, de acordo com a previsão publicada pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), cerca de 2,4 milhões de pessoas na Europa, América do Norte e Austrália serão acometidas por infecções fatais nos próximos 30 anos e, consequentemente, os cuidados relacionados à saúde podem chegar a até US\$ 3,5 bilhões de dólares por ano (**Figura 1**). De acordo com a OCDE, os países de baixa e média renda apresentaram as maiores taxas de prevalência de microrganismos resistentes. Nesse sentido, estima-se que o número de infecções causadas por

microrganismos resistentes será 4 a 7 vezes maior em países como Brasil, Indonésia e Rússia quando comparados aos países de alta renda que são participantes da OCDE (OCDE, 2018).



Figura 1 – Tendência nas taxas de prevalência média de microrganismos resistentes a antimicrobianos entre os anos de 2005 e 2030. O relatório da OCDE reportou o aumento nas taxas de infecções causadas por bactérias multirresistentes nos 52 países participantes desta organização mundial (Adaptado de OCDE, 2018).

Neste cenário, destacam-se as infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, devido ao seu tratamento clínico especialmente desafiador devido à alta prevalência global de cepas MDR (**Figura 2**) (SONMEZER *et al.*, 2016). Durante a década de 1960, *P. aeruginosa* emergiu como um dos principais patógenos causadores de bacteremia, em que a taxa de mortalidade atingia níveis de 90% (TAPPER *et al.*, 1974). Após a introdução de antimicrobianos anti-pseudomônicos na prática médica, a taxa de mortalidade de infeções causadas por *P. aeruginosa* diminuiu para 20-25% entre os anos de 1980-1990 (TODESCHINI *et al.*, 1999; CHATZINIKOLAOU *et al.*, 2000). No entanto, a emergência de cepas resistentes, levou ao aumento contínuo da mortalidade relacionada às infecções causadas por *P. aeruginosa*, variando atualmente entre 20 e 70% (VITKAUSKIENE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).



Figura 2 – Distribuição geográfica da prevalência de cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos entre os anos de 2009 e 2011 (HONG *et al.*, 2015).

O caráter MDR observado em *P. aeruginosa* se deve, pelo menos em parte, a mecanismos intrínsecos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, incluindo: tetraciclinas, macrolídeos, trimetoxazol (trimetropina/sulfametoxazol) e fluoroquinolonas (DISCROLL *et al.*, 2007; GELLATLY & HANCOCK, 2013). Além disso, a exposição contínua aos antimicrobianos clássicos exerce pressão seletiva na população bacteriana, favorecendo à seleção de cepas mais resistentes, que adquirem mecanismos adaptativos de resistência (STRATEVA & YORDANOV, 2009; BREIDENSTEIN *et al.*, 2011; GELLATLY & HANCOCK, 2013). A transferência de mecanismos de resistência adaptativos se dá através do compartilhamento de material genético bacteriano, incluindo plasmídeos, transposons, integrons, profagos e ilhas de resistência, por meio de conjugação, transformação ou transdução, facilitando à incorporação de múltiplos genes de resistência ao genoma e/ou plasmídeos de outras células bacterianas (GELLATLY & HANCOCK, 2013).

De acordo com o estudo epidemiológico da proporção de cepas resistentes conduzido pelo *International Nosocomial Infection Control Consortium* (INICC), no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2015, em 422 unidades de tratamento intensivo de 36 países da América Latina, Ásia, África e Europa, revelou que 29,9% e 44,3% das cepas de *P. aeruginosa* foram resistentes à amicacina e imipenem, respectivamente (ROSENTHAL *et al.*, 2016). Em outro trabalho, a taxa de resistência aos antimicrobianos clássicos foi analisada em 115 amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em hospitais canadenses (entre janeiro de 2002 e dezembro 2010), das quais 21,1% e 4,2% das amostras foram resistentes à ceftazidima e a imipenem, respectivamente (WONG *et al.*, 2014). A Rede Europeia de Vigilância antimicrobiana relatou que 20% das cepas clínicas isoladas no ano de 2015 foram resistentes à piperaciclina/tazobactam, carbapenemas e fluoroquinilonas (EARS-Net, 2017). Nos EUA, *P. aeruginosa* é o principal agente de infecções hospitalares, dentre as quais 24,8% das amostras clínicas isoladas, entre 2012 e 2015, apresentaram resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos, caracterizando o fenótipo MDR (SADER *et al.*, 2017). Nosso grupo de pesquisa avaliou o perfil de resistência de 96 amostras clínicas foram resistentes à ceftadizima, enquanto 37,5% apresentaram que 33,3% das cepas clínicas foram resistentes à ceftadizima, enquanto 37,5% apresentaram-se resistentes ao imipenem (SILVA *et al.*, 2014).

1.2- Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é um microrganismo Gram-negativo, não fermentador da glucose, móvel em meio sólido pela presença de um flagelo polar (GELLATLY & HANCOCK, 2013) (**Figura 3**). Adicionalmente, este microrganismo conta com uma sofisticada maquinaria metabólica, que permite que esta bactéria seja capaz de crescer em inúmeras fontes de carbono e nitrogênio (DISCROLL *et al.*, 2007). Dada a sua grande adaptabilidade a diferentes fontes nutricionais, esta bactéria é capaz de prosperar em diferentes nichos ambientais, incluindo solo, rizosfera vegetal e filosfera, bem como nos tecidos de hospedeiros, que apresentam características físico-químicas distintas (DRISCOLL *et al.*, 2000; LA ROSA *et al.*, 2018). A versatilidade metabólica de *P. aeruginosa* se deve à plasticidade de seu genoma. STOVER e colaboradores (2000) sequenciaram o genoma de *P. aeruginosa* (cepa de referência denominada PAO1) e verificaram a presença de 6,3 milhões de pares de base. Além disso, *P. aeruginosa* possui um sofisticado sistema regulador de expressão gênica (aproximadamente 8,4% dos genes estão envolvidos em processos regulatórios) (STOVER *et al.*, 2000).



Figura 3 – *Pseudomonas aeruginosa*. (A) Características morfotintoriais após coloração pelo método de Gram, evidenciando-se bacilos Gram-negativos (MANDIGAN *et al.*, 2010); (B) Ultraestrutura de células de *P. aeruginosa* através de microscopia eletrônica de transmissão, destacando-se a presença do flagelo polar, que confere motilidade a esta bactéria (GARETT *et al.*, 1999); (C) Crescimento bacteriano em ágar cetrimide, evidenciando-se a produção de pigmento esverdeado característico, denominado de piocianina, um conhecido fator de virulência deste patógeno (GALDINO *et al.*, 2016).

P. aeruginosa é considerado um dos principais patógenos oportunistas humanos, causador de infeccões comunitárias e hospitalares, que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com neutropenia, queimadura, câncer, diabetes mellitus, doença pulmonar crônica obstrutiva e fibrose cística (CEZÁRIO et al., 2009; PRASAD et al., 2009; BALASUBRAMANIAN et al., 2013). Além disso, a habilidade deste patógeno em colonizar e sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos, permite que equipamentos respiratórios, dispositivos médicos, desinfetantes, esfregões, comida e antissépticos constituam os principais reservatórios deste microrganismo, sobretudo no ambiente hospitalar (GELLATLY & HANCOCK, 2013). De acordo com a Agência Nacional de Saúde (ANVISA), P. aeruginosa foi o terceiro patógeno mais prevalente em infecções nosocomiais em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (ANVISA, 2016). Já nos EUA, P. aeruginosa foi o bacilo Gram-negativo não fermentador da glucose mais prevalente em infecções nosocomiais, sendo observado em 16% dos casos de pneumonia associadas à ventilação mecânica, 11% das infecções do trato urinário associados ao uso de dispositivos médicos, 8% das infecções pós-cirúrgicas e 6% de infecções sanguíneas disseminadas (LISTER et al., 2009; DUSZYŃSKA et al., 2015; FLORES-MIRELES et al., 2015).

As principais manifestações clínicas nosocomiais causadas por este microrganismo incluem: infecções de sistema respiratório (pneumonias), trato urinário, pele, articulações e ossos, feridas, queimaduras e infecções disseminadas (GELLATLY & HANCOCK, 2013; TASHIRO *et*

al., 2013). Apesar de ser um patógeno primariamente nosocomial, *P. aeruginosa* também pode estar relacionado às infecções comunitárias, dentre as quais se destacam: infecções oculares, sobretudo ceratites associadas ao uso de lentes de contato, otites externas, infecções de pele e tecidos moles bem como feridas de pacientes diabéticos (GELLATLY & HANCOCK, 2013; TASHIRO *et al.*, 2013).

1.3- Mecanismos de patogenicidade

A patogenicidade de P. aeruginosa está relacionada à combinação de diversos fatores que incluem: plasticidade genômica e, consequente, versatilidade metabólica; resistência múltipla aos antimicrobianos e a habilidade de produzir uma enrome variedade de atributos de virulência (BALASUBRAMANIAN et al., 2013) (Figura 4). Os fatores de virulência desempenham papéis cruciais na colonização, invasão de tecidos, sobrevivência intracelular e disseminação bacteriana. P. aeruginosa possui diversas classes de adesinas, incluindo pili e flagelo, responsáveis pela aderência desse microrganismo a receptores de superfície presentes nas células do hospedeiro. Esta adesão inicial resulta na modulação da produção dos fatores de virulência, de modo que enzimas bacterianas imunoprotetoras passam a ser produzidas abundantemente, por exemplo: (1) elastase e peptidase alcalina, que protegem a bactéria da atuação do sistema imune, clivando imunoglobulinas (Ig) A e IgG, componentes do sistema complemento, citocinas, fibronectina, fribina, elastina e inativando interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α); (2) leucocidinas, que afetam neutrófilos; (3) duas hemolisinas termolábeis - a fosfolipase C e a lecitinase, que sinergicamente agem hidrolisando lipídeos e lecitinas; (4) exotoxina A, que é capaz de inibir a fagocitose e suprimir a resposta imune celular, bem como inibir a biossíntese de proteínas, causar a morte celular e necrose do tecido; e (5) exoenzima S, que é responsável pela degradação de proteínas de citoesqueleto, pela clivagem de IgG e IgA e pela resistência aos mecanismos de killing de macrófagos; (6) exoenzima U, uma citotoxina que exibe potente atividade pró-inflamatória devido ao acentuado recrutamento de neutrófilos nos tecidos infectados, ativando NF-kB e estimulando à expressão e secreção de interleucina (IL)-8 durante a infecção por P. aeruginosa (WINSTANLEY & FOTHERGILL, 2009; LIMA et al., 2012). Desta maneira, a produção de fatores de virulência torna as infecções causadas por P. aeruginosa altamente invasivas e toxigênicas (NEWMAN et al., 2017).



Figura 4 – Fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa.* Esta bactéria produz um arsenal de fatores de virulência, dos quais destacam-se: (i) lipopolissacarídeo (LPS), que induz a produção de citocinas; (ii) pili, que ajudam a adesão bacteriana às células epiteliais respiratórias; (iii) flagelo, que participa de eventos de mobilidade, adesão e internalização; (iv) moléculas liberadas extracelularmente como peptidases (responsáveis pela clivagem de proteínas hospedeiras chave), exotoxina A (inibição da síntese de proteínas hospedeiras), exoenzima S (induz efeito citotóxico), exoenzima U (efeito antifagocítico), fosfolipase C (clivagem de fosfolipídios de membrana), pigmentos (muitos efeitos biológicos, como a piocianina que induz radicais livres nas células hospedeiras), ramnolipídios (ação detergente), lectinas solúveis (inibição do batimento de células pulmonares) e alginato (inibição da fagocitose, ação antifúngica e respostas imunes do hospedeiro) (Adaptado de GALDINO *et al.*, 2017).

SMITH e colaboradores (2006) realizaram uma análise comparativa da expressão gênica relacionada à virulência em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de infecções pulmonares agudas e crônicas. Os autores relataram que as amostras clínicas de infecções agudas expressaram uma ampla gama de genes de virulência; enquanto, os isolados de infecção crônica modularam negativamente a expressão de genes relacionados à mobilidade bacteriana, bem como à biossíntese

de pigmentos bacterianos e o sistema de secreção do tipo III. Além disso, isolados de infecções crônicas apresentam maior produção de alginato e outros exopolissacarídeos, sendo capazes de formar biofilmes mais espessos e, consequentemente, mais resistente a drogas antimicrobianas e às respostas imunológicas do hospedeiro (HOGARDT *et al.*, 2010; AL-WRAFY *et al.*, 2017). Além disto, também foi observada a redução na atividade enzimática de peptidases secretadas em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de infecções crônicas (SMITH *et al.*, 2006).

Dentre os fatores de virulência, as enzimas hidrolíticas desempenham papel central na destruição das barreiras físicas, além de promover a resistência aos componentes imunológicos celulares (fagocitose) e humorais (sistema complemento, anticorpos e peptídeos antimicrobianos) do hospedeiro (GALDINO *et al.*, 2017). Adicionalmente, as peptidases produzidas por *P. aeruginosa* participam na fisiologia bacteriana atuando nos processos de nutrição e remodelamento celular (GELLATLY *et al.*, 2013; CROUSILLES *et al.*, 2015; GALDINO *et al.*, 2017). Dentre as 5.568 fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open read frame*) presentes no genoma de *P. aeruginosa* (cepa PAO1), 155 (2,8%) ORFs foram preditas como regiões genômicas responsáveis pela síntese de peptidases (STOVER *et al.*, 2000). Além disso, este patógeno possui inúmeros sistemas secretórios capazes de liberar maciçamente grandes quantidades de peptidases (MORADALI *et al.*, 2017).

1.4- Elastase B (LasB)

Em meio ao arsenal de virulência produzido por *P. aeruginosa*, elastase B (também conhecida como LasB ou pseudolisina), devido a sua multifuncionalidade, é uma das principais protagonistas da patogênese deste microrganismo (KESSLER *et al.*, 1998; GALDINO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). LasB é uma metalopeptidase dependente de zinco, pertencente à família das termolisinas peptidases M4 (vide MEROPS database). Estruturalmente, LasB possui 4 domínios conservados: (i) o domínio FTP (região localizada no peptídeo sinal, entre os aminoácidos 56 e 99), descrito como domínio essencial à prevenção da ativação prematura e tem uma atividade semelhante à chaperona (TANG *et al.*, 2003); (ii) domínio PepSY (localizado entre os aminoácidos 122 e 192), responsável pela inibição da ativididade enzimática inicial (YEATS *et al.*, 2004); (iii) o domínio peptidase-M4 (localizado entre os aminoácidos 207 e 492), composto por dois motivos ligados por uma hélice central, que fornece vários resíduos importantes para a catálise, e (iv) os sítios de ligação ao Ca²⁺ e Zn²⁺ que participam, respectivamente, da estabilização

estrutural e da atividade enzimática (**Figura 5**) (RAWLINGS *et al.*, 1995; BANBULA *et al.*, 1998). Além disso, o sítio catalítico de LasB é composto por três regiões principais: (i) o sítio de fenda de zinco (His₁₄₀, His₁₄₄ e Glu₁₆₄), (ii) o centro catalítico (Glu₁₄₁) e (iii) o sítio de ligação ao substrato (Tyr₁₅₅, His₂₂₃ e Asp₂₂₁) (HANGAUER *et al.*, 1984).



Figura 5 – **Sequência de aminoácidos de LasB de** *P. aeruginosa.* Sequência de aminoácidos e representação esquemática da distribuição de domínios na cadeia polipeptídica de LasB produzida por *P. aeruginosa* (PAO1). Os resíduos de peptídeo sinal (verde), FTP (azul), PepSY (laranja) e domínio M4 (amarelo) foram destacados pelas caixas coloridas. Os aminoácidos da sequência polipeptídica madura (que é secretada) estão representadas em negrito (Adaptado de GALDINO *et al., 2019*).

A síntese de LasB é comandada pela expressão do gene *lasB*, que por sua vez é finamente regulada pelos ativadores transcricionais *Las* e *Rhl* (BEVER *et al.*, 1988; HAN *et al.*, 2014). Inicialmente, LasB é sintetizada como uma pré-pró-enzima de 498 aminoácidos (~53 kDa) (BEVER *et al.*, 1988). Durante o processo de maturação, o peptídeo sinal é clivado da pré-proenzima, logo após a translocação pela membrana plasmática (HAN *et al.*, 2014). No periplasma, a pró-enzima (formada pelo pró-peptídeo e proteína madura) é dobrada pela atividade chaperona do domínio FTP e a pró-enzima tem sua estrutura estabilizada pela formação de uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys₂₇₀ e Cys₂₉₇ (RAWLINGS *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2014). Em seguida, o pró-peptídeo é clivado, mas permanece ligada à enzima madura por ligações não covalentes. Neste momento, a segunda ligação dissulfueto é formada entre Cys₃₀ e Cys₅₈ e, finalmente, o complexo pró-peptídeo e enzima é secretado pelo sistema secretor tipo 2 (maquinaria Xcp). No ambiente extracelular, a pró-enzima adquire a sua forma madura e ativa pela dissociação e degradação do pró-peptídeo (RAWLINGS *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2014).

A atividade enzimática de LasB é crucial no processo de invasão tecidual e na colonização dos compartimentos mesenquimais (Figura 6) (GOLOVKINE et al., 2014; NOMURA et al., 2014). LasB cliva a elastina nos domínios hidrofóbicos, seguido da ruptura de fibras de elastina em unidades estruturais monoméricas (YANG et al., 2015). A atividade elastinolítica foi relatada como um importante agente nocivo a células pulmonares infectadas com P. aeruginosa, sendo um dos principais compenentes indutores de perda da função pulmonar (BRUCE et al., 1985; ERICKSON et al., 2002). Detectou-se a presença de elastase no escarro coletado de pacientes portadores de fibrose cística com infecções crônicas e severas por P. aeruginosa (BRUCE et al., 1985). Além disso, a análise histopatológica de pacientes autopsiados revelou a presença de fibras de elastina alteradas nos alvéolos pulmonares, indicando que a ruptura proteolítica do tecido conjuntivo pulmonar é um processo contínuo no pulmão de pacientes portadores de fibrose cística cronicamente infectados por P. aeruginosa (BRUCE et al., 1985). Além de clivar a elastina, LasB é capaz de promover dano tecidual pela degradação de outras proteínas constituintes da matriz extracelular do hospedeiro, como colágeno tipo III e IV, laminina, fibronectina e vitronectina (HECK et al., 1986; ERICKSON et al., 2002; BEAUFORT et al., 2011). LasB também é capaz de desorganizar a membrana basal pela degradação de junções intercelulares, como ocludina, claudina-1, claudina-4 e tricelulina (AZGHANI et al., 2000; BEAUFORT et al., 2013; REBOUD et al., 2016).

LasB também modula as respostas imunológicas do hospedeiro pela degradação de IgA e IgG (POTEMPA et al., 2009; SUAREZ-CUARTIN et al., 2017) (Figura 6). Nesse sentido, fragmentos de IgG degradados pela LasB inibem a fagocitose, uma vez que a interação entre os fragmentos de IgG e os receptores de IgG nos neutrófilos impossibilita a opsonização das células bacterianas (DORING et al., 1984). De maneira similar, observou-se a presença de produtos de degradação da IgA nas lágrimas de pacientes infectados com P. aeruginosa (BAINBRIDGE et al., 1989; HECK et al., 1990). Adicionalmente, essa enzima subverte as defesas do hospedeiro através da inativação de citocinas e quimiocinas, como TNF- α , IFN- γ e IL-2, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1, do inglês monocyte chemotactic protein-1) e proteína epitelial ativador de neutrófilos-78 (ENA-78, do inglês epithelial neutrophil activating protein-78) (BAINBRIDGE et al., 1989; HECK et al., 1990). Em consonância com esses achados, verificou-se que isolados clínicos recuperados de vias aéreas de pacientes portadores de fibrose cística exibiram mutações no gene *lasR* (um regulador de *quorum sensing*), que resulta na menor produção de LasB, levando à resposta inflamatória exacerbada pela superprodução de IL-6 e IL-8 por células pulmonares epiteliais (LEIDAL et al., 2003; FOLKESSON et al., 2012; LORÈ et al., 2012). Além disso, o clearance bacteriano é modulado negativamente pela degradação dos componentes da via do complemento, incluindo os componentes C1 e C3 ligados às células, bem como pelos componentes C5, C8 e C9 da fase fluida (LAFAYETTE et al., 2015). Ainda, LasB é capaz de degradar proteínas surfactantes (SP-A e SP-D), que são responsáveis pelo reconhecimento e ligação a oligossacarídeos presentes na superfície celular de muitas bactérias, com a finalidade de sinalizar para a eficaz fagocitose por macrófagos do hospedeiro (MARIENCHECK et al., 2003). Anteriormente, foi observado que camundongos knockout SP-D eram mais suscetíveis a ceratites causadas por *P. aeruginosa* (MARIENCHECK *et al.*, 2003; HEIMER *et al.*, 2013). Outro substrato degradado pela LasB é o peptídeo antimicrobiano LL-37 (SCHIMIDTCHEN et al., 2002; McCORMICK et al., 2007). A clivagem do LL-37 parece ser crucial durante infeccões causadas por *P. aeruginosa* em úlceras crônicas. Anteriormente foi relatado que os produtos de degradação de LL-37 foram detectados em fluídos de úlcera de pacientes infectados cronicamente por P. aeruginosa (SCHIMIDTCHEN et al., 2002; McCORMICK et al., 2007; STREMPEL et al., 2015).

Dado o protagonismo de LasB na patogênese de *P. aeruginosa*, a deleção do gene *lasB* resultou em uma infecção menos invasiva de células epiteliais da córnea de coelho (COWELL *et al.*,2003). De maneira similar, ensaios *in vivo* mostraram que as infecções em camundongos e

Caenorhabditis elegans por cepas de *P. aeruginosa* $\Delta lasB$ foram menos severas do que as infecções causadas por cepas de tipo selvagem (TANG *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 1999).



Figura 6 – Participação da LasB em múltiplos processos fisiopatológicos de *P. aeruginosa.* LasB é uma metalopeptidase multivalente que participa de: (i) eventos fisiológicos pseudomonais, em especial, nutrição bacteriana; (ii) lesão tecidual pela degradação de proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (por exemplo, elastina, colágeno tipo III e IV, fibronectina, fibrina) e destruição da junção epitelial e (iii) ruptura do sistema imunológico inato e adaptativo, através da inativação de componentes do sistema imune (adaptado de GALDINO *et al.,* 2019).

1.5- Antibioticoterapia clássica contra P. aeruginosa

O tratamento ideal de infecções bacterianas pressupõe o conhecimento do perfil de susceptibilidade às diferentes classes de antimicrobianos bem como suas características genéticas (HIRAKAWA *et al.* 2010, BASSETTI *et al.*, 2018). Os principais β -lactâmicos utilizados nos regimes de tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem: monobactana, ceftazdima, cefepima, imipenem, meropenem e doripenem, e os antibióticos combinados com inibidores de β -lactamase (piperacilina/tazobactam, ceftazidima/avibactam,

ceftolozana/tazobactam) (WRIGHT *et al.*, 2017; BASSETTI *et al.*, 2018). Os antimicrobianos β lactâmicos têm a sua ação na fase final da biossíntese do peptidoglicano, inibindo irreversivelmente as enzimas D-D-carboxitranspeptidase e glicosiltransferase, também conhecidas como proteínas ligadoras de penincilina (PBPs, do inglês *penicillin binding proteins*) (KONG *et al.*, 2010; BASSETTI *et al.*, 2018). Além disto, o complexo β -lactâmicos-PBP induz à produção de autolisinas bacterianas, que degradam a parede celular, fragilizando-a ainda mais (MADIGAN *et al.*, 2010; PHILIPPE *et al.*, 2014).

Os aminoglicosídeos representam outra classe de antimicrobianos ainda eficiente no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Os aminoglicosídeos de primeira escolha são gentamicina e tobramicina. Esta classe de antibiótico é capaz de estabelecer ligações químicas (pontes de hidrogênio e de ligações iônicas) com rRNA 16S da subunidade 30S do ribossoma. Embora a interação aminoglicosídeo-ribossoma não impeça à formação do complexo de iniciação da síntese proteica, esta ligação promove alterações estéricas no sítio de síntese proteica, que resultam na leitura incorreta na sequência de códons e culminam na síntese de proteínas aberrantes (WRIGHT *et al.,* 2017; BASSETTI *et al.,* 2018).

Além de β -lactâmicos e aminoglicosídeos, as polimixinas são opções de compostos antipseudomônicos. As polimixinas são antibióticos polipeptídicos cíclicos, descobertos em 1947, isolados da bacteria *Bacillus polymyxa* (FALAGAS *et al.*, 2005). A polimixina B foi lançado no mercado em meados da década de 1950, porém seu uso foi banido logo em seguida devido à sua elevada toxidez renal. No entanto, devido à ineficiência dos antimicrobianos carbapenêmicos, o uso das polimixinas isoladas ou em combinação tem crescido no tratamento de infecções nosocomiais severas (FALAGAS *et al.*, 2005; PETROSILLO *et al.*, 2008; VAARA, 2018; MELETIS *et al.* 2018). As polimixinas são moléculas anfipáticas, que atuam primariamente interagindo com as membranas externa e citoplasmática. O grupamento diaminobutírato da polimixina forma interações eletrostáticas com os grupamentos fosfato do lipídio A, constituinte do lipopolissacarídeo (LPS), principal componente do folheto externo da membrana externa de bactérias Gram-negativas. A interação com a polimixina promove a remoção dos íons cálcio e magnésio dos lipídios de membrana, aumentando a permeabilidade dos envoltórios celulares, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e culminando com a morte da bactéria (POIREL *et al.*, 2017). Atualmente, existem cinco compostos classificados como polimixinas (polimixinas, A, B, C, D e E), porém apenas dois deles, polimixina B e E (colistina), são utilizados clinicamente (VELKOV *et al.*, 2013).

1.6- Novas abordagens terapêuticas

Conforme abordado anteriormente, devido a rápida emergência de cepas MDR, o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* representa um grande desavio para os gestores de saúde pública em todo o mundo (**Figura 1**) (VITKAUSKIENE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2016). Apesar deste quadro preocupante, nas ultimas décadas, tem sido observado o notável declínio no desenvolvimento e produção de novas moléculas com ação antimicrobiana (BASSETTI *et al.*, 2013). Nesse sentido, desde o inicio dos anos 2000, apenas três novas classes de antimicrobianos foram introduzidas no mercado para uso humano (BASSETTI *et al.*, 2017; TIMSIT *et al.*, 2019) (**Figura 7**). Isto se deve, em parte, porque novos compostos candidatos a antimicrobianos derivados estruturalmente de fármacos já estabelecidos têm maiores chances de sucesso no processo de aprovação para o uso clínico (SILVER, 2011), a saber: (i) requer menor aporte financeiro; (ii) requer ensaios pré-clínicos e clínicos de comprovação da eficácia menos rigorosos; (iii) efeitos colaterais já descritos; (iv) mecanismos de ação conhecidos e (v) adequação aos normas regulatórias para a aprovação (ANDES *et al.*, 2004; CASSIR *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2017).



Figura 7 – Número de novos antimicrobianos aprovados para o uso clínico nos últimos anos. A figura evidencia a deficiência de novas classes de antibióticos aprovados para o uso clínico (adaptada de BASSETTI *et al.*, 2013).
Além do déficit na inovação de moléculas antibióticas, o desenvolvimento de novos antimicrobianos não é mais considerado um investimento economicamente rentável para a indústria farmacêutica (BARLLETT *et al.*, 2013; BASSETTI *et al.*, 2017, TIMSIT *et al.*, 2019). No geral, o uso de antimicrobiano por um indivíduo é realizado por um período curto de tempo. Por este motivo, esta classe de fármaco não é tão lucrativa quando comparados a medicamentos prescritos para doenças crônicas, como cardiovasculares, diabetes, pressão arterial, distúrbios psiquiátricos, asma ou refluxo gastresofágico (PIDDOCK *et al.*, 2012; ASLAM *et al.*, 2018). De acordo com o estudo realizado pela *Office of Health Economics*, o lucro da indústria farmacêutica obtivo a partir do desenvolvimento de um novo antimicrobiano é de US\$ 50 milhões de dólares, ao passo que o lucro obtido de um novo medicamento para o tratamento de doenças neuromusculares pode ultrapassar a marca de US\$ 1 bilhão de dólares (BARLLETT *et al.*, 2013; BASSETTI *et al.*, 2017; ASLAM *et al.*, 2018).

Posto o cenário alarmante do esgotamento do repertório farmacêutico para o tratamento de infecções multirresistentes e o desinteresse da indústria farmacêutica na pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, nos últimos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem ressaltado a resistência antimicrobiana como uma das três maiores ameaças à saúde humana (OMS, 2018). Relatórios publicados pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) (BOUCHER *et al.*, 2017; DRUSANO, 2017) e pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças e da Agência Européia de Medicamentos (CEPCD/AEM) (CEPCDM/AEM, 2009, BOUCHER *et al.*, 2017; DRUSANO, 2017) relataram que há poucos medicamentos em ensaios clínicos que ofereçam esperanças para o tratamento de infecções causadas pelos patógenos denominados "ESKAPE" (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), que atualmente causam a maioria das infecções hospitalares no mundo (BOUCHER *et al.*, 2017; DRUSANO, 2017). Baseado nisto, a OMS sugeriu que houvesse a priorização de pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas, em especial para *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemas (TACONELLI *et al.*, 2017).

1.7- Terapia anti-virulência

Uma das mais promissoras alternativas, que visa o tratamento de infecções persistentes, é a terapia anti-virulência. Esta abordagem terapêutica visa reduzir a patogênese pela inibição da

expressão ou atividade biológica de fatores de virulência, sem necessariamente afetar o crescimento microbiano (DICKEY *et al.*, 2017). Como os compostos anti-virulência não visam diretamente a interferência na proliferação microbiana, a pressão evolutiva é menor, retardando a seleção de subpopulações resistentes (IMPERI *et al.*, 2019). Ao inibir os mecanismos de virulência bacteriano, os compostos anti-virulência permitem que o sistema imune do hospedeiro impeça a colonização bacteriana inicial, bem como pode abolir uma infecção já estabelecida (CEGELSKI *et al.*, 2008; RASKO & SPERANDIO, 2010). Além disso, os compostos anti-virulência podem ser usados em combinação com agentes antimicrobianos clássicos, que podem agir sinergicamente para controlar infecções refratárias (RASKO & SPERANDIO, 2010). Com base no uso potencial da abordagem anti-virulência no tratamento de cepas resistentes, vários grupos de pesquisa têm dedicado grandes esforços na busca de novos alvos microbianos terapêuticos, bem como novos compostos anti-virulência eficazes, o que reflete o aumento substancial no número de publicações focadas na pesquisa de inibidores de virulência (**Figura 8**).



Figura 8 – **Número crescente de publicações relacionadas à estratégia anti-virulência.** O número de publicações foi sumariado através de uma busca no banco de dados PubMed (www.pubmed.com) em 14 de maio de 2018, utilizando as palavras-chave "anti-virulência". Para esta análise, considerou-se apenas os artigos publicados em inglês contendo a verbete "anti-virulência" no título ou resumo. O gráfico mostra que o número de publicações de anti-virulência está aumentando acentuadamente ao longo do tempo e o gráfico de inserção enfatiza isso, demonstrando que nos últimos 5 anos o número de publicações de anti-virulência aumentou mais de 300% (adaptada de GALDINO *et al., 2019*).

1.8- Inibidores de LasB: potencial compostos com ação anti-virulência

O relevante papel de peptidases microbianas no estabelecimento e manutenção de processos infecciosos, reforça a relevância desta classe enzimática como alvos de drogas anti-

virulência (ZHU *et al.*, 2015; CALVERT *et al.*,2018; GALDINO *et al.*, 2019; FLEITAS *et al.*, 2019). No cenário atual, os inibidores de aspártico e serino peptidases são amplamente utilizados na prática médica para o tratamento de infecções virais, respectivamente, causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite C (QUENN, 2008; CULP *et al.*, 2017). Sem dúvida, a introdução de inibidores de peptidase na terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) resultou no significante aumento de sobrevida e melhor prognóstico de pacientes portadores do HIV (QUENN, 2008; CULP *et al.*, 2017). Portanto, diante dos bons resultados obtidos com o uso de inibidores de peptidases no tratamento de infecções virais, destaca-se esta classe de inibidores como potenciais agentes anti-virulência.

Considerando a ação multifacetada da LasB na patogênese de *P. aeruginosa*, diversos grupos buscam novas drogas que se liguem e inibam a atividade proteolítica associada a esta enzima. A inibição da atividade elastinolítica atenua a virulência de *P. aeruginosa*: (i) reduzindo a invasividade bacteriana através dos tecidos do hospedeiro, (ii) evitando o bloqueio do sistema imune hospedeiro durante infecções crônicas e (iii) bloqueando a via de sinalização para formação inicial de micro-colônias e estruturação do biofilme (CATCHCART *et al.*, 2011; SULEMAN, 2018). Tendo em vista que a LasB pertence à classe das metalopeptidases, agentes quelantes são potentes inibidores desta enzima (KOCABIYIK *et al.*, 1995; CATCHCART *et al.*, 2011). KOCABIYIK e colaboradores (1995) descreveram a importância dos metais divalentes na atividade de LasB produzida por *P. aeruginosa*. Observou-se que a atividade da LasB foi completamente inibida pela adição de agentes quelantes, como EDTA e EGTA (KOCABIYIK *et al.*, 1995). A inibição da LasB por agentes quelantes resulta da remoção de cátions, zinco e cálcio, que são essenciais para estabilização da estrutural dessa enzima bem como para atividade catalítica (SULEMAN *et al.*, 2016).

A estrutura da LasB complexada com o ligante ativo *N*-(1-carboxi-3-fenilpropil)fenilalanil-alfa-asparagina (HPI) (PDB:1U4G) foi usada para investigar possíveis interações entre o sítio catalítico de LasB e a 1,10-fenantrolina (GALDINO *et al.*, 2019). As análises de docking molecular revelaram que a 1,10-fenantrolina não foi capaz de se ancorar de maneira estável ao sítio ativo desta enzima. Esta interação resultou na formação de uma ponte de hidrogênio com uma molécula de água e baixa energia de interação (-26,25 Kcal/mol) (**Figura 9**). Reforçando, assim, que a atividade inibitória da 1,10-fenantrolina se deve ao sequestro de íons metálicos, assim como os demais quelantes bidentados (GALDINO *et al.*, 2019). Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de drogas anti-LasB permanecem uma alternativa de riqueza para combater as crescentes taxas de tratamento de insucessos por antibióticos.



Figura 9 – **Estudos de** *docking* **molecular entre LasB e 1,10-fenantrolina.** Os ensaios *in silico* foram realizados utilizando a estrutura cristalizada da elastase produzida por *P. aeruginosa* depositada no RCB PDB Protein Data Bank (código:1U4G). Observou-se que a 1,10-fenantrolina foi capaz de estabelecer apenas um hidrogênio ligado a uma molécula de água (A), no entanto, apesar da interação fraca entre 1,10-fenantrolina e LasB, observou-se que este composto foi capaz de inibir a atividade elastinolítica (B) (GALDINO *et al.,* 2019).

1.9- Novos compostos com ação bactericida

Conforme abordado anteriormente, o ritmo atual do desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos não é suficiente para acompanhar a rápida dispersão de cepas MDR (ZAMAN *et al.*, 2017). Neste sentido, o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas contra microrganismos Gram-negativo é especialmente desafiador. A complexa composição lipídica das membranas, externa e plasmática, de bactérias Gram-negativas formam uma barreira físicoquímica de maneira a afetar a penetração de drogas (EPAND *et al.*, 2007; SILVER *et al.*, 2011; HAYAKAWA *et al.*, 2019). Além disso, a presença de porinas e bombas de efluxo na membrana externa de bactérias Gram-negativas atuam como mais uma linha de defesa contra a entrada de compostos tóxicos (AMARAL *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2019). Associado aos mecanismos intrínsecos de resistência, a exposição contínua aos antimicrobianos clássicos exerce pressão seletiva na população bacteriana, favorecendo à seleção de cepas mais resistentes, que adquiriram mecanismos adaptativos de resistência (GELLATLY & HANCOCK, 2013; ARIAS-LEÓN *et al.*, 2018). Tendo em vista que a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural e inevitável, a busca ininterrupta por novas moléculas com propriedades antibacterianas se torna uma estratégia atrativa, ampliando o número de possíveis ferramentas disponíveis para o tratamento de infecções multirresistentes (GAJDÁCS, 2019).

1.9.1- Compostos de coordenação: ação antimicrobiana

Compostos de coordenação, por definição, são caracterizados pela formação de ligações coordenadas entre os ligantes doadores de pares eletrônicos e os íons metálicos que atuam como aceptores de elétrons (HOUSE, 2013; ALFARO-FUENTES *et al.*, 2017). Neste contexto, as aplicações terapêuticas de compostos de coordenação têm recebido grande atenção nos últimos anos (MAHAPATRA *et al.*, 2019). Dentre os metalofármacos utilizados com fins terapêuticos, destacam-se: (i) compostos coordenados à cisplatina para o tratamento antineoplásico; (ii) compostos coordenados ao ouro utilizados no tratamento de artrite reumatoide; (iv) metalofármacos de cobalto utilizados no tratamento de infecções virais; (v) metalofármacos à base de antimônio e arsênico utilizados na terapia antiparasitária; (vi) compostos de coordenação no tratamento de infecções virais e bacterianas (**Figura 10**) (KOMEDA, 2012; MJOS & ORVIG, 2013; YASUI & YOSHIKAWA, 2017; ALESSIO *et al.*, 2019; MAHAPATRA *et al.*, 2019).

Aprovado em 1979 pela agência americana de administração de fármacos e alimentos (FDA, do inglês, *American Food and Drug Administration*), a cisplatina é um dos principais fármacos utilizados no esquema de tratamento padrão contra diferentes tipos de câncer, incluindo: carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, carcinoma avançado da bexiga, tumores metastáticos do ovário, tumores metastáticos do testículo (ANVISA, 2016; DABROWAIK *et al.*, 2017). O íon Pt²⁺, localizado no grupamento amino da cisplatina, se liga covalentemente às bases nitrogenadas (guanina e adenina) em sequências dinucleotídicas GG e AG presentes na molécula de DNA (ALESSIO *et al.*, 2019). Por sua vez, os adutos de DNA-cisplatina induzem danos celulares irreparáveis, que culminam na apoptose das células tumorais (RATHINAM *et al.*, 2015). O grande obstáculo no uso da cisplatina está relacionado à sua elevada toxidez, induzindo inúmeros e severos efeitos colaterais. Por este motivo, antitumorais à base de platina de segunda geração foram desenvolvidos e introduzidos na clínica médica. A carboplatina, aprovada pelo FDA em 1989, e a oxaliplatina, aprovada pelo FDA em 2002, apresentam vantagens terapêuticas quando comparadas à cisplatina, pois apresentam efeitos ototóxicos e nefrotóxicos reduzidos (CHAREST *et al.*, 2013). Além disso, outras drogas antineoplásicas à base de platina (nedaplatina, lobaplatina

e heptaplatina) estão atualmente sendo submetidos a ensaios clínicos nos EUA, mas já estão em uso clínico no Japão, China e Coréia do Sul (STATHOPOULOS *et al.*, 2012).



Figura 10- Estrutura básica de compostos de coordenação e principais metalofármacos de uso clínico.

Desde o início da década de 1930, sais de ouro têm sido utilizados para o tratamento de artrite reumatoide (MJOS & ORVIG, 2013; YASUI & YOSHIKAWA, 2017). Em 1985, o FDA aprovou o uso da auranofina (tetraacetil-β-D-tioglicose-ouro(I)-tioetilfosfina), um composto de

coordenação de ouro eficiente no tratamento de artrite reumatoide. A auranofina é classificada como droga antirreumática modificadora da doença (DARMD), retardando a progressão do quadro clínico inflamatório. O mecanismo de ação da auranofina está relacionado à inibição das enzimas NkB quinase e tioredoxina redutase, que levam a uma atenuação da resposta imunológica exacerbada, comumente observada nos quadros de artrite reumatoide (DABROWAIK *et al.,* 2017); além de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), retardando os danos teciduais (cartilagem e ossos) observados nesta patologia (RODER & THOMPSON, 2015; DABROWAIK *et al.,* 2017). Relatou-se que a auranofina é capaz de reduzir os níveis séricos de Cu²⁺, um potente indutor dos quadros mais severos de artrite reumatoide (RAFTER *et al.,* 1990). Além da auranofina, o tetróxido de ósmio foi amplamente utilizado em procedimentos de sinovectomia química para o tratamento da artrite reumatoide nos joelhos. A ação do tetróxido de ósmio como DARMD está relacionado a sua ação oxidante sobre proteínas e nucleotídeos além de mimetizar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), catalisando a decomposição de constituintes do arsenal químico de glóbulos brancos inflamatórios (GOLDSTEIN *et al.,* 2005).

Atualmente não há nenhum metalofármaco aprovado para o tratamento de infecções virais. No composto coordenação de entanto. um de cobalto, doxovir (bis(2 metilimidazol)[(bis(acetilacetona)(etilenodiimino)]-cobalto (III)) está em estágio avançado nos ensaios clínicos de confirmação de sua ação antiviral. O doxovir completou com sucesso a fase II dos ensaios clínicos para o tratamento de Herpes simplex labial (HSV-1) e ensaios clínicos de fase I para o tratamento de duas infecções oculares virais (ceratite oftálmica herpética e conjuntivite adenoviral) (CHANG et al., 2010; ENGLAND et al., 2015). Análises in vitro demonstraram que o doxovir foi capaz de bloquear infecções causados pelo HSV-1 através da inibição da fusão do capsídeo viral com a membrana da célula hospedeira (LOUIE et al., 1998).

Os metalofármacos também são amplamente utilizados no tratamento de infecções parasitárias. Nesse sentido, os antimoniais pentavelentes, pentostan (estibogluconato de sódio coordenado ao íon pentavalente de antimônio-Sb⁵⁺) e glucantime (N-metil-D-glucamina coordenado ao antimônio-Sb⁵⁺) são fármacos de primeira escolha para o tratamento de leishimaniose (FRÉZARD *et al*, 2009; ANVERSA *et al.*, 2018). Os antimoniais pentavalentes se comportam como pró-fármacos, em que o fármaco é administrado na forma Sb⁵⁺, porém, após ser administrado, é convertido a Sb³⁺ em reações de oxirredução com a participação de moléculas redutores como a de glutationa (GSH) e cisteína e cisteinil-glicina (Cys-Gly) produzidas pelos

parasitos (FERREIRA et al., 2003; ANVERSA et al., 2018). Já na sua forma ativa, o Sb³⁺ é capaz de interferir na fisiologia de tripanossomatídeos através da inibição da enzima tripanotiona redutase (FERREIRA et al., 2013). Observou-se que Sb³⁺ interage com os resíduos Cys₅₂, Cys₅₇, Thr₃₃₅ e His₄₆₁ da enzima tripanotiona redutase, resultando na completa inibição desta, que desempenha um papel essencial na homeostase redox de espécies do gênero Leishmania (RIDLEY et al., 2003). Outro potencial alvo para a ação leishmanicida dos antimoniais pentavalentes são as proteínas que possuem domínio de dedo de zinco (zinc finger). DEMICHELI e colaboradores (2013) observaram que o antimônio em sua forma trivalente foi capaz de deslocar os íons de Zn^{2+} , assumindo o lugar deste nos sítios de ligação de zinco. A desnaturação de regiões dedos de zinco torna a proteína disfuncional (DEMICHELI et al., 2013; DABROWAIK et al., 2017). Além dos antimoniais pentavalentes, o uso de compostos de coordenação à base de arsênio foi amplamente utilizado no tratamento parasitoses causadas pelo Trypanosoma brucei (DABROWAIK et al., 2017). Em início da década de 1900, BREINL & TODD reportaram a ação antiparasitária do ácido arsanílico para o tratamento da doença do sono causada pelo T. brucei (BREINL & TODD, 1907). Entretanto, os efeitos tóxicos associados ao ácido arsanílico inviabilizaram seu uso e este medicamento foi retirado do mercado (WHO, 2013). Apesar disso, o melarsoprol (2-(4-amino)-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-il)-fenil-1,2,3-ditiarsolan-4-metanol) continua sendo uma dos principais fármacos de escolha para o tratamento de infecções de T. brucei (WHO, 2013; DABROWAIK et al., 2017).

As propriedades antibacterianas de metais e compostos metálicos são reconhecidas e aplicadas clinicamente desde o século XVII. No passado, o nitrato de prata era usado no tratamento de infecções de úlceras e queimaduras. No final do século XIX, fármacos combinados de arsfenamina com sais de mercúrio ou bismuto (Salvarsan®238) e prata (Silvol®240 Neo) foram utilizados no tratamento da sífilis e neurosíflis (KLASEN *et al.*, 2000; HOBMANN & CROSSMAN, 2015). Após o desenvolvimento da penicilina e dos demais agentes antimicrobianos, o uso de compostos metálicos no tratamento de infecções bacterianas caiu em desuso, devido ao seu perfil de toxidez celular em sistemas hospedeiros e seu mecanismo de ação pouco descrito (HOBMANN & CROSSMAN, 2015). No entanto, a demanda por novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas persistentes, fez com que compostos de coordenação a metais de transição ganhassem destaque como uma possível alternativa terapêutica.

Sabidamente, os metais cumprem funções celulares indispensáveis para a manutenção da homeostase celular, sendo essenciais para a estruturação de membranas celulares, proteínas e DNA, além de serem indispensáveis à atividade de inúmeras enzimas (WALDRON & ROBINSON, 2009; PERNIL et al., 2019). Estima-se que cerca de 50% das proteínas requerem ions metálicos para a sua estabilização estrutural e/ou à atividade catalítica (ANDREINI et al., 2004, PERNIL et al., 2019). Entretanto, o acúmulo de metais essenciais no ambiente intracelular passa a ser tóxico para as células (LEIMERI et al., 2013). Além disso, metais não essenciais como prata (Ag), mercúrio (Hg) e telúrio (Te) - são extremamente venenosos para a maioria das bactérias e têm atividade microbicida em concentrações excepcionalmente baixas (AFESSA et al., 2010; LEIMERI et al., 2013). Com isto em mente, ANACONA e colaboradores (2008) sintetizaram um complexo baseado na cefepima (uma cefalosporina de 4ª geração utilizada no tratamento de P. aeruginosa) coordenado a íons Cu²⁺. Os autores observaram que o composto de coordenação obtido foi mais ativo contra cepas de E. coli, P. aeruginosa e S. aureus que o antimicrobiano cefepima usado isoladamente. Da mesma forma, a associação de nanopartículas de prata ao monobactâmico azatreonam resultou em um efeito sinérgico na inibição do crescimento bacteriano e formação do biofilme (HABASH et al., 2014).

1.9.2- Novos compostos derivados da 1,10-fenantrolina com ação anti-bacteriana

A 1,10-fenantrolina é um molécula aromática *N*,*N*-heterocíclica, quelante de íons metais, que apresenta atividade antimicrobiana contra uma grande diversidade de microrganismos patogênicos (McCANN *et al.*, 2012). Nas últimas décadas, esta molécula tem ganhado destaque no desenvolvimento e síntese de candidatos a metalofármacos, pela sua capacidade de formar complexos estáveis com metais e outros ligantes, permitindo assim, a síntese de inúmeras moléculas bioativas (McCANN *et al.*, 2012, 2013; NEVILLE *et al.*, 2013). Neste contexto, muitos trabalhos relatam as propriedades antimicrobianas de derivados da 1,10-fenantrolina (McCANN *et al.*, 2012; SMOLEŃSKI *et al.*, 2013). Por exemplo, fluoroquinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina e lomofloxacina) coordenadas ao cobre e co-ligadas a 1,10-fenantrolina exibiram maior afinidade à molécula de DNA, melhorando, assim, a atividade bactericida destes compostos contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* resistentes às quinolonas livres de metais (RUÍZ *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2013). SUN e colaboradores (2014) relataram a atividade

antimicrobiana contra E. coli de compostos coordenados a metais da série dos lantanídeos (La^{3+,} Pr^{3+,} Nd^{3+,} Sm^{3+,} Eu^{3+,} Gd^{3+,} Tb^{3+,} Dy³⁺, Ho^{3+,} Tm^{3+,} Yb³⁺ e Lu³⁺) ligados a 1,10-fenantrolina e a cinamato (molécula obtida a partir do óleo de canela). Do mesmo modo, JAMAN e colaboradores (2014) sintetizaram uma série de complexos metálicos de Cu(II), Ni(II), Co(II) e Zn(II) derivados da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-dialdeído, que revelaram um amplo espectro de ação antimicrobiano, sendo ativos contra P. aeruginosa, E. coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus podity, Klebsiella pneumonia, Aspergillus niger, Fusarium solani, Curvularia lunata, Rhizoctonia bataticola e Candida albicans (JAMAN et al., 2014). THATI e colaboradores (2007) sintetizaram e avaliaram os efeitos antimicrobianos de compostos de prata(I) contendo 1,10-fenantrolina e derivados de cumarina como ligantes e co-ligantes, respectivamente. Os autores observaram que o composto $[Ag(phen)_2(hnc)]$ (hnc = hidroxínitrocumarina) foi o mais ativo na inibição do crescimento planctônico de C. albicans, promovendo o bloqueio da função respiratória fúngica na concentração de 4,6 µM. DEVEREUX e colaboradores (2000) relataram o efeito fungicida sobre C. albicans de compostos de coordenação de manganês ligados a 1,10fenantrolina e co-ligados a moléculas de ácido ftálico e isoftálico (DEVEREUX et al., 2000). Compostos derivados da 1,10-fenantrolina coordenados à prata, [Ag₂(3,6,9-tdda)(phen)₄]EtOH (PMCC 75) e [Ag(phen)₃ClO₄] (PMCC 77) apresentaram uma potente atividade antibiótica, inibindo crescimento planctônico de cepas clínicas MDR de P. aeruginosa (CMI_{PMCC 75} = 5,19µM e CMI_{PMCC 77} = 11,01 μ M) (GALDINO, 2015).

Na busca de novos complexos mais efetivos e com menos efeitos colaterais verificou-se que a 1,10-fenantrolina e seus derivados, 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona). [Ag(fendiona)₂]ClO₄ (Ag-fendiona) e [Cu(fendiona)₃](ClO₄)₂.4H₂O (Cu-fendiona), alteraram o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos. Esses compostos foram capazes de matar isolados clínicos de Trichomonas vaginalis resistentes ao metronidazol (RIGO et al., 2018) e exibiram atividade antimicrobiana contra Phialophora verrucosa, Scedosporium apiospermum, C. albicans e Candida haemulonii (GRANATO et al., 2017, McCANN et al., 2012, GANDRA et al., 2017). Além disso, Ag-fendiona e Cu-fendiona foram eficientes na inibição do crescimento planctônico de P. aeruginosa apresentando, respectivamente, concentração mínima inibitória (CMI) de 5,2 e 8,4 µM (VIGANOR et al., 2016). Adicionalmente, os compostos testados modularam negativamente a expressão de diferentes atributos de virulência, a interação entre P.

aeruginosa e células epiteliais pulmonares bem como foram capazes de aumentar a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. aeruginosa* (SILVA, 2014).

Além de seu excelente potencial antimicrobiano e anti-virulência, ensaios de toxidez *in vivo* relataram que os derivados metálicos Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram menor IC₅₀ quando comparado a 1,10-fenantrolina e fendiona. Já nos ensaios *in vivo*, usando-se larvas do inseto *G. mellonella*, 90% das larvas sobreviveram ao tratamento até a concentração de 33,3 mg/kg de fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, ao passo que o tratamento com a mesma concentração de 1,10-fenantrolina foi letal a 100% da população de larvas de *G. mellonella*. Já nos estudos utilizando-se o modelo murino, observou-se 100% de sobrevivência em camundongos suíços tratados com até 150 mg/kg de todos os compostos. Além disto, não foram observadas alterações comportamentais, nem nos níveis de expressão de diferentes enzimas hepáticas (McCANN *et al.*, 2012). Tendo em vista os efeitos deletérios dos compostos de coordenação derivados de fendiona na fisiologia de diversos microrganismos patogênicos, somados ao baixo perfil de toxidez destes compostos a larvas e camundongos, tornam esses compostos potenciais representantes de uma nova classe de agentes antimicrobianos (SANTOS *et al.*, 2012).

1.10- Mecanismos de ação propostos para compostos de coordenação derivados da 1,10fenantrolina

1.10.1-Estresse oxidativo

A formação de EROs é uma consequência natural da respiração aeróbica (IMLAY *et al.*, 1991; DWYER *et al.*, 2015). As EROs são geradas a partir de sucessivas reações de oxirredução que levam à formação de radial superóxido ($O_2^{-\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH[•]) (IMLAY *et al.*, 1991; DWYER *et al.*, 2015).

Em resposta a exacerbação da geração de EROs, o microrganismo lança mão de seu arsenal antioxidante, composto primordialmente por sistemas enzimáticos e pequenas moléculas antioxidantes (HALLIWELL *et al.*, 2000; ZANDALINAS *et al.*, 2018). Dentre os mecanismos antioxidantes, a glutationa (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH), é o agente antioxidante não proteico mais abundante em *P. aeruginosa*, podendo ser encontrada em concentrações intracelulares que variam de 0,1 a 10 mM (MASIP *et al.*, 2006). O grupamento tiol presente na

GSH é responsável por sua atividade biológica, enquanto a ligação gama entre o ácido glutâmico e a cisteína impede sua degradação por enzimas proteolíticas (MASIP *et al.*, 2006; ADEOYE *et al.*, 2018). No citoplasma, o GSH atua, diretamente ou como co-fator do sistema enzimático glutarredoxina, impedindo a oxidação proteica (MASIP *et al.*, 2006; ADEOYE *et al.*, 2018). Os níveis fisiológicos de GSH/GSSG são mantidos pela ação da enzima glutationa redutase. Esta enzima utiliza o potencial redutor de NAD(P)H na reciclagem de glutationa oxidada (GSSG), regenerando, assim, os níveis de glutationa reduzida (MASIP *et al.*, 2006 DENG *et al.*, 2014). Por fim, a enzima glutationa peroxidase atua na remoção de hidroperóxidos inorgânicos e orgânicos, reduzindo-os a H₂O e a álcoois, acoplado com a oxidação de GSH (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; ATICHARTPONGKUL *et al.*, 2018).

A enzima SOD catalisa a dismutação do O_2^{-t} em H_2O_2 e O_2 (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). *P. aeruginosa* possui duas SODs citoplasmáticas, uma dependente de Fe (Fe-SOD) e outra dependente de Mn (Mn-SOD) (GHORBAL *et al.*, 2016). Por sua vez, a enzima catalase atua decompondo H_2O_2 em H_2O e O_2 . *P. aeruginosa* conta com três genes responsáveis pela expressão de catalases monofuncionais, *katA*, *katB* e *katE* (STOVER *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2005). Uma vez que a obtenção de energia em *P. aeruginosa* se dá primordialmente através de processos aeróbios, a expressão basal das enzimas antioxidantes (catalase e SOD) é relativamente alta (LEE *et al.*, 2005). Contudo, o aumento da concentração intracelular de H_2O_2 é detectado pelo sensor OxyR, que orquestra a super-expressão do maquinário antioxidante em *P. aeruginosa* (OCHSNER *et al.*, 2000; LAN *et al.*, 2010; CHUNG *et al.*, 2016). No entanto, quando as defesas antioxidantes não são suficientes para neutralizar a formação de EROs, há o acúmulo de destas espécies tóxicas, podendo levar à quebra oxidativa da fita de DNA, além de causar a oxidação de proteínas e lipídeos de membrana (VAN ACKER & TOM COENYE, 2017; ZANDALINAS *et al.*, 2018). Se não reparados adequadamente, os danos oxidativos culminam com a morte celular bacteriana (VAN ACKER & TOM COENYE, 2017; ZANDALINAS *et al.*, 2018).

KOHANSKI e colaboradores (2008) demonstraram que antibióticos clássicos induzem alterações no equilíbrio redox, como mecanismo comum de ação bactericida (KOHANSKI *et al.,* 2008; DWYER *et al.,* 2015). O tratamento de *E. coli* com concentrações bactericidas de norfloxacina, ampicilina ou canamicina promoveu o acúmulo de EROs, induzindo à desorganização de íons ferro e enxofre (KOHANSKI *et al.,* 2008). Por sua vez, a presença de Fe³⁺

livre no citosol catalisa e amplifica a formação de radicais hidroxila via a reação de Fenton, conforme exposto na **equação 1** (KOHANSKI *et al.,* 2010).

$$O_2^- + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$
(Eq. 1)

Seguindo esta linha de pensamento, DWYER e colaboradores (2007) observaram que o co-tratamento com agentes quelantes de ferro promoveu a atenuação no acúmulo de EROs associado à redução da letalidade induzida por inibidores da DNA girase (DWYER, *et al.*, 2007). Da mesma maneira, o condicionamento do meio de cultivo com agentes antioxidantes (tioureia, *N*-acetilcisteína (NAC) e glutationa) bloqueia a formação de EROs, tornando os microrganismos mais resistentes à ação de antimicrobianos de ação bactericida (KOHANSKI *et al.*, 2008; CAMERON & PAKRASI, 2011; YOUNG *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2019). Assim como os antibióticos bactericidas clássicos, tem sido proposto que compostos coordenados a metais de transição são capazes de induzir danos celulares oriundos da formação de EROs. Anteriormente, observou-se que compostos de coordenação promoviam drásticas perturbações na homeostase de ferro, levando desestabilização de centros [4Fe-4S]²⁺ (BARRAS *et al.*, 2018).

0 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina(1,2-diaminociclohexano)(ClO₄)₂ composto apresentou-se como um inibidor do crescimento de S. aureus e E. faecalis (NG et al., 2018). O mecanismo de ação bactericida deste composto foi correlacionado aos danos oxidativos induzidos pela produção exacerbada de H₂O₂; por este motivo, o efeito bactericida deste composto foi mitigado pela suplementação enzimática de catalase (NG et al., 2018). O uso do derivado da 1,10fenantrolina, Ru(II) (4,7-difenil-1,10-fenantrolina)2(,2-benzenoditiolato) como fotossensibilizador no tratamento fotodinâmico contra S. aureus e E. coli promoveu o acúmulo intracelular de EROs, culminando com a morte bacteriana (FREI et al., 2014). PÁEZ e colaboradores (2013) demonstraram que a indução do estresse oxidativo foi crucial para ação anti-S. aureus e anti-E. coli de compostos derivados da 1,10-fenantrolina coordenados ao Ru²⁺ e Cr³⁺. Mais recentemente, o composto coordenado a íons Ag⁺ e Ru⁺, AGXX[®] (Largetec GmbH, Berlim), foi desenvolvido como polímero antimicrobiano de amplo espectro, que pode ser eletrodepositado em várias superfícies, incluindo aco, cerâmica, vidro e polímeros orgânicos (GURIDI et al., 2015;

CLAUSS-LENDZIAN *et al.*, 2018; VAISHAMPAYAN *et al.*, 2018). Ag⁺ e Ru⁺ desempenham um papel central na ação bactericida deste polímero. Os íons metálicos formam uma célula microgalvânica, que induzem a formação de EROs, causando uma forte resposta oxidativa em bactérias Gram-posivitas e Gram-negativas (GURIDI *et al.*, 2015; HEISS *et al.*, 2017; CLAUSS-LENDZIAN *et al.*, 2018).

1.10.2-Danos à membrana bacteriana

O envoltório bacteriano é composto por biomoléculas ricas em grupamentos químicos altamente eletronegativos, o que favorece a adsorção de cátions, podendo alterar estruturalmente o envoltório bacteriano, bem como afetar a permeabilidade e a atividade de transporte da membrana bacteriana (ZHANG *et al.*, 2008). Corroborando essa hipótese, observou-se, através de microscopia eletrônica de varredura, que a integridade de membrana plasmática de *E. coli* e *S. aureus* foi drasticamente comprometida pelo tratamento com concentrações tóxicas de íons de Ag⁺ e Al³⁺ (JUNG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010; LEMIRE *et al.*, 2013). Em outro estudo, através de microscopia eletrônica de transmissão, foi observado o aumento do espaço periplasmático em cepas de *E. coli*, que foram tratadas com nanoparticulas de prata, sugerindo que estes metalocompostos induzem o adelgaçamento da membrana interna e seu desprendimento da parede celular (FENG *et al.*, 2014).

Sabe-se que íons metálicos interrompem a cadeia transportadora de elétrons, uma vez que inibem a atividade da enzima NADH:ubiquinona oxirredutase (DIBROV *et al.*, 2002; BELLUCO *et al.*, 2016; BARRAS *et al.*, 2018). Neste contexto, FADEEVA e colaboradores (2011) relataram que Ag⁺ foi capaz de inibir a atividade da enzima NADH:ubiquinona oxirredutase produzida por *Vibrio harveyi*, e a mutação sítio dirigida no resíduo 377 desta proteína (Cys→Ala) conferiu resistência a vários íons metálicos (FADEEVA *et al.*, 2011). Em *Vibrio cholerae*, observou-se que Ag⁺ atua dissipando potencial quimiosmótico da membrana bacteriana, causando vazamento de prótons através da membrana e extravazemento do conteúdo intracelular (DIBROV *et al.*, 2002). Em outro exemplo, BONDARENKO e colaboradores (2018) observaram que nanopartículas de prata apresentaram excelente ação bactericida contra *E. coli e P. aeruginosa*, exibindo valores de CMI de 320 µM e 40 µM, respectivamente. Neste mesmo estudo, os autores demostraram que a membrana plasmática foi o principal alvo das nanopartículas de prata, induzindo: despolarização da membrana externa, extravasamento de K⁺ para o ambiente extracelular e inibição da respiração

celular (BONDARENKO *et al.*, 2018). De maneira similar, BRAHMA e colaboradores (2018) destacaram que células de *S. aureus* tratadas com o composto macrocíclico hexadentado derivado da tiossemicarbazida revelaram numerosas protrusões no envoltório celular, além da alteração de polarização da membrana plasmática. WANG e colaboradores (2015) relataram a atividade antimicrobiana do composto derivado da 1,10-fenantrolina coordenado ao Ru³⁺ ([Ru(1,10-fenantrolina)2 (polipropidil)]²⁺). Através de análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, observou-se que os compostos derivados do Ru³⁺ promoveram a ruptura da membrana celular e o extravasamento do conteúdo citoplasmático (KANG *et al.*, 2015).

1.10.3- Disfunção de proteínas essenciais ao metabolismo bacteriano

Outro mecanismo proposto para os compostos de coordenação está relacionado à disfunção de enzimas essenciais à fisiologia bacteriana (VIGANOR et al., 2019). Neste sentido, tem sido relatado que compostos metálicos promovem a disfunção de inúmeras enzimas como um efeito colateral do acúmulo intrabacteriano de EROs. STADMAN e colaboradores (2003) relataram que compostos metálicos foram capazes de oxidar a cadeia lateral dos aminoácidos histidina, arginina, lisina e prolina presente nas cadeias polipeptídicas (STADTMAN et al., 2003). Consequentemente, a oxidação destes resíduos de aminoácidos levou à desorganização da estrutura proteica terciária e inibicão da atividade enzimática (STADTMAN et al., 2003). Portanto, compostos metálicos são capazes de catalisar danos sítio-específicos às proteínas bacterianas e, alguns desses danos são relacionados à toxicidade do metal na fisiologia de diferentes microrganismos (GOLD et al., 2018). Por exemplo, concentrações bactericidas de nanocompostos de prata oxidaram resíduos de cisteína das NADH:desidrogenases do cadeia transportadora de elétrons de E. coli (MORONES et al., 2005). Assim, a inativação da cadeia transportadora de elétrons pelos íons Ag⁺ culminaram com a morte bacteriana (MORONES et al., 2005). Da mesma maneira, ZHENG e colaboradores (2017) relataram que nanocristais de ouro promoveram a inativação oxidativa de enzimas essenciais ao metabolismo de P. aeruginosa, B. subtilis, S. epidermidis, E. coli e S. aureus. Em S. cerevisiae, foi observado que concentrações fungicidas de Cr⁴⁺ causaram o aumento na produção de EROs, que promoveram a oxidação de proteínas relacionadas à glicólise e demais vias de obtenção de energia (SUMMER et al., 2005). Por este motivo, os autores propuseram que a oxidação de proteínas citosotólicas de S. cerevisiae era o principal fator que promovia a ação fungicida associada ao Cr⁴⁺ (SUMMER *et al.*, 2005).

Além da oxidação direta de aminoácidos, o desmembramento de centros [4Fe-4S]²⁺, mediados por metalocompostos, pode alterar drasticamente a ação do metabolismo bacteriano (PAIN & DANCIS, 2016). O tratamento de E. coli com AgNO₃ levou à inativação de enzimas pertencentes ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), que possuem em seu sítio ativo centros [4Fe-4S]²⁺, incluindo: aconitase, fumarase e succinato desidrogenase (WANG et al., 2019). Por sua vez, de acordo com XU e colaboradores (2012), Ag⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺ foram capazes de inibir *in vitro* e *in vivo* a atividade de enzimas que possuem centros [4Fe-4S]²⁺ em seu sítio catalítico, de maneira independente à presença de EROs (XU et al., 2012). Em outro trabalho, CALDERON e colaboradores (2009) reportaram que o íon tetravalente Te⁴⁺ apresentava ação bactericida contra células de E. coli. Os autores relataram que o mecanismo de ação deste metal estaria associado às alterações no metabolismo redox bacteriano, que acarretaram na desarticulação de centros [4Fe-4S]²⁺, culminando na inibição das enzimas fumarase e aconitase (CALDERON et al., 2009). Em V. cholerae, foi observado que íons de prata promoveram o colapso da força próton-motiva de membrana através da inibição de enzimas, que possuem centros [4Fe-4S]²⁺ em sua estrutra, e que são essenciais à cadeia transportado de elétrons (como exemplos: NADH:ubiquinona oxirredutase, succinato:ubiquinona oxirredutase e ferredoxinas) (DIBROV et al., 2002). Também tem sido relatado que o mecanismos de toxidez de íons de Cu²⁺ está relacionado à inibição de enzimas que dependem de centros [4Fe-4S]²⁺ para sua atividade catalítica, incluindo: dihidroxi-ácido desidratase e isopropilmalato isomerase (pertencente à via de biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada), além de fumarase e 6-fosfogluconato desidratase (MACOMBER et al., 2009).

O mimetismo iônico também é outro mecanismo de inibição enzimática associado a compostos de coordenação. Por exemplo, o íon Pb²⁺ promove o deslocamento de Zn²⁺ localizado no sítio ativo da enzima δ -aminolevulinato desidratase, inibindo a atividade desta e levando à toxicidade antimicrobiana (OGUNSEITAN *et al.*, 2000). Da mesma maneira, o tratamento de *S. cerevisiae* e *P. aeruginosa* com AgNO₃ resultou na incorporação de Ag⁺ no sítio ativo de ligação Cu⁺ da enzima SOD, inibindo a ação desta *in vivo* (CIROLO *et al.*, 1994; BOUSKILL *et al.*, 2007). Apesar da inibição da atividade de Cu-Zn-SOD não ser fatal a este microrganismo, a substituição de Ag⁺ por Cu⁺ no sítio ativo de SOD deixaria o microrganismos mais vulnerável à toxicidade do superóxido (CIROLO *et al.*, 1994; BOUSKILL *et al.*, 2007). WANG e colaboradores (2018) demostraram que suspenções coloidais de subcitrato de bismuto, amplamente utilizadas no tratamento de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori*, foram capazes de inibir

irreversivelmente a atividade de metalo- β -lactamases, através da substituição dos íons Zn²⁺, presentes no sítio ativo, pelo íon Bi³⁺, inativando esta enzima e restaurando a eficácia antimicrobiana do meropenem sobre cepas de *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases (WANG *et al.*, 2018).

Por fim, além de perturbar sítios de ligação a metais no centro ativo, compostos de coordenação também podem substituir metais não catalíticos essenciais para a manutenção da atividade enzimática. Por exemplo, a substituição do íon Zn^{2+} por Ni²⁺ nos sítios de ligação de Zn^{2+} na enzima da via glicolítica fructose-1,6-bisfosfato aldolase leva à perda da atividade catalítica desta enzima (MACOMBER *et al.,* 2012). Além disto, Ni²⁺ tem ação bacteriostática em culturas de *E. coli* que utilizam glucose como única fonte de carbono, reforçando a inibição da enzima fructose-1,6-bisfosfato aldolase como um mecanismo de toxidez *in vivo* (MACOMBER *et al.,* 2012). Similarmente, a atividade bactericida de nanopartículas de prata tem sido atribuídas a perturbações nos sítios de ligação de Zn^{2+} da enzima fosfomanose isomerase, que medeia a isomerização de manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, um importante intermediário da via glicolítica (BHATTACHARYA & MUKHERJEE, 2008).

Além de íons metálicos, a capacidade de derivados da 1,10-fenantrolina em alterar a atividade de enzimas essenciais ao metabolismo bacteriano também tem sido relatada. Observouse que a 1,10-fenantrolina na concentração de 1 mM foi capaz de inibir a atividade das enzimas metiltransferase e acetl-coenzima A sintase, que são essenciais à sobrevivência de *Clostridium difficile* (ZHU *et al.*, 2013). Em outro trabalho, observou-se que os compostos [Cu(1,10-fenantrolina)(metilimidazol) (H₂O)₂] e [Cu(1,10-fenantrolina)(cianoguanidina)(H₂O)(NO₃)₂ inibiram 50% da atividade enzimática refernte à fosfatase alcalina na concentração de 42 μ M. A inibição da fosfatase alcalina resultou na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo: *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis* e *E. faecalis* (URQUIZA *et al.*, 2013).

A luz dos diversos e complexos mecanismos de ação que um composto de coordenação pode possuir bem como dos resultados preliminares que mostraram a excelente ação anti-*P. aeruginosa* de compostos derivados da fendiona (VIGANOR *et al.*, 2016), o baixo perfil de toxidez destes compostos em larvas de *G. mellonella* e em modelo murino (McCANN *et al.*, 2012), destacamos Ag-fendiona e Cu-fendiona como potenciais candidatos a metalofármacos com potencial aplicação no tratamento de infecções multirresistentes de *P. aeruginosa*.

2- JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de antimicrobianos, na primeira metade do século 20, mudou drasticamente a prática médica, melhorando o prognóstico de doenças infecciosas (AORA *et al.*, 2007). No entanto, a emergência de cepas MDR vem resultando em sucessivas falhas terapêuticas, com consequente aumento nas taxas de morbidade e mortalidade de infecções bacterianas. Neste cenário, *P. aeruginosa* se destaca como um patógeno oportunista, cuja opção terapêutica é limitada, uma vez que este microrganismo possui um amplo repertório de mecanismos moleculares de resistência aos antimicrobianos clássicos (GELLATLY & HANCOCK, 2013). Desta forma, dada a severidade de infecções causadas por *P. aeruginosa*, associado ao crescente número de infecções resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis, a busca por estratégias de prevenção e novas moléculas anti-*P. aeruginosa* se faz necessária e urgente (TACONELLI *et al.*, 2017).

Diante da demanda de novas estratégias terapêuticas anti-*P. aeruginosa*, nosso grupo relatou a atividade antimicrobiana de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina. Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram excelente atividade anti-*P. aeruginosa*, inibindo o crescimento bacteriano planctônico e biofilme (VIGANOR *et al.*, 2016). Um grande obstáculo no desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobiano é o limitado domínio acerca de seus mecanismos de ação. No entanto, conhecer os alvos celulares e os mecanismos de ação de uma nova molécula podem fornecer informações inestimáveis, que auxiliam na previsão de possíveis mecanismos de resistência bacteriana, além de fornecer preciosos indicativos de problemas relacionados à toxicidade das drogas de estudo no sistema hospedeiro. Portanto, o objetivo do presente trabalho é investigar os prováveis mecanismos de ação anti-*P. aeruginosa* de compostos de coordenação derivados de fendiona.

3- OBJETIVO

3.1- Objetivo geral

Investigar os principais alvos celulares e mecanismos de ação anti-*P. aeruginosa* de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), [Ag(fendiona)₂]ClO₄ (Ag-fendiona) e [Cu(fendiona)₃](ClO₄)₂.4H₂O (Cu-fendiona).

3.2- Objetivos específicos

- Investigar, através de ensaios *in silico*, interações moleculares entre a enzima LasB e os compostos derivados da fendiona;
- Analisar o efeito destes compostos sobre a expressão do gene *lasB*, bem como na produção e secreção da enzima madura;
- Avaliar a capacidade dos compostos derivados da fendiona em neutralizar os danos celulares induzidos pela LasB *in vitro* sobre células pulmonares A549 e no modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*;
- Comparar o efeito anti-*P. aeruginosa* de compostos derivados de fendiona em diferentes meios de cultivo;
- Observar o mecanismo de inibição (bactericida ou bacteriostático) dos compostos derivados da fendiona sobre o crescimento planctônico da cepa ATCC 27853 e isolados clínicos MDR de *P. aeruginosa*;
- Avaliar o possível efeito da interação entre os compostos derivados da fendiona e o antimicrobiano clássico ceftazidima;
- Quantificar a formação de EROs em resposta ao tratamento com os compostos derivados da fendiona;
- Analisar o perfil de resposta antioxidante após a exposição aos compostos de coordenação derivados da fendiona;
- Investigar os danos oxidativos (atividade de aconitase, peroxidação lipídica e clivagem do DNA) induzidos pelo tratamento com Ag-fendiona e Cu-fendiona;
- Observar as perturbações na fisiologia e ultraestrutira de membrana bacteriana induzidas pelo tratamento com os compostos estudados;
- Avaliar alterações no perfil metabólico de *P. aeruginosa* após o tratamento com os compostos derivados do fendiona.

4- METODOLOGIA

4.1- Microrganismos

No presente estudo foram utilizadas uma cepa padrão (ATCC 27853) e cinco isolados clínicos de *P. aeruginosa* (**Tabela 1**). As cepas clínicas foram isoladas de diferentes sítios anatômicos de pacientes internados em hospitais de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (gentilmente cedidas pela Dra. Kátia Regina Netto dos Santos, UFRJ, e Dra. Ana Paula Nunes, UFES). O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi anteriormente avaliado por nosso grupo (SILVA *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Local de isolamento e perfil de suscetibilidade das amostras de *P. aeruginosa* utilizadas no presente estudo.

		Perfil de susceptibilidade			
Сера	Isolamento	SPM	Ceftazidima	Imipenem	Meropenem
ATCC 27853	Hemocultura	_	S	S	S
09HC	Hemocultura	_	R	R	R
160T	Secreção traqueal	+	R	R	R
22 U	Urina	+	R	R	R
186FC	Fibrose cística	_	R	R	R
126T	Secreção traqueal	+	R	R	R

+, presença; -, ausência; SMP, São Paulo metalo-β-lactamase gene; R, resistente; S, Sensível.

4.2- Cultivo dos microrganismos

Os isolados de *P. aeruginosa* foram semeados em meio ágar triptona de soja (TSA) e incubadas por 24 h a 37°C. Posteriormente, as células bacterianas foram repicadas em 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) e incubadas por 24 h a 37°C em agitação constante a 250 RPM (MARQUAT *et al.*, 2005).

4.3- Compostos de coordenação

Os compostos utilizados (**Figura 12**) foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Dr. Malachy McCann (National University of Ireland Maynooth, Irlanda). Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100 mM (solução estoque) e acondicionados à temperatura ambiente por até 6 meses.



Figura 11 – Estrutura química da 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados: 1,10-fenantrolina-5,6-diona (A), [Cu(fendiona)₃](ClO₄)₂.4H₂O (Cu-fendiona) (B) e [Ag(fendiona)₂]ClO₄ (Ag-fendiona) (C).

Parte I: Efeitos de compostos derivados de fendiona sobre a LasB

4.4- Análise *in silico* das interações moleculares dos derivados da fendiona e o sítio ativo de LasB

Os estudos das interações moleculares entre o sítio ativo da enzima LasB de *P. aeruginosa* e compostos de coordenação coligados à fendiona foram realizados pelo Dr. Alexandre Castro e Dr. Teodorico Ramalho (Universidade Federal de Lavras – UFLA). Inicialmente, as estruturas dos compostos foram construídas e otimizadas por cálculos semi-empíricos no programa PC Spartan Pro (HEHRE *et al.*, 1999). Os ensaios de docking molecular foram realizados no programa Molegro Virtual Docker (MVD[®]), utilizando-se a estrutura cristalográfica da LasB de *P. aeruginosa* contendo o ligante *N*-(1-carboxi-3-fenilpropil)-fenilalanil-alfa-asparagina (HPI) em seu sítio ativo (código PDB: 1U4G; resolução: 1,4 Å) (THOMSEN *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2018). Considerou-se um raio de 5Å no sítio ativo para a realização dos cálculos (RAMALHO *et al.*, 2009). O ancoramento molecular determina a conformação mais provável do ligante na enzima

(GONÇALVES *et al.*, 2014). Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, foi necessário analisar todos os modos de interação, considerando-se a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da enzima por meio da função de pontuação MolDock que é definido pelas **equações 1** e **2**.

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra}$$
(Eq. 1)

Onde:

$$E_{inter} = \sum_{i \in ligante} \sum_{i \in proteina} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$
(Eq. 2)

O termo de E_{PLP} é definido como potencial linear por partes que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: (i) a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos e, (ii) potencial para a formação de uma ligação de hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática em quilocalorias por mol (kcal.mol⁻¹) (Molegro ApS). A energia interna do ligante (E_{intra}) é definida pela **equação 3**:

$$E_{intra} = \sum_{i \in ligante} \sum_{j \in ligante} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{ligações flexíveis} A \left[1 - \cos \left(m.\theta - \theta_0\right] + E_{penalizada}\right]$$
(Eq. 3)

A primeira parte da equação refere-se a todos os pares de átomos do ligante, excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à torção da energia, onde θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é utilizada se diversas torsões são determinadas. O último termo, E_{penalizada}, atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que

2.0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante (Molegro ApS). Em seguida, foram desenvolvidos cálculos semi-empíricos utilizando-se o programa Gaussian 09, para obtermos os valores mais precisos de energia de interação entre cada um dos compostos e o sítio ativo de LasB. Considerou-se um raio de 5Å no sítio ativo para a realização dos cálculos. Os cálculos semi-empíricos foram baseados nos métodos desenvolvidos por Michael Polanyl e Henry Eyring, que combinam a teoria quântica à analise de resultados empíricos. Através deste método é possível a abordagem sistemas moleculares que possuem número de átomos, como o sítio ativo da LasB.

4.5- Obtenção dos sobrenadantes de cultivo bacteriano

4.5.1- Crescimento planctônico

Colônias isoladas de *P. aeruginosa* foram inoculadas em caldo triptona de soja (TSB) acrescido de 1% de glicerol, 50 mM de glutamato, 10 mM de CaCl₂ e 10 mM de ZnCl₂ e incubadas por 24 h a 37°C (MARQUAT *et al.*, 2005). As culturas bacterianas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22 µm. Os sobrenadantes livres de células foram concentrados 10 vezes utilizando-se sistema de micropartição Amicon com "cut-off" de 10 kDa (SOARES *et al.*, 2008, GALDINO *et al.*, 2017).

4.5.2- Crescimento em biofilme

Para a obtenção do sobrenadante de cultivo referente ao crescimento em biofilme, suspensões de amostras bacterianas correspondentes a 0,5 de turbidez da escala McFarland (10^8 UFC/ml) foram feitas em caldo TSB. Em seguira, 100 µl de cada suspensão foram distribuídos numa placa de poliestireno de 96 poços, que foram incubadas por 24 h a 37°C. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados e filtrados em membrana de 0,22 µm para retirada das células não aderentes (VIGANOR *et al.*, 2016).

4.5.3-Dosagem de proteína

A concentração de proteínas presente nos extratos celulares e nos sobrenadantes de cultivo concentrados foi determinada pelo método descrito por LOWRY e colaboradores (1951), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) a 0,1% como padrão de proteína.

4.6- Dosagem de atividade elastinolítica

A atividade de elastase foi avaliada utilizando-se o substrato fluorogênico específico para elastase de *P. aeruginosa* (Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-*p*-nitro-benzil-amida) conforme descrito por CATCHCART e colaboradores (2011). Resumidamente, os sobrenadantes de células planctônicas contendo 50 μ g de proteína foram incubados juntamente com o substrato fluorogênico a 50 μ M e tampão Tris-HCl a 50 mM, suplementado com CaCl₂ a 10 mM (pH 7,2) durante 1 h a 37°C. Durante todo o tempo de reação, a intensidade de fluorescência foi monitorada em fluorímetro (excitação a 330 nm e emissão a 460 nm). Uma unidade de elastase corresponde à quantidade de enzima capaz de converter 1 ng de substrato fluorogênico por min por mg de proteína (CATCHCART *et al.*, 2011).

4.7- Zimografia

Os perfis proteolíticos referentes às cepas ATCC 27853 e 09HC foram avaliados e caracterizados por SDS-PAGE co-polimerizado com 0,1% de gelatina. Adicionou-se 40 μ g de proteínas referentes obtidos do sobrenadante de cultivo planctônico das cepas estudadas. Após eletroforese em corrente constante de 120 V a 4°C, o SDS foi removido por incubação com 10 volumes de Triton X-100 a 2,5% por 1 h à temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, o gel foi incubado por 24 h a 37°C no tampão de digestão contendo 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de CaCl₂, 1 μ M de ZnCl₂ e 150 mM de NaCl e pH 8,0 (MARQUAT *et al.*, 2005). O gel foi corado por 2 h com Coomassie azul brilhante R-250 a 0,2% em metanol:acido acético: água (50:10:40 v/v/v) e descorado numa solução de metanol:acido acético:água (5:10:85 v/v/v) durante 12 h, para intensificação dos halos de digestão. As massas moleculares das peptidases foram calculadas por comparação com a mobilidade de padrão de peso molecular (SOARES *et al.*, 2008).

4.8- Imunodetecção de LasB

A produção e secreção da enzima LasB foi avaliada através de imunodetecção utilizandose o anticorpo anti-LasB (gentilmente cedido pela Dr. Mary Marquat – University of Mississipi, USA). Para tal, 10⁶ células de *P. aeruginosa* foram incubadas na presença e ausência de compostos derivados da fendiona em concentrações sub-inibitórias (½×CMI) por 24 h. Ao final do tratamento, os sobrenadantes foram coletados conforme o protocolo descrito no ponto 4.5.2. Adicionou-se tampão de amostra (Tris 125 mM, SDS 4%, glicerol 20 %, azul de bromofeno 0,002 %, ßmercaptoetanol 10%, pH 6,8; LEAMMLI et al., 1961) aos sobrenadantes de P. aeruginosa (contendo 100 µg de proteína). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min. Após o aquecimento, as proteínas foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 12 %, e transferidos para membrana de nitrocelulose com corrente de 200 mA por 2 h a 4°C. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite livre de ácidos graxos diluídos em 5% em tampão TBS-Tween (NaCl a 150 mM, Tris a 10 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4) por 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes em TBS-Tween e incubada com anticorpo primário anti-LasB (gentilmente doado pelo Dr Richard O'Callaghan, University of Mississippi Medical Center, EUA) diluído em uma razão de 1:500 por 4 h. A detecção foi feita após a adição do anticorpo secundário (anti-rabbit) conjugado com peroxidase diluído em uma razão de 1:10000 por meio de kit de quimiluminescência (GE healthcare, IL, USA) (MARQUART et al., 2005). Comparou-se o perfil de migração das bandas detectadas com o perfil de bandas do padrão de proteínas (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA) com o objetivo de confirmar a massa molecular (em kDa) das proteínas detectadas. GAPDH possui uma sequencia de aminoácido altamente conservada, e anteriormente, foi relatado que esta enzima é constitutivamente secretada por *P. aeruginosa* através de vesiculações de membrana (KIM et al., 2013; VANDEN BERGH et al., 2013). Com esta informação em mente, selecionou-se o anticorpo policional anti-humano GAPDH produzido em coelho (1:10.000, Sigma-Aldrich) para ser utilizado como controle interno. Com o objetivo de confirmar a homologia entre a GAPDH humana e de P. aeruginosa, alinhou-se a sequência de aminoácidos destas duas enzimas utilizando-se o programa Clustal 2.1. O escore de homologia é definido como o número de resíduos de aminoácidos idênticos divido pelo número total de resíduos comparados (lacunas de nãopareamos são excluídas nesse cálculo). Portanto, a comparação entre a sequência de GAPDH humana e de P. aerugiona apresentou 47,11% de homologia. Entretanto, considerando-se as substituições de resíduos de aminoácidos conservadas e semi-conservadas nos cálculos de escore de pares, o escore de homologia entre as duas proteínas aumentou para 78,50% (Figura 13).

sp P27726 G3P_PSEAE sp P04406 G3P_HUMAN	MGTIRLAINGFGRIGRNVLRALYTGHYREQLQVVAIND-LGDAAVNAHLFQYDSVHGHFP MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKFH **.::::*******************************	59 57
sp P27726 G3P_PSEAE sp P04406 G3P_HUMAN	GEVEHDAESLRVMGDRIAVSAIRNPAELPWKSLGVDIVLECTGLFTSRDKAAAHLQAGAG GTVKAENGKLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHLQGGAK * *: : .* : *: *:: *:*:*: *.*: *:*:**:**:	119 117
sp P27726 G3P_PSEAE sp P04406 G3P_HUMAN	KVLISAPGKDVEATVVYGVNHEVLRASHRIVSNASCTTNCLAPVAQVLHRELGIEHGLMT RVIISAPSADAP-MFVMGVNHEKYDNSLKIISNASCTTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMT :*:****. ** ***** *:*:*********************************	179 176
sp P27726 G3P_PSEAE sp P04406 G3P_HUMAN	TIHAYTNDQNLSDVYHPDLYR-ARSATQSMIPTKTGAAEAVGLVLPELAGKLTGLAVRVP TVHAITATQKTVDGPSGKLWRDGRGALQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVP *:** * *: * .*:* .*:**:****************	238 236
sp P27726 G3P_PSEAE sp P04406 G3P_HUMAN	VINVSLVDLTVQVARDTSVDEVNRLLREASEGSPVLGYNTQPLVSVDFNHDPRSSIFD TANVSVVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPLKGILGYTEHQVVSSDFNSDTHSSTFD . ***:**** :: : : . *::::::**** :: :*** *: :*****	296 296
sp P27726 G3P_PSEAE sp P04406 G3P_HUMAN	ANHT-KVSGRLVKAMAWYDNEWGFSNRMLDSALALAAARD 335 AGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE- 335 *. :::** ::****** ::* :* :*:	
	* Resíduos de aminoácidos idênticos : Resíduos de aminoácidos conservados · Resíduos de aminoácidos semi-conservados	

Figura 12 – Representação esquemática do alinhamento das sequências de GAPDH produzida por humanos e *P. aeruginosa*.

4.9- Expressão do gene *lasB* por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Inicialmente, o RNA foi isolado com TRIzol[®] por meio do kit de isolamento de RNA bacteriano (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). A concentração de RNA foi mensurada no Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade do RNA foi avaliada por meio da corrida das amostras em gel de agarose 1,5% a 120 V. As amostras de RNA foram misturadas com tampão de amostra adequado (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%). Um volume de 10 µl dessa mistura foi então adicionada ao gel. O brometo de etídio foi utilizado para visualização das bandas através do transiluminador de luz ultravioleta. Em seguida, o RNA purificado foi quantificado por ensaio de RT-PCR, de acordo com o protocolo QuantiFast[®] SYBR[®] Green RT-PCR Handbook protocol (Qiagen, Germany). Para a quantificação da expressão de *lasB* e *rpoD* utilizou-se os primers descritos na **tabela 2**. As amostras foram analisadas no instrumento Light Cycler 480 (Roche Life Science, Sussex, UK) com o seguinte protocol: etapa de ativação a 95°C, seguida por 45 ciclos de 95°C (desnaturação), 63°C (anelamento) e 72°C (extensão), e

esfriamento a 4°C. O valor de $\Delta\Delta$ CT foi utilizado para determinar a magnitude da expressão gênica (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

	Primer				
	Forward	Reverso			
lasB	5'-AAGTGCTCGATCAGTGGGAA-3'	5'-CTGCTTGTAGGTGTTGGTCG-3'			
rpoD	5'-CCGCCACTACCCGCTGAAG-3'	5'-TGCCGTGCAACTCGCTCTC-3'			

Tabela 2- Primers utilizados na reação de RT-PCR para a quantificação da expressão gênica de lasB e rpoD.

4.10 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB em células epiteliais pulmonares (A549)

Células A549 (células humanas de epitélio basal alveolar, ATCC CCL-185) foram cultivadas em garrafas estéreis de 75 cm² contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e com 2 mM de L-glutamina, em atmosfera de CO₂ a 5%, a 37°C. Para o experimento, células A549 foram semeadas (10⁴ células por poço) em placas de 96 ou 24 poços ate atingir a confluência. Primeiramente, o sobrenadante livre de células bacterianas (equivalente a 100 µg de proteína) e LasB purificada (10 ng de proteína) (Elastin Products Company, Missouri, EUA) foram previamente tratadas com 25 µM fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona por 30 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a LasB neutralizada foi adicionada à monocamada de A549, e os sistemas foram incubados a 37°C a atmosfera de CO₂ a 5% por 48 h. Os sistemas que receberam o tratamento apenas com os compostos derivados da fendiona foram utilizadas como controle de viabilidade. Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi quantificada pela redução de MTT (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), e a integridade e morfologia da monocamada foram observadas por microscopia de campo claro (AOKI *et al.*, 2010).

4.11- Efeitos de compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB contra larvas de *Galleria mellonella*

Os experimentos que envolveram a manipulação de larvas de G. mellonella foram realizados em colaboração com o Dr. Marcos Dias Pereira e a mestranda Larissa Maura de Melo Mattos, ambos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ. Para os experimentos, foram selecionadas larvas de G. mellonella que atingiram o último estágio de desenvolvimento larval e que apresentaram tamanho (15-20 mm) e peso (aproximadamente 200 mg) similares, e ausência de pigmentação acinzentada na cutícula (FERNANDES et al., 2017). Inicialmente, avaliou-se os efeitos tóxicos de LasB em larvas de G. mellonella. Para isso, os sobrenadantes de cultivo das cepas ATCC27853 e 09HC foram obtidos de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.1. Em seguida, 10 µl dos sobrenadantes de *P. aeruginosa* (100 µg de proteína) ou sobrenadante termicamente inativado (100°C, 5 min) foram inoculados diretamente na hemocele de G. mellonella, utilizando-se uma seringa Hamilton de 25 µl. Como controle da lesão física, o mesmo volume (10 µl) de PBS foi injetado na última pró-leg esquerda das larvas de G. mellonella. Além disso, um grupo controle extra de larvas sem qualquer inoculação foi empregado para avaliar a saúde das larvas no decorrer do experimento. Posteriormente, as larvas foram incubadas em placas de Petri de vidro a 37°C e ao abrigo da luz por até 7 dias. O número de larvas mortas foi avaliado diariamente. Larvas enegrecidas e que não apresentaram reação após o teste de estimulação (toque) foram consideradas mortas (FERNANDES et al., 2017; RIZZO et al., 2017). Por fim, a taxa de sobrevivência das larvas foi plotada e analisada utilizando o modelo de curva Kaplan-Meier no software GraphPad Prism 7.0 (FERNANDES et al., 2017; RIZZO et al., 2017). Em seguida, investigou-se a capacidade de Cu-fendiona em inibir a toxidez induzida por LasB em larvas de G. mellonella. O sobrenadante de ATCC 27853 em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µg de proteína) assim como 1 µg de LasB purificada foram previamente tratados com 50 µM Cu-fendiona por 30 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação, 10 µl dos sistemas foram inoculados diretamente na hemocele das larvas e as taxas de sobrevivência foram monitoradas diariamente durante 7 dias, conforme descrito acima.

Parte II: Efeitos dos compostos derivados da fendiona no crescimento de P. aeruginosa

4.12- Cálculo da CIM

As CMIs referentes aos compostos derivados da fendiona foram determinadas de acordo com o protocolo descrito pelo Instituto de Padronização Clinica e Laboratorial (CLSI, do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2007- M7-A6) em uma placa de microtitulação com 96 poços. As diluições dos compostos (1,56 – 200µM) foram feitas em caldo Mueller Hinton – cátion ativado (MHB-ca) (BD Difco, CA), caldo LB, ou meio sintético de escarro de fibrose cística (SCFM, do inglês, *synthetic cystic fibrosis sputum medium*) (PALMER *et al.*, 2007). Uma suspensão bacteriana foi preparada em salina 0,85% com uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland (~10⁸ UFC/ml). Essa suspensão foi diluída serialmente para obter um inóculo final de aproximadamente 10⁵ UFC/ml. A placa foi incubada por 24 h a 37°C. A menor concentração do composto que demonstrou ausência de turvação visível foi considerada como a CMI. Foram utilizados como controles os seguintes sistemas, poços (i) contendo apenas o meio de cultura; (ii) contendo a bactéria foi cultivada nos meios de cultivo, mas na ausência dos compostos de coordenação, e (iii) contendo células bacterianas cultivadas em meio de cultivo (MHB, LB ou SCFM) e DMSO (diluente dos compostos).

4.13- Curva tempo-morte

Este experimento foi utilizado com o intuito de definir alguns parâmetros farmacodinâmicos como ação bactericida ou bacteriostática e tempo de ação dos compostos derivados da fendiona no crescimento de *P. aeruginosa*. Para tal, as culturas bacterianas ajustadas à $DO_{600nm} = 0,1$ foram incubadas em caldo MH a 37°C em agitação a 250 rpm, na presença de concentrações referentes a $\frac{1}{2}$ ×CMI, 1×CMI e 2×CMI de cada um dos compostos testados (VIGANOR *et al.*, 2015). Os sistemas tratados apenas com o diluente dos compostos utilizados (DMSO) foram utilizados como controle. Foram aliquotados 10 µl das culturas tratadas após 0, 1, 3, 6, 9 e 24 h de tratamento. Então, cada alíquota foi diluída serialmente em tubos contendo salina estéril 0,85%. Por fim, 10 µl de cada diluição foram espalhados por toda superfície das placas de agar Mueller-Hinton (MHA). Após incubação a 37°C durante 24 h, as colônias foram contadas e os resultados foram plotados em um gráfico onde alguns parâmetros foram analisados, como o

efeito bactericida (diminuição de \geq 3log UFC/ml das amostras sob ação da substância antimicrobiana comparado ao controle) ou bacteriostático (diminuição de < 3 log UFC/ml das amostras sob ação da substância antimicrobiana comparado ao controle) e tempo de efeito antimicrobiano (LORIAN, 2005). Todos os experimentos de curva tempo-morte foram realizados em duplicata biológica.

4.14- Efeitos das combinações de compostos derivados da fendiona com antimicrobianos clássicos sobre a viabilidade bacteriana

A associação dos compostos derivados metálicos da fendiona com os antimicrobianos clássicos, imipenem e ceftazidima, foi realizada para avaliar o possível efeito sinérgico entre estes. O método foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços contendo diluições dos compostos, por colunas, e dos outros antimicrobianos, por fileiras, e que combinaram entre si à medida que foram dispostas na placa a maneira checkerboard. As diluições dos inibidores e antimicrobianos foram preparadas em caldo MHB. Preparou-se uma suspensão bacteriana com cada um dos isolados clínicos em salina 0,85% com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland (~10⁸ UFC/ml). Essa suspensão foi diluída para obter um inóculo final de aproximadamente 10⁵ UFC/ml. Depois de inoculada, a placa foi incubada a 37°C por 24 h (JACQUELINE et al., 2005). O FIC índex (índice de concentração inibitória fracionada) foi obtido a partir da soma do FIC A (CMI do antimicrobiano A em combinação / CMI do antimicrobiano A sozinho) com o FIC B (CMI do antimicrobiano B em combinação / CMI do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo foi definido como um FIC index ≤ 0.5 ; aditividade foi definida como FIC index > 0.5 a < 2.0; indiferença foi definida como FIC index ≥ 2.0 a < 4 e antagonismo foi definido como FIC index \geq 4,0 (LORIAN, 2005). Em seguida, realizou-se a curva tempo-morte (conforme a metodologia descrita no item 4.5) com objetivo de confirmar o efeito sinérgico das combinações testadas. Para isso, as células bacterianas foram incubadas em caldo MHB na presença das combinações que apresentaram atividade antimicrobiana no checkerboad, bem como, na presença de cada um dos compostos isoladamente. Após o período de incubação, 10 µl de cada cultura foram aliquotados e diluídos serialmente em frações de 10 em tubos contendo salina estéril 0.85%. Por fim, 10 µl de cada diluição seriada foram espalhados por toda superfície das placas contendo MHA.

Parte III: Efeitos de compostos derivados da fendiona na homeostase redox de P. aeruginosa

4.15- Efeitos de antioxidante na tolerância bacteriana aos compostos derivados da fendiona

A participação de EROs na letalidade mediada por Ag-fendiona e Cu-fendiona foi avaliada através do co-tratamento com o antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC; Sigma Aldrich). Inicialmente, determinou-se a concentração mínima inibitória de Ag-fendiona e Cu-fendiona na presença do de NAC. Os isolados de *P. aeruginosa* foram cultivadas em caldo LB a 37°C sob agitação a 150 rpm por 24 h. Em seguida, ajustou-se o inóculo bacteriano a uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland (OD_{600 nm} = 0,10-0,15). As suspensões foram diluídas em caldo LB suplementado ou não com NAC a 5 mM de maneira a obter um inóculo final de aproximadamente 10^5 UFC/ml e as culturas foram incubadas em presença de diferentes concentrações dos compostos derivados da fendiona. A menor concentração do composto que demonstrou ausência de turvação visível foi considerada como a CMI.

4.16- Efeitos de compostos derivados da fendiona sobre a produção de EROs

Avaliou-se a produção de EROs em células de *P. aeruginosa* após o tratamento com os derivados da fendiona: Ag-fendiona e Cu-fendiona. Para isto, 10^6 células foram incubadas na presença de concentrações referentes a ¹/₂×CMI, 1×CMI e 2×CMI durante 1 e 3 h a 37°C. Ao final do período de incubação, as células foram centrifugadas (4000×g, 10 min, 4°C) e os sobrenadantes foram descartados. Então, as células foram incubadas com 50 µM da sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFHDA; Sigma-Aldrich). Após 30 min de incubação a 37°C, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato-salina (PBS; 150 mM NaCl, 20 mM fosfato de sódio, pH 7,2). Por fim, a detecção das EROs foi analisada por fluorimetria (Emissão a 485 nm e excitação a 530 nm). Células não marcadas com a sonda DCFHDA foram usadas como controle de autofluorescência. Células cultivadas na ausência dos compostos de coordenação foram utilizadas como controle negativo (DAVIDSON *et al.*, 1996).

4.17- Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade de enzimas antioxidantes de *P. aeruginosa*

4.17.1-Obtenção dos extratos celulares

As culturas bacterianas crescidas em TSB por 24 h a 37°C foram centrifugadas ($4000 \times g$, 40 min, 4°C) e lavadas três vezes em PBS. As bactérias foram suspensas em 500 µl de tampão Tris-HCl a 2 mM (pH 8,0) suplementado com 0,1% de Triton X-100 e, em seguida, foram lisadas em um homogeneizador celular alternando 2 min de agitação e 2 min de refrigeração no gelo (total de 5 ciclos). Finalmente, os sistemas foram novamente centrifugados a $4000 \times g$ por 10 min a 4°C e os sobrenadantes obtidos corresponderam aos extratos celulares solúveis (SOARES *et al.*, 2008).

4.17.2- Catalase

O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorbância ocasionado pela redução de H_2O_2 à água devido à presença de enzimas catalases nos extratos celulares (AEBI, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de H_2O_2 a 300 mM em tampão PBS. Em uma cubeta de quartzo, adicionou-se 390 µl de PBS, 10 µl de H_2O_2 e 100 µl de extrato celular bacteriano (aproximadamente 100 µg de proteína). Após homogeneização, registrou-se a absorbância em 240 nm em espectrofotômetro durante 3 min em intervalos de 10 seg. Culturas bacterianas expostas ao tratamento com 17 mM de H_2O_2 por 30 min foram utilizados como controle positivo. Já os extratos obtidos de células incubadas na presença do DMSO (solvente das drogas utilizadas) foram utilizados como controle negativo. A taxa de decomposição do H_2O_2 foi adquirida de regressão linear. As amostras foram analisadas em triplicata, e atividade enzimática foi calculada conforme a **equação 4** e os valores normalizados pela concentração de proteína dos extratos celulares. Uma unidade de catalase corresponde à quantidade de enzima capaz de converter 1 µmol de H_2O_2 por min por mg de proteína.

 $Atividade \ de \ catalase = \frac{\Delta Abs_{240nm}}{min} \times \ (Volume \ total \ da \ reação)}{39.4 \ M^{-1} cm^{-1}} \times \ (Volume \ de \ extrato \ celular)$

(Eq. 4)

4.17.3- SOD

A produção de SOD foi avaliada utilizando-se um kit comercial (Sigma-Aldrich). Este ensaio se baseia na redução do sal cromogênico WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio) por um ânion superóxido, formando um corante hidrossolúvel de formazana, que pode ser quantificado colorimetricamente. Para isto, 20 µl dos extratos proteicos obtidos (aproximadamente 20 µg de proteínas) foram incubados com 200 µl da solução WST-1 por 20 min a 37°C. Em seguida, o produto da reação foi quantificado em espectrofotômetro a 405 nm e a atividade enzimática determinada pela **equação 5** (ROWAN *et al.*, 2010).

 $Atividade SOD = \frac{(ABS \ branco \ 1 - ABS \ branco \ 3) - (ABS \ amostra - ABS \ branco \ 2)}{(ABS \ branco \ 1 - ABS \ branco \ 3)}$

(Eq. 5)

Onde:

• O sistema branco 1 foi composto por 20 µl de água, 200 µl de solução do sal WTS-1 e 20 µl da solução extrato proteico.

O sistema branco 2 foi composto por 20 μl de solução de amostra (solução de preparação da amostra), 200 μl de solução do sal WTS-1 e 20 μl do tampão de diluição.

• O sistema branco 3 foi composto por 20 µl de água, 200 µl de solução do sal WTS-1 e 20 de tampão de diluição.

Sistema da amostra a ser quantificada foi composto por 20 μl de solução de amostra, 200 μl de solução do sal WTS-1 e 20 μl da solução do extrato proteico.

4.18 – Aconitase

A atividade aconitase foi realizada segundo protocolo de GARDNER (2002). A atividade aconitase foi determinada por meio da taxa de formação de NADPH produzido na reação catalisada pela isocitrato desidrogenase. A reação catalisada pela isocitrato desidrogenase é dependente da concentração de isocitrato produzido pela aconitase. Portanto, a atividade aconitase é determinada, indiretamente, utilizando-se concentrações não limitantes de citrato (substrato da aconitase), isocitrato desigrogenase e NADP⁺. A reação foi realizada em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,2)

na presença 100 μ M de citrato de sódio, 60 μ M MnCl₂, 0,7 U de isocitrato desidrogenase e 270 μ M de NADP⁺. A reação foi iniciada com a adição 20 μ l de extrato celular (~20 μ g de proteína) e a produção de NADPH foi monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm por 10 min em intervalos de 30 seg. A taxa de formação de NADPH foi adquirida durante aumento linear. A atividade de aconitase foi calculada conforme a **equação 6**. A atividade foi normalizada pela concentração de proteína presente no extrato. Uma unidade de aconitase corresponde a quantidade de enzima capaz de converter 1 μ mol de citrato a isocitrato por min por mg de proteína (GARDNER, 2002, OGLESBY *et al.*, 2008).

 $Atividade \ aconitase = \frac{\Delta Abs_{240nm}}{min} \times (volume \ total \ da \ reação)}{6.22 \ mM^{-1}cm^{-1}(volume \ de \ extrato \ celular)}$

(Eq. 6)

4.19- Perfil de fragmentação do DNA em gel de agorose

Inicialmente, 5 ml de cultura bacteriana (10^6 UFC/ml) foram incubadas em caldo LB na presença e ausência de concentrações referentes 2×CMI de cada um dos compostos estudados por 5 h a 37°C e 150 rpm. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas ($4000 \times g$, 10 min, 4°C) e lavadas três vezes em tampão PBS. Para a avaliar a integridade do DNA genômico atráves da mobilidade em gel de agarose, extraiu-se o DNA genômico utilizando o kit Gentra Puregene Yeast and Bacteria Kit (Qiagen, Maryland, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Por fim, o perfil eletroforético do DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% (em tampção Tris-borato-EDTA; TBE, 89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) a 100 V por 90 min. Os géis foram corados com 0,5 mg/ml brometo de etídio por 5 min e descorado em água por 30 min. O DNA genômico foi visualizado através em UV-transiluminador (Loccus Biotecnoligia, São Paulo, Brasil).

4.20- Análise de fragmentação do DNA por TUNEL ("Transferase dUTP Nick End Labeling")

A fragmentação do DNA também foi avaliada pela técnica de TUNEL. Inicialmente, 5 ml de cultura bacteriana (106 UFC/ml) foram incubadas em caldo LB na presença e ausência de concentrações referentes a 2×CMI de cada um dos compostos estudados por 5 h a 37°C e 150 rpm. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (4000×g, 10 min, 4°C) e lavadas três vezes em tampão PBS. Em seguida, avaliou-se a fragmentação do DNA utilizando-se o kit DeadEndTM Fluorometric TUNEL System (Promega, Winsconsin, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Após o tratamento, preparou-se uma suspensão bacteriana de 5 × 10^{6} células em 500 µl de PBS. Essa suspensão bacteriana foi fixada com paraformolaldeído 4% e incubadas por 30 min em banho de gelo. Após este período, as células foram centrifugadas (4000×g, 5 min, 4°C), lavadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram permeabilizadas pela adição de 1 ml de etanol 70% gelado e estas foram incubadas por 15 h a -20°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS para remoção do etanol. Então, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se o tampão de equilíbrio e incubou-se por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 10 µl de solução para marcação de DNA (45 µl de tampão de equilíbio; 5 µl de mix de nucleotídeos; 1 µl de TdT [deoxinucleotidil transferase terminal]). A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de EDTA a 20 mM. As células foram lavadas duas vezes com 200 µl Triton X-100 a 0,1% e BSA a 5 mg/ml diluído em PBS. Adicionou-se 500 µl de uma solução iodeto de propídeo 5 µg/ml contendo 250 ug of DNase-free RNase A e as células foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min ao abrigo da luz e, posteriormente, analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience) e os dados foram analisados através do software Flowing 2.5.1.

4.21 – Peroxidação lipídica

Os ácidos graxos presentes na membrana lipídica, após sofrerem danos oxidativos, geram o malondialdeído (MDA) que reage com 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo róseo cuja absorção máxima é a 532 nm. Portanto, após o tratamento com concentrações bactericidas de Ag-fendiona e Cu-fendiona, obteve-se o extrato celular (método descrito no item 4.9.1) e quantificou-se o MDA produzido pelo processo de peroxidação lipídica. Para isso,

misturou-se o extrato celular e a solução de detecção (TCA a 15%, TBA a 0,37% e HCl a 0,2 N) na proporção de 1:2 (vol:vol). Em seguida, incubou-se as amostras por 100°C por 15 min e resfriou-se a as amostras por 10 min à temperatura ambiente. Por fim, centrifugou-se as amostras a 1000×g por 10 min à temperatura ambiente e absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 532 nm. Para o branco utilizou-se todos os reagentes, exceto o extrato celular. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; nmol/g) foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 1.55 M^{-1} cm⁻¹ conforme a **equação 7**:

 $TBARS = \frac{ABS \ da \ amostra \times (Volume \ total \ da \ reação)}{1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1} \times (Volume \ de \ extrato \ celular)}$ (Eq.7)

Parte IV: Efeitos dos compostos derivados da fendiona na ultrastrutura e fisiologia de membrana de *P. aeruginosa*

4.22- Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a ultraestrutura bacteriana

A preparação bacteriana (cepa ATCC 27853, 10⁶ células) foi tratada com ½×CMI dos compostos por 24 h a 37°C. Células cultivadas na ausência dos compostos foram utilizadas como controle negativo. Em seguida, as células foram lavadas em tampão cacodilato a 0,1 M, fixadas por 12 h à temperatura ambiente no mesmo tampão contendo 4% de glutaraldeído, desidratadas com séries de incubação em etanol a 25, 50, 75 e 100%, secas pelo ponto crítico, revestidas com ouro-paládio e observadas em microscópio eletrônico de varredura (IRAZOQUI *et al.*, 2010). Este experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia (LTBM) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), sob supervisão do Dr. Sérgio Seabra e pelo técnico Diego de Souza Gonçalves.
4.23 - Desestabilização da membrana externa

As alterações na permeabilidade de membrana externa de *P. aeruginosa* foram avaliadas através da sensibilidade da célula bacteriana ao dodecil sulfato de sódio (SDS), um agente desestabilizador de membranas. Para isto, incubou-se os isolados de *P. aeruginosa* com concentrações referentes a concentrações bactericidas de Ag-fendiona e Cu-fendiona por 3 h. Após o tratamento, uma suspensão bacteriana ($DO_{600nm} = 0,4$) foi feita em tampão HEPES a 50 mM, pH 7,0, suplementado com 5 mM de glucose. Em seguida, acompanhou-se a densidade ótica da suspensão bacteriana durante 5 min, então, adicionou-se o detergente SDS na concentração final de 0,1%, e a lise bacteriana foi monitorada através da redução da absorbância em 600 nm durante 25 min adicionais (LOK *et al.*, 2006).

4.24 - Integridade da membrana plasmática bacteriana

A integridade de membrana plasmática bacteriana foi avaliada através da incorporação de iodeto de propídio. Para isto, suspensões correspondentes a 10^6 UFC foram incubadas na presença e ausência de concentrações referentes a 2×CMI dos derivados da fendiona por 3 h. Após o período de tratamento, as células bacterianas foram lavadas em tampão PBS e, então, incubados por 5 min com iodeto de propídio a 1 µg/ml. Por fim, analisou-se imediatamente a incorporação do fluoróforo em citômetro de fluxo (FACS Calibur BD, BD Bioscience), equipado com laser de argônio 15 mW com emissão a 488 nm. Células autoclavadas foram utilizadas como controle de células não viáveis. Os dados foram analisados através do software Flowing 2.5.1.

4.25 - Polarização de membrana plasmática bacteriana

O potencial da membrana plasmática de *P. aeruginosa* foi avaliado através do acúmulo da sonda iodeto de 3,3-dietiloxacarbocianina (DiOC₂(3)). Inicialmente, 5 ml de cultura bacteriana (10⁶ UFC/ml) foram incubadas em caldo LB na presença e na ausência de concentrações referentes a 2×CMI de cada um dos compostos estudados por 3 h a 37°C em agitação constante (150 rpm). Após o período de tratamento, as células foram lavas 3 vezes em PBS. Então, as amostras foram centrifugadas (4000×g, 10 min, 4°C), as células foram adicionadas de 500 µl da sonda DiOC₂(3) a 30 µM e incubadas à temperatura ambiente por 10 min. As fluorescências emitidas nas faixas do verde (FL1) e vermelho (FL3) foram avaliadas por citometria de fluxo (BD FACSAria, USA)

(NOVO *et al.*, 1999). O DiOC₂(3) é um corante catiônico e lipofílico que atravessa facilmente a membrana celular. O microrganismo com a membrana polarizada normalmente apresenta em sua interior carga negativa. Nestas condições o corante $DiOC_2(3)$, por afinidade eletrostática, forma agregado intracelulares alterando a emissão de fluorescência para o vermelho (NOVO *et al.*, 1999; SHAPIRO, 2000). Portanto, os resultados foram expressos como a razão da fluorescência verde (FL1) e vermelha (FL3).

Parte V: Efeitos dos compostos derivados da fendiona no metabolismo de P. aeruginosa

4.26 – Análise do perfil metabólico

As análises do perfil metabólico de *P. aeruginosa* foram realizadas sob a orientação do Dr. Jae Jin Lin e professor Dr. Hyunjing Eoh na University of Southern Califórnia (Los Angeles, CA, EUA).

Colônias isoladas de *P. aeruginosa* foram transferidas para o caldo LB e mantidas a 37°C em agitação a 150 rpm até que a cultura atingisse a DO_{600nm} = 1,0. Em seguida, aliquotou-se 10 ml desta cultura em tubos de 50 ml. As células foram lavas em PBS e, então, resuspendendidas em caldo LB suplementados com os compostos derivados da fendiona em concentrações referentes a 1×CMI e 5×CMI e incubadas a 37°C por 3 h. Além disso, com o objetivo de verificar se as alterações metabólicas induzidas por compostos derivados da fendiona estariam relacionados à formação de EROs, realizou-se o co-tratamento das culturas de *P. aeruginosa* com 5×CMI de Agfendiona e Cu-fendiona e tiourea a 100 mM ou NAC a 5 mM. Para o controle negativo, as células bacterianas foram incubadas na presença de DMSO na concentração final de 0,5%.

Após o período de tratamento, as células foram centrifugadas ($4000 \times g$, 10 min, 4°C) e lavadas com PBS. O metabolismo celular foi interrompido pela adição da solução de acetonitrila, metanol e água na proporção 40:40:20 (LC-MS grade, Merk Milipore, Massachusetts, EUA) previamente refrigerada a -80°C. Os metabólitos foram extraídos pela lise mecânica utilizando-se pérolas de zircônio de 0,1 mm de diâmetro no homogeneizador de tecidos Precellys (Bertin Technologies, França) por 8 min (6.800 rpm) duas vezes sob resfriamento contínuo a 2°C. Os lisados celulares foram clarificados através da centrifugação ($4000 \times g$, 10 min, 4°C) e filtrados

através de colunas Spin-X (0,22 µm - Corning, Nova York, EUA) (EOH *et al.*, 2013). O conteúdo proteico residual nos produtos da extração dos metabólitos foi quantificado para posterior normalização dos resultados pelo conteúdo proteico de cada amostra. Os metabólitos foram separados e detectados no Agilent Accurate Mass 6230 TOF acoplado ao Agilent 1290 Liquid Chromatography system utilizando-se Cogent Diamond Hydride Type C column (Microsolve Technologies, Long Branch, EUA). Os metabólitos foram identificados com base no tempo de retenção e no valor exato e único para cada uma das moléculas detectadas. Os metabólitos foram analisados utilizando o software Agilent Qualitative Analysis B.07.00 e o Profinder B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com uma tolerância de massa <0,005 Da. Os dados obtidos pela metabolômica foram expressos como a média de dois experimentos independes realizados em triplicata (EOH *et al.*, 2017). O heat map foi criado utilizando-se os softwares Cluster 3.0 e Java TreeView 1.0 (HOON *et al.*, 2004). Realizou-se a análise estatística multivariada dos perfis metabólicos globais das amostras expostas ao co-tratamento com antioxidantes através da análise de componentes principais (PCA) utilizando o software Metaboanalyst 3.0 (XIA *et al.*, 2015).

4.27 – Detecção da atividade de isocitrato desigrogenase

Após o tratamento de culturas de *P. aeruginosa* com os compostos derivados da fendiona (5×CMI), a atividade enzimática de isocitrato desidrogenase foi mensurada através do ensaio baseado na formação de NADPH (**Equação 8**) como previamente descrito por (KEYS & MCALISTER-HENN, 1990).

$$DL - isocitrato + NADP^{+} \leftrightarrow \alpha - cetoglutarato + CO_{2} + NADPH$$
(Eq. 8)

Em tampão glicilglicina a 250 mM (pH 7,4), adicionou-se 6,6 mM de ácido isocítrico, 20 mM de β -NADP⁺ e 18 mM de MgCl₂. A reação foi iniciada com a adição do extrato proteico. A formação do produto foi determinada a 340 nm. A atividade de isocitrato desidrogenase foi

definida pela **equação 9**. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a formação de 1 µmol de NADPH por min sob as condições do experimento.

Atividade isocitrato desidrogenase = $\frac{\Delta ABS_{340nm}/_{min} \times (volume \text{ total de reação})}{6.22 \text{ } mM^{-1}cm^{-1} \times (volume \text{ de extrato celular})}$ (Eq. 9)

4.28- Detecção da atividade de malato desidrogenase

Inicialmente, culturas de *P. aerugiosa* (10^6 UFC/ml) foram incubadas na presença de 5×CMI de Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 1 h a 37°C. Após o perido de incubação, os extratos celulares foram obtidos e, então, quantificou-se a atividade da enzima malato desidrogenase (**Equação 10**).

 $Oxaloacetato + NADH \leftrightarrow L - malato + NAD^+$ (Eq. 10)

Em tampão fosfato de sódio (100 mM), adicionou-se 0,14 mM de β -NADH e 7,6 mM de ácido oxaloacético. A reação foi iniciada com a adição do extrato proteico. A atividade da enzima malato desidrogenase foi mensurada através da taxa de consumo de NADH detectada a 340 nm, utilizando-se cubeta de quartzo (caminho ótico = 1 cm). A atividade de malato desidrogenase foi definida pela **equação 11**. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a conversão de 1 µmol de oxaloacetato e NADH aos produtos L-malato e NAD⁺ por min por µg de proteína.

Atividade malato desidrogenase = $\frac{\Delta ABS_{340nm}/_{min} \times (volume \ total \ de \ reação)}{6.22 \ mM^{-1}cm^{-1} \times (volume \ de \ extrato \ celular)}$ (Eq. 11)

4.29 – Detecção da atividade de NADH: ubiquinona oxiredutase

Culturas de *P. aerugiosa* (10⁶ UFC/ml) foram submetidas ao tratamento com 5×CMI de Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 1 h a 37°C. Após o período de tratamento, quantificou-se a atividade da enzima NADH:ubiquinona oxiredutase. Resumidamente, adicionou-se os extratos celulares ao tampão de ensaio de atividade enzimática (100 mM tampão fosfato de sódio, BSA a 0,35%, NADH a 200 μ M, KCN a 240 μ M, 2,6-dicloroindofenol sódico salitrato de sódio (DCIP) a 60 μ M, decilubiquinona a 70 μ M e antimicina A a 25 μ M). A atividade do NADH:ubiquinona oxiredutase foi definida pela **equação 12** (RANA *et al.*, 2013).

 $Atividade NADH: ubiquinona oxiredutase = \frac{\Delta ABS_{600nm}}{21 \, mM^{-1} cm^{-1} \times (volume \ total \ de \ reação)}$

(Eq. 12)

4.30- Avaliação da proporção NAD+/NADH

A extração e quantificação de NAD⁺ e NADH foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por WHELAN e colaboradores (2007). Após o período de tratamento, 1 ml de cultura foi transferido para dois microtubos distintos: um para a extração de NAD⁺ e outro para a extração de NADH. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Para a extração de NAD⁺, as células foram ressuspendidas em 300 µl de HCl a 0,2M enquanto para a extração de NADH as células foram ressuspendidas em 300 µl de NaOH a 0,2 M. Ambos os sistemas foram incubados a 50°C em banho maria por 10 min e, então, resfriados em gelo por 5 min. Posteriormente, em agitação branda adicionou-se 300 µl de NaOH a 0,1 M (para extração de NAD⁺) ou 300 µl de HCl a 0,1 M (para extração de NADH). Por fim, os tubos foram centrifugados para retirada de debris celulares, os produtos de extração do par NAD⁺/NADH foi preparada de acordo com a seguinte proporção: 1 volume de Tris-HCl a 1 M (pH 8,0), 1 volume de etanol a 100%, 1 volume de EDTA a 40 mM, 1 volume de MTT a 4,2 mM, 2 volumes de fenazina etosulfato (PES) a 16,6 mM e 3 volumes de água. Em placas de 96 poços, foram adicionados 5 µl do produto de extração, 90 µl da mistura reacional e 5 µl da enzima álcool desidrogenase II a 1 mg/ml (Sigma-

Aldrich). Por fim, registrou-se a absorbância a 570 nm durante 30 min em intervalos de 30 seg (WHELAN *et al.*, 2007).

4.31- Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados três vezes em triplicatas biológicas. Os dados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), pós-teste de Dunnett, com o intuito de comparar o controle (não tratado) com as amostras tratadas com os compostos. Para a comparação dos grupos tratados e co-tratados com antioxidante realizou-se a o teste *t* de Student não pareado bicaudal. Para todos os testes, o grau de significância estatística considerado foi de 95% (*p*<0,05). O programa utilizado para análise foi o Graphpad Prism 6.

5- RESULTADOS

Parte I: Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a LasB de P. aeruginosa

A terapia anti-virulência é uma promissora alternativa para o tratamento de infecções persistentes. Esta abordagem terapêutica visa reduzir a patogênese, sem necessariamente afetar o crescimento microbiano (LEE *et al.*, 2009). Deste modo, ao inibir a expressão/atividade destes fatores de virulência, o microrganismo se torna menos hábil no estabelecimento do processo infeccioso (RASKO & SPARANDIO, 2010). A enzima LasB de *P. aeruginosa* regula múltiplos eventos fisiopatológicos, sendo essencial para o sucesso do estabelecimento do processo infeccioso no hospedeiro. Portanto, diante da importância deste fator de virulência, investigou-se a ação dos compostos derivados de fendiona sobre a atividade elastinolítica produzida por *P. aeruginosa*. Ressalta-se, ainda, que os compostos estudados no presente estudo são derivados da 1,10-fenantrolina, um conhecido inibidor de metalopeptidases, incluindo a LasB de *P. aeruginosa* (GALDINO *et al.*, 2017).

5.1- Análise *in silico* da interação entre compostos derivados da fendiona e o sítio ativo da enzima LasB

As possíveis interações entre os compostos derivados da fendiona e o sítio ativo da LasB de *P. aeruginosa* foram investigadas utilizando-se métodos de "*docking*" molecular. A sobreposição dos compostos derivados da fendiona ao inibidor HPI (previamente descrito como um ligante do sítio ativo de LasB) revelou que Ag-fendiona e Cu-fendiona se ancoraram ao ligante HPI através de interações do tipo empilhamento π entre os anéis aromáticos (**Figuras 14A, 14C** e **14E**). Por definição, o empilhamento π é um fenômeno físico, que ocorre devido à polarização das nuvens eletrônicas entre anéis aromáticos (HOBZA, 2008). Além disso, o composto Cu-fendiona apresentou a melhor energia de interação (-127,54 kcal mol⁻¹), seguido de fendiona (-40,47 kcal mol⁻¹) e Ag-fendiona (-34,26 kcal mol⁻¹) (**Tabela 3**). Corroborando esses resultados, foi observado que Cu-fendiona foi capaz de formar duas pontes de hidrogênio com resíduos de aminoácidos, a saber Arg₁₉₈ e Asn₁₁₂, localizados no sítio catalítico, além de formar outras duas pontes de hidrogênio com moléculas de água (**Figura 14F**). Já a Ag-fendiona interagiu com o sítio catalítico de LasB pela formação de uma ponte de hidrogênio com Ala₁₁₃ e três moléculas de água, enquanto

fendiona formou apenas duas pontes de hidrogênio (com Arg₁₉₈ e uma molécula de água) (**Figuras** 14C, 14D e Tabela 3).

Complementarmente, cálculos semi-empíricos foram realizados em nível de PM6 para obter valores mais precisos de energia de interação entre os compostos derivados da fendiona e resíduos de aminoácidos no sítio ativo de LasB. O método PM6 se baseia na utilização de parâmetros oriundos de análises experimentais previamente calculados para a resolver equação de Schrodinger, que descreve como o estado quântico de um sistema molecular se comporta em relação ao tempo, estimando de maneira exata a energia de interação entre proteína e ligante (MORGON & COUTINHO, 2007). Confirmando os dados obtidos pelo *docking* molecular, Cu-fendiona apresentou a energia de interação mais favorável (0 kcal mol⁻¹), seguido de Ag-fendiona (2.690 kcal mol⁻¹) e fendiona (4.179 kcal mol⁻¹) (**Tabela 3**).

	Molegro Vi	rtual Docker	Semi-empírico – PM6	
Compostos	Energia de interação (kcal mol ⁻¹) Pontes de hidrogênio		Energia de interação (kcal mol ⁻¹)	
fendiona	- 40.47	1 Arg ₁₉₈ 1 H ₂ O	4.179	
Ag-fendiona	- 34.26	1 Ala ₁₁₃ 3 H ₂ O	2.690	
Cu-fendiona	- 127.54	1 Arg ₁₉₈ 1 Asn ₁₁₂ 2 H ₂ O	0.000	

Tabela 3 - Energias de interação entre os compostos derivados da fendiona e o sítio ativo da LasB de *P. aeruginosa*.



Figura 13 – Interações moleculares entre o sítio ativo de LasB de *P. aeruginosa* **e os compostos derivados da fendiona.** Análises *in silico* foram realizadas utilizando-se o programa Molegro Virtual Docker. O ancoramento do ligante fendiona (A) e de seus derivados metálicos Ag-fendiona (C) e Cu-fendina (E) sobre o ligante ativo da LasB foi ilustrado no modelo de bola e palito. O composto Cu-fendiona apresenta maior similaridade estrutural com o ligante ativo de LasB, favorecendo assim sua interação com o sítio ativo da enzima. As pontes de hidrogênio formada entre elastase e fendiona (B), Ag-fendiona (D) e Cu-fendiona (F) foram evidencias pelas linhas azuis pontilhadas.

5.2- Efeitos dos compostos à base de fendiona na atividade in vitro de LasB

Após observar as interações moleculares entre os derivados de fendiona e o sítio catalítico de LasB, investigou-se a possível atividade inibitória destes compostos sobre a atividade elastinolítica. Assim como observado nos ensaios de *docking* molecular, Cu-fendiona apresentou a atividade inibitória mais potente sobre a LasB purificada; portanto, exibindo a menor constante de inibição ($K_i = 0,09 \ \mu$ M), seguida por Ag-fendiona ($K_i = 0,31 \ \mu$ M) e fendiona ($K_i = 0,38 \ \mu$ M) (**Figura 15**). Isoladamente, os sais, CuSO₄.5H₂O e AgNO₃, não alteraram significativamente a atividade elastinolítica (**Figura 15A**).

Sabendo-se que a LasB é secretada fisiologicamente por *P. aeruginosa* durante o crescimento planctônico e durante a formação de biofilme (JOHNSON *et al.*, 1967; HOYLE *et al.*, 1993; GALDINO *et al.*, 2017; AZAM & KHAN, 2018), avaliou-se o efeito dos compostos derivados da fendiona sobre a atividade elastinolítica presente nos sobrenadantes de cultivo planctônico, obtidos das cepas ATCC 27853 e 09HC, bem como do sobrenadante de cultivo do biofilme produzido pela cepa ATCC 27853. Cu-fendiona foi o composto mais eficiente na inibição da atividade elastinolítica presente no cultivo planctônico (**Figuras 15B** e **15C**) e em biofilme de *P. aeruginosa* (**Figura 15D**). Como exemplo, observou-se que Cu-fendiona a 10 mM inibiu, respectivamente, 95,18% e 93,44% da atividade elastinolítica proveniente do cultivo planctônico de ATCC 27853 e 09HC (**Figuras 15B** e **15C**). Além disso, Cu-fendiona foi capaz de inibir 89,03% da atividade elastinolítica secretada por células de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) durante o crescimento na forma de biofilme (**Figura 15D**).



Figura 14 – Efeitos dos compostos derivados da fendiona na atividade enzimática de LasB produzida por *P. aeruginosa.* LasB purificada (A), sobrenadante de cultivo planctônico da cepa ATCC 27853 (B) e 09HC, bem como sobrenadante obtido do cultivo em biofilme (D), foram tratados por 30 min na presença e na ausência de compostos derivados da fendiona em diferentes concentrações (0,01, 0,1, 0,5, 1, e 2 mM para a LasB purificada ou 1, 2,5, 5 e 10 mM para os sobrenadantes ricos em LasB). A atividade elastinolítica foi mensurada utilizando-se o substrato fluorogênico específico para a elastase de *P. aeruginosa* Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-pNA. Uma unidade de elastase corresponde à quantidade de enzima capaz de converter 1 ng de substrato fluorogênico por min por mg de proteína (CATCHCART *et al.*, 2011).

5.3- Efeitos dos compostos derivados de fendiona na expressão do gene *lasB* e na produção/secreção da enzima LasB

Avaliamos também se os compostos seriam capazes de inibir a expressão do gene *lasB*, bem como a síntese e secreção da enzima LasB madura. Para tal, as células foram incubadas por 24 h na presença e na ausência de concentrações sub-inibitórias dos compostos testes (concentrações referentes a ¹/₂×CMI). Em seguida, avaliou-se a expressão gênica de *lasB* através de RT-PCR bem como a produção/secreção do produto proteico maduro (LasB) por Western blot. Os resultados evidenciaram que tanto o ligante fendiona quanto seus derivados, Ag-fendiona e Cufendiona, foram capazes de modular negativamente a expressão do gene *lasB*. A expressão de *lasB* em células tratadas com os derivados da fendiona foi aproximadamente 50% menor quando comparada ao controle de células não tratadas (**Figura 16A**). Nesse conjunto de experiementos, selecionou-se o gene *rpoD* como controle interno, uma vez que este gene é constitutivamente expresso em *P. aeruginosa* e sua transcrição se mantem estável mesmo sob estresse osmótico e oxidativo (SAVLI *et al.,* 2003; MCMILLAN & PEREG, 2014). Os compostos derivados da fendiona não foram capazes de alterar os níveis do gene *rpoD* (**Figura 16 C**).

Em paralelo, observou-se que a quantidade da proteína LasB presente no sobrenadante planctônico foi significativamente reduzida após tratamento com uma concentração sub-inibitória dos compostos (valor correspondente a ½×CMI). Fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona inibiram a secreção de LasB em 14,70%, 41,14% e 71,43%, respectivamente (**Figura 16B**). Por sua vez, não foram observadas alterações significativas nos níveis de GAPDH encontrados no sobrenadante de *P. aeruginosa* após o tratamento com concentrações sub-inibitórias dos compostos derivados da fendiona (**Figura 16B**).



Figura 15 – Efeitos dos compostos derivados da fendiona na expressão do gene *lasB* e na produção da enzima LasB madura em *P. aeruginosa*. Inicialmente, 10⁶ células de *P. aeruginosa* foram incubadas na presença de $\frac{1}{2} \times CMI$ com os compostos derivados da fendiona. Após o período de tratamento, a expressão de *lasB* (A) e *rpoD* (C) através de RT-PCR e a produção/secreção de elatase B foi detectada utilizando o anticorpo anti-LasB de *P. aeruginosa* (B). A linha pontilhada cinza em (A) representa o nível de expressão de *lasB* nos sistemas não tratados. **p* < 0,05; Análise de variância One-way ANOVA (Dunnet's multiple comparison test) em relação ao sistema controle.

5.4- Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a indução de danos celulares (células epiteliais pulmonares A549) causados por LasB

LasB desempenha um importante papel no processo de invasão tecidual durante a infecção de *P. aeruginosa*. A atividade enzimática de LasB promove a desorganização das camadas epiteliais pela degradação de componentes extracelulares (exemplos: colágenos tipo III e IV, laminina, fibronectina e vitronectina) e junções intercelulares (exemplos: ocludina, claudina-1 e -

4, e tricelulina) (BEAUFORT *et al.*, 2013; NOMURA *et al.*, 2014; REBOUD *et al.*, 2016). Assim, hipoteticamente, a inibição da atividade elastinolítica pelos compostos derivados da fendiona resultaria na atenuação dos danos celulares induzidos pela ação de LasB. Com isto em mente, foi observado que o tratamento da monocamada de A549 com o sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* e com a LasB purificada levou à desarticulação da monocamada e alterações morfológicas (**Figura 17C**). Em paralelo, na presença de sobrenadante de cultura e de LasB purificada, a viabilidade de A549 reduziu 37,03% e 14,38%, respectivamente, em relação às células não tratadas (**Figuras 17A** e **17B**). Em contraste, a co-incubação do sobrenadante de cultivo com os compostos derivados da fendiona (25 μ M) foi capaz de proteger as células epiteliais dos efeitos citotóxicos relacionados à LasB, mantendo a morfologia celular e a confluência da monocamada (**Figura 17C**). A viabilidade da A549 foi parcialmente restaurada nos sistemas tradados com sobrenadante neutralizados com Ag-fendiona e Cu-fendiona (**Figura 17B**). Da mesma maneira, o tratamento da LasB purificada com fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona atenuou os danos celulares causados por esta enzima, restaurando a viabilidade em 28%, 39% e 80%, respectivamente, em comparação com as células A549 tratadas com LasB (**Figura 17A**).



Figura 16 – Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre danos celulares causados por LasB de *P. aeruginosa.* O sobrenadante de cultivo (A) bem como a LasB purificada (B) foram previamente incubados com os compostos de coordenação por 1 h. Em seguida, as células pulmonares A549 foram incubadas por 48 h na presença do sobrenadante de cultura de *P. aeruginosa* (100 μ g de proteína) ou da LasB purificada (10 μ g de proteína). Após o período de incubação, a viabilidade celular foi analisada através da redução do sal de MTT (A e B) e a integridade da monocamada e morfologia celular foram observadas através de microscopia de campo-claro (C). Os compostos derivados da fendiona, em especial Cu-fendiona, foram capazes de neutralizar os efeitos tóxicos de LasB sobre as células A549.*P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett s multiple comparison test, comparado com o sistema controle). $\blacklozenge P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett s multiple comparison test, comparado com o sistema tratado apenas com o sobrenadante ou LasB).$

5.5- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB em larvas de *G. mellonella*

Os resultados in silico e in vitro indicaram a ação inibitória de compostos derivados da fendiona sobre a atividade de LasB. Com isso em mente, investigou-se a eficácia de Cu-fendiona (o inibidor de LasB mais potente) na atenuação da toxicidade do sobrenadante de *P. aeruginosa* no modelo de infecção in vivo, utilizando-se larvas do inseto G. mellonella. Inicialmente, comparou-se o perfil de toxicidade do sobrenadante (100 µg) a partir do cultivo da cepa padrão ATCC 27853 e do isolado clínico 09HC. Comparativamente, o sobrenadante da cepa 09HC apresentou-se menos tóxico quando comparado ao sobrenadante da cepa ATCC 27853. Nesse sentido, observou-se que todas as larvas inoculadas com o sobrenadante da cepa ATCC 27853 morreram após 24 h de desafio, enquanto a inoculação do sobrenadante da cepa 09HC induziu a morte de 70% das larvas neste mesmo período de tempo (Figura 18A). Corroborando este resultado, observou-se que a produção de LasB na cepa ATCC 27853 foi 1,4 vezes maior em relação a cepa 09 HC (Figura 18 B). Além disso, os efeitos tóxicos do sobrenadante de P. aeruginosa em larvas de G. mellonela foram atribuídos, pelo menos em parte, aos danos induzidos por LasB, uma vez que o sobrenadante submetido à inativação térmica não foi tão tóxico quanto o sobrenadante não aquecido e rico em LasB, diminuindo apenas 30% a taxa de sobrevivência das larvas (Figura 18A).

Como o sobrenadante da cepa ATCC 27853 foi mais tóxico para as larvas de *G. mellonella*, esta amostra foi selecionada para analisar os efeitos inibitórios de Cu-fendiona. Para tal, diferentes concentrações (1, 10 e 100 µg de proteína) do sobrenadante da cepa ATCC 27853 foram previamente tratadas com 50 µM Cu-fendiona por 30 min. Posteriormente, os sobrenadantes foram injetados nas larvas e a taxa de sobrevivência foi monitorada por 7 dias. Os resultados revelaram que o sobrenadante obtido do crescimento planctônico de *P. aeruginosa* foi tóxico para as larvas de *G. mellonella* de maneira concentração-dependente. Em contraste, Cu-fendiona foi capaz de mitigar os efeitos tóxicos do sobrenadante rico em LasB em todas as concentrações investigadas (1, 10 e 100 µg). Após o sétimo dia de inoculação, observou-se a morte de 40% das larvas que foram inoculadas com o sobrenadante da cepa ATCC 27853 (10 µg de proteína). Em contraste, o tratamento do sobrenadante rico em LasB com 50 µM Cu-fendiona recuperou a taxa de sobrevivência das larvas para 90% (**Figura 18C**). Por fim, a enzima LasB purificada levou a morte de 100% larvas após 24 h de desafio. Por sua vez, o pré-tratamento de LasB com Cu-fendiona

exerceu um efeito protetor contra a ação tóxica desta enzima, tendo sido observado a sobrevivência de 55% das larvas inoculadas com LasB neutralizada (**Figura 18 D**).



Figura 17 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na toxicidade induzida por LasB em larvas de *G. mellonella.* Inicialmente, comparou-se o perfil de virulência de sobrenadantes obtidos do cultivo das cepas ATCC 27853 e 09HC em larvas do inseto *G. mellonella* (A). Para isto, grupos de 10 larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com o sobrenadante obtido do cultivo planctônico das cepas ATCC 27853 e 09HC (100 µg de proteína). A presença de LasB no sobrenadante de *P. aeruginosa* foi confirmada através de zimografia em SDS-PAGE utilizando-se gelatina como substrato proteico e quantificação da atividade utilizando-se substrato fluorogênico Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-pNA (B). Em seguida, avaliou-se os efeitos de Cu-fendiona no perfil de toxicidade induzido sobrenadante de cultivo planctônico da cepa ATCC 27853 (1, 10 e 100 µg de proteína) e 1 µg de LasB purificada foram previamente tratadas com 50 µM de Cu-fendiona por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante e LasB neutralizados foram inoculados nas larvas de *G. mellonella* e as taxas de sobrevivência foram acompanhadas por 7 dias. A morte das larvas foi determinada pela falta de movimento em resposta ao estímulo, juntamente com a pigmentação acinzentada da cutícula. Os dados de sobrevivência foram plotados usando o método de Kaplan-Meier.

Parte II: Efeitos dos compostos derivados da fendiona no crescimento de P. aeruginosa

5.5- Avaliação do efeito antimicrobiano em diferentes meios de cultivo

Em um trabalho prévio de nosso grupo foi reportado a atividade anti-*P. aeruginosa* de derivados metálicos da fendiona, utilizando-se o caldo MH (VIGANOR *et al.*, 2016). A fim de confirmar a atividade antibacteriana dos compostos estudados, comparou-se a CMI dos compostos derivados da fendiona utilizando-se a cepa padrão ATCC 27853 em diferentes meios de cultivo. As bactérias cultivadas em caldo MH e LB, ambos meios lisogênicos, apresentaram CMI similares. Apesar de serem amplamente utilizados nos protocolos laboratoriais, MHB e LB não mimetizam as condições físico-químicas do hospedeiro, tampouco induzem variações fenotípicas e genéticas, que são imprescindíveis para o processo adaptativo a condições ambientais estressoras (SCHICKA & KASSENA, 2018). Portanto, com o objetivo de verificar se o potencial antimicrobiano destes compostos seria replicável em um sistema de infecção humana, avaliou-se o efeito de Ag-fendiona e Cu-fendiona, no crescimento de *P. aeruginosa* em caldo SCFM, que mimetiza o ambiente pulmonar de paciente portador de fibrose cística (PALMER *et al.*, 2007). Comparativamente, verificou-se que as CMIs de fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona para a cepa ATCC 27853 foram aproximadamente 2 vezes menores no meio SCFM quando comparadas aos meios MHB e LB, enquanto as CMIs dos sais AgNO₃ e CuSO₄ foram similares nos 3 meios de cultivo (**Tabela 4**).

Compostos	CMI _{MHB} µg/ml (µM) *	CMI _{LB} µg/ml (µM)	CMIscfm µg/ml (µM)
Fendiona	6,25 (29,7)	6,73 (32)	1,93 (16)
Ag-fendiona	9,60 (15,3)	10,04 (16)	5,02 (8)
Cu-fendiona	7,22 (7,5)	7,70 (8)	3,85 (4)
AgNO ₃	10,61 (62,5)	5,43 (32)	5,43 (32)
CuSO ₄	>39,90 (>250)	>39,90 (>250)	>39,90 (>250)

Tabela 4 – CMIs dos compostos derivados da fendiona no crescimento planctônico de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) em diferentes meios de cultivo.

CMI - Concentração minima inibitória

*, CMI determinado por Viganor e colaboradores (2016).

Tendo verificado que ambos Ag-fendiona e Cu-fendiona foram eficientes na inibição do crescimento planctônico de *P. aeruginosa* em diferentes meios de cultivo, os experimentos seguintes foram realizados em caldo LB devido ao seu fácil protocolo de preparo e alta reprodutibilidade dos resultados.

5.6- Avaliação dos efeitos antimicrobianos em diferentes cepas clínicas

A alta variabilidade genética de isolados clínicos de *P. aeruginosa,* associada à crescente preocupação com cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos, torna primordial a confirmação do efeito antimicrobiano de uma nova molécula sobre diferentes isolados clínicos, preferencialmente, com perfis de resistência distintos. Para isso, determinou-se a CMI e CMB de Ag-fendiona e Cu-fendiona para 6 amostras de *P. aeruginosa* (1 amostra padrão susceptível aos antimicrobianos clássicos – ATCC 27853 – e outros 5 isolados clínicos resistentes aos principais antimicrobianos utilizados atualmente no tratamento anti-*P. aeruginosa*, a saber: imipenem, meropenem e ceftazidima). Os isolados clínicos apresentaram valores de CMI e CMB iguais ou inferiores à cepa padrão ATCC 27853; exceto à cepa 22U, em que os valores de CMI para Ag-fendiona e Cu-fendiona foram duas vezes maiores em relação à cepa ATCC 27853 (**Tabela 5**).

Tabela 5 – CMIs e CMBs dos compostos derivados da fendiona no crescimento planctônico de isolados clínicos *P. aeruginosa* com perfil de resistência a antimicrobianos clássicos.

Isolado clínico	CMI µg/ml (µM)		CMB μg/ml (μM)		
	Ag-fendiona	Cu-fendiona	Ag-fendiona	Cu-fendiona	
ATCC 27853	10,04 (16)	7,70 (8)	20,08 (32)	30,80 (32)	
09 HC	2,51 (4)	3,85 (4)	10,04 (16)	15,40 (16)	
160 T	10,04 (16)	1,92 (2)	20,08 (32)	7,70 (8)	
22 U	10,04 (16)	7,70 (8)	40,16 (64)	61,60 (64)	
186 FC	5,02 (8)	3,85 (4)	10,04 (16)	15,40 (16)	
126 T	2,51 (4)	7,70 (8)	5,02 (8)	7,70 (8)	

CMI – Concentração mínima inibitória

CMB - Concentração mínima bactericida

5.7- Curva tempo-morte dos compostos derivados de fendiona em P. aeruginosa

A cinética de crescimento planctônico na presença de concentrações referentes a $\frac{1}{2} \times CMI$, 1×CMI e 2×CMI de fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona foi registrada com o objetivo de avaliar o tempo de ação dos compostos, bem como determinar se os mesmos exercem ação bactericida ou bacteriostática em *P. aeruginosa*. O efeito bacteriostático foi observado após 24 h na presença de 2×CMI de fendiona, tendo sido observado a redução de 1,15×log do crescimento bacteriano em relação ao controle. Por sua vez, o composto Cu-fendiona apresentou ação bactericida, sendo capaz de reduzir o crescimento bacteriano em 3,1×log após 3 h de tratamento na concentração de 2×CMI. Por fim, o efeito bactericida mais eficiente foi obtido com o composto Ag-fendiona, que diminuiu 4,6×log na concentração de 1×CMI após 3 h de tratamento (**Figura 19**).

Paralelamente, avaliou-se a curva tempo-morte da ATCC 27853 e 5 isolados clínicos na presença de concentração referentes à CMB de cada uma das amostras (descrito no item 5.1.2, **Tabela 2**). Para este ensaio, foram utilizados apenas os derivados metálicos da fendiona (Ag-fendiona e Cu-fendiona), uma vez que, isoladamente, o ligante (fendiona) e os sais (AgNO₃ e CuSO₄) não apresentaram efeito bactericida.

Conforme observado para a cepa padrão ATCC 27853, Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram ação bactericida em relação a maioria dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Os compostos derivados da fendiona foram capazes de matar aproximadamente 90% das células nas primeiras 6 h de tratamento com concentrações referentes à CMB em quatro das cinco (80%) cepas clínicas testadas (**Figura 20**). Entretanto, Ag-fendiona e Cu-fendiona não apresentaram ação bactericida para a cepa 126T, uma vez que reduziram o crescimento em 2,56×log₁₀ e 2,88×log₁₀, respectivamente (**Figura 20**F).



Figura 18 – Curva tempo-morte dos compostos derivados de fendiona em *P. aeruginosa.* 10⁶ células da cepa ATCC 27853 foram tratadas com concentrações referentes a $0.5 \times CMI$, $1 \times CMI$ e $2 \times CMI$ de fendiona (A), Ag-fendiona (B), Cu-fendiona (C) e dos sais AgNO₃ (D) e CuSO₄ (E) durante 24 h a 37°C. Após tempos fixos de 0, 1, 3, 6 e 24 h, 10 µl de cada um dos sistemas foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Considerou-se efeito bactericida o tratamento que induziu redução de $\geq 3 \times \log$ do crescimento bacteriano em relação ao controle (LORRIAN *et al.*, 2005).



Figura 19 – Curva tempo-morte dos compostos derivados da fendiona em cepas clínicas de *P. aeruginosa.* 10^6 células de cepas clínicas resistentes à imipenem, meropenem e ceftazidima foram tratadas com suas respectivas concentrações mínima bactericida (MBC) de Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 24 h a 37°C. Após tempos fixos de 0, 1, 3, 6, 12 e 24 h, 10 µl de cada um dos sistemas foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Considerou-se efeito bactericida o tratamento que induziu redução de $\ge 3 \times \log$ do crescimento bacteriano em relação ao controle (LORRIAN *et al.*, 2005).

5.8 – Efeitos da combinação de compostos derivados da fendiona e ceftazidima sobre o crescimento planctônico de *P. aeruginosa*

Para analisar possíveis efeitos da combinação entre os compostos derivados da fendiona e a ceftazdima foi utilizado o método de *checkerboard*. Neste teste, os compostos nas concentrações de ¹/₈×CMI a 8×CMI, dispostos em colunas, e a ceftazdima nas concentrações de ¹/₄×CMI a 4×CMI, dispostos em fileiras, foram combinados e inoculados separadamente com a cepa padrão ATCC 27853 e outros cinco isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Após 24 h a 37°C, o crescimento bacteriano foi analisado através do cálculo do FIC index (índice de concentração inibitória fracionada – ICIF). Nossos resultados revelaram que a combinação entre Ag-fendiona e ceftazidima foi sinérgica para as cepas 160T, 22U e 186FC. Além disto, essa combinação foi aditiva para as cepas ATCC 27853, 09HC e 126T. Já a combinação entre Cu-fendiona e ceftazidima apresentou efeito sinérgico para a cepa 160T e aditiva para os demais isolados utilizados no presente estudo (**Tabela 6**).

Em seguida, realizou-se a curva tempo-morte de *P. aeruginosa* em resposta ao tratamento com a combinação entre compostos derivados da fendiona e ceftazidima. Em tempos fixos de 0, 1, 3, 6, 9 e 24 h, 10 µl de cada combinação das respectivas amostras foram plaqueadas em MHA. A combinação de Ag-fendiona e ceftazidima, ambos em concentrações sub-inibitórias, apresentaram efeito sinérgico para todas as cepas; exceto para cepa 22U, que o resultado foi FIC de indiferença (**Figura 21**). Da mesma maneira, a associação entre Cu-fendiona e ceftazidima resultou na potencialização do efeito bactericida da combinação quanto comparado aos efeitos das drogas isoladamente. Para todas as amostras utilizadas neste experimento, o tratamento com a Cu-fendiona e ceftazidima isoladamente não resultou em efeito bactericida. Por outro lado, a combinação destas duas drogas levou à redução de mais de 3×log UFC/ml em relação ao controle (**Figura 21**).

Tabela 6 – Valores de FIC index das combinações de derivados da fendiona e ceftazidima sobre o crescimento de *P. aeruginosa.*

		Ceftazidima × Ag-fendiona		Ceftazidima × Cu-fendiona			
Isolados		CMI	CMI combinação	FIC index (Efeito)	CMI	CMI combinação	FIC index (Efeito)
ATCC 27853	CAZ	8	4 (½×CMI)	1	8	4 (½×CMI)	1
	Ag-/ Cu-fendiona	8	4 (½×CMI)	(Aditivo)	32	16 (½×CMI)	(Aditivo)
09HC	CAZ	16	8 (½×CMI)	1	16	8 (½×CMI)	1
	Ag-/ Cu-fendiona	16	8 (½×CMI)	(Aditivo)	32	16 (½×CMI)	(Aditivo)
160T	CAZ	32	8 (¼×CMI)	0,375	32	8 (¼×CMI)	0,375
	Ag-/ Cu-fendiona	16	2 (¼× <i>CMI</i>)	(Sinérgico)	32	4 (½× <i>CMI</i>)	(Sinérgico)
22U	CAZ	64	16 (¼×CMI)	0,5	64	32 (½×CMI)	0,625
	Ag-/ Cu-fendiona	16	2 (¼×CMI)	(Sinérgico)	16	4 (½× <i>CMI</i>)	(Aditivo)
186FC	CAZ	512	128 (¼×CMI)	0,5	512	128 (¼×CMI)	0,625
	Ag-/ Cu-fendiona	16	4 (¼×CMI)	(Sinérgico)	16	16 (½×CMI)	(Aditivo)
126T	CAZ	512	256 (¼×CMI)	1	512	256 (½×CMI)	1
	Ag-/ Cu-fendiona	4	2 (¼×CMI)	(Aditivo)	8	4 (½×CMI)	(Aditivo)

O FIC index foi obtido a partir da soma do FIC A (CMI do antimicrobiano A em combinação / CMI do antimicrobiano A sozinho) com o FIC B (CMI do antimicrobiano B em combinação / CMI do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um FIC index \leq 0,5; aditividade (Ad) foi definida como FIC index \geq 5 a < 2,0; indiferença (Id) foi definida como FIC index \geq 2,0 a < 4 e antagonismo (At) foi definido como FIC index \geq 4,0.



Figura 20 – Curva tempo-morte da combinação de Ag-fendiona e ceftazidima em cepas clínicas de *P. aeruginosa.* 10⁶ células de cepas clínicas resistentes à imipenem, meropenem e ceftazidima foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de Ag-fendiona e ceftazidima isolados e em combinação durante 24 h a 37°C. Após tempos fixos de 0, 1, 3, 6, 8 e 24 h, 10 µl de cada um dos sistemas foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Considerou-se efeito bactericida o tratamento que induziu redução de $\ge 3 \times \log_{10}$ do crescimento bacteriano em relação ao controle (LORRIAN *et al.*, 2005).



Figura 21 – Curva tempo-morte da combinação de Cu-fendiona e ceftazidima em cepas clínicas de *P. aeruginosa.* 10⁶ células de cepas clínicas resistentes à imipenem, meropenem e ceftazidima foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de Cu-fendiona e ceftazidima isolados e em combinação durante 24 h a 37°C. Após tempos fixos de 0, 1, 3, 6, 8 e 24 h, 10 µl de cada um dos sistemas foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Considerou-se efeito bactericida o tratamento que induziu redução de $\ge 3 \times \log_{10}$ do crescimento bacteriano em relação ao controle (LORRIAN *et al.*, 2005).

Parte III: Efeitos dos compostos derivados da fendiona na homeostase redox de P. aeruginosa

5.9 – Efeitos de antioxidante na tolerância bacteriana aos compostos derivados da fendiona

As EROs, como o superóxido e os radicais hidroxilas, são descritas como espécies químicas altamente tóxicas, que podem ter inúmeros efeitos deletérios à fisiologia bacteriana, culminando com a morte celular (ALBESA *et al.*, 2004). Com o objetivo de investigar se a formação de EROs estaria relacionada à atividade bactericida de compostos derivados da fendiona, realizou-se o co-tratamento com o antioxidante NAC.

Conforme descrito anteriormente, Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram ação bactericida após de 3 h de tratamento. Em contraste, a adição de NAC (5 mM) foi capaz de reverter os efeitos tóxicos dos compostos derivados da fendiona (**Figuras 23B, 23C e 23D**). Após 6 h de tratamento, verificou-se que as culturas tratadas com NAC em combinação com Ag-fendiona e Cu-fendiona exibiram, respectivamente, um aumento de 1×log e 2×log na sobrevivência em relação ao tratamento com os derivados da fendiona isoladamente (**Figuras 23B, 23C e 23D**). NAC, *per se*, não afetou o crescimento de *P. aeruginosa*. Não foram observadas diferenças nas curvas de crescimento das células tratadas com o ligante fendiona e NAC (**Figuras 23A e 22D**). De maneira similar, observou-se que os isolados clínicos co-tratados com NAC e os derivados da fendiona apresentaram valores de CMI aproximadamente 2 vezes maiores que as culturas tratadas com o Ag-fendiona e Cu-fendiona e 24).



Figura 22 – Efeitos de *N*-acetilcisteína (NAC) na tolerância de *P. aeruginosa* aos derivados da fendiona. 10^6 células da cepa ATCC 27853 foram tratadas simultaneamente com 5 mM de NAC e concentrações referentes a 2×CMI do ligante fendiona (A) e dos compostos de coordenação Ag-fendiona (B) e Cu-fendiona (C) durante 6 h a 37°C sob constante agitação. Após tempos fixos de 0, 1, 3 e 6 h, 10 µl de cada um dos sistemas foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O co-tratamento com o antioxidante NAC aumentou a tolerância de *P. aeruginosa* ao tratamento bactericida com os compostos de coordenação derivados da fendiona (B e C).



Figura 23 – Efeitos de *N*-acetilcisteína (NAC) na tolerância de cepas clínicas de *P. aeruginosa* aos derivados da fendiona. A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas isolados clínicos de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram tratadas simultaneamente com 5 mM de NAC e concentrações referentes a $2 \times CMI$ do ligante fendiona (A) e dos compostos de coordenação Ag-fendiona (B) e Cu-fendiona (C) durante 24 h a 37° C. Após o período de tratamento, a menor concentração do composto que demonstrou ausência de turvação visível foi considerada como a CMI. Observou-se que o co-tratamento com o antioxidante NAC (5mM) tornou os isolados clínicos de *P. aeruginosa* mais resistentes ao tratamento com os derivados da fendiona. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test) em relação aos sistemas tratados com o isoladamente com Ag-fendiona e Cu-fendiona.

5.9- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na geração de EROS em P. aeruginosa

A capacidade dos compostos derivados da fendiona em induzir à formação de EROs em *P. aeruginosa* foi avaliada através da oxidação da sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceína diacetato. Após 1 h de tratamento na presença do ligante fendiona e de seus derivados, Ag-fendiona e Cu-fendiona, não foi detectado aumento nos níveis de oxidação da sonda. Entretanto, após 3 h de incubação, foi observado que tanto Ag-fendiona quanto Cu-fendiona foram capazes de induzir o acúmulo de EROs, aumentando respectivamente 1,7 e 2,6 vezes a geração de EROs em células de *P. aeruginosa* (Figuras 25C e 25E). Por outro lado, o ligante fendiona não alterarou de forma significativa os níveis intracelulares de EROs (Figura 25A). Em paralelo, quando as células bacterianas foram co-incubadas na presença dos compostos, Ag-fendiona e Cu-fendiona, e o antioxidante NAC (5 mM) foram observadas reduções nos níveis de oxidação intracelular em 54% e 60%, respectivamente (Figuras 25D e 25F). Por outro lado, não foi observada alteração no nível

de EROS no co-tratamento fendiona e NAC (5 mM) comparado ao controle e ao sistema tratado com 2×CMI de fendiona. Ainda, concentrações bacteriostáticas de Ag-fendiona e Cu-fendiona não alteraram a formação de EROS.



Figura 24 – Acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de *P. aeruginosa* tratadas com compostos de coordenação derivados da fendiona. 10^6 células da cepa ATCC 27853 foram tratadas com concentrações referentes a $0.5 \times CMI$, $1 \times CMI$ e $2 \times CMI$ de fendiona (A), Ag-fendiona (B) e Cu-fendina (C) durante 1 h ou 3 h a 37°C, na presença ou na ausência do antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC; 5 mg/ml) (D, E e F). Após o tratamento, quantificou-se a formação de EROs através da oxidação da sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceína diacetato. Os compostos de coordenação Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram a formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o co-tratamento com o antioxidante (NAC a 5 mg/ml) foi capaz de reverter os níveis de oxidação intracelular. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett s multiple comparison test) em relação ao sistema controle.

Paralelamente, foi investigado se os compostos estudados seriam capazes de induzir a formação de EROs em amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes à CAZ, IMP e MER. Os resultados evidenciaram que Ag-fendiona e Cu-fendiona aumentaram os níveis de oxidação intracelular em todos os isolados estudados. Dentre os isolados clínicos, a cepa 126T apresentou o menor nível de oxidação intracelular após o tratamento com 2×CMI de Cu-fendiona. Após 3 h de tratamento com Cu-fendiona, observou-se o aumento de 1,4 vezes na formação de EROs. Em contrapartida, observou-se que para a cepa 126T, Ag-fendiona e Cu-fendiona aumentaram respectivamente, 5,5 e 4,1 vezes a formação de EROs em relação ao controle (**Figura 26**).



Figura 25 – Acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cepas clínicas de *P. aeruginosa* tratadas com compostos de coordenação derivados da fendiona. A cepa padrão ATCC 27853 e outros 5 isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 3 h a 37°C. Após o tratamento, quantificou-se a formação de EROs através da oxidação da sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceína diacetato. Os compostos de coordenação Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram a formação de EROS em todas as cepas estudadas. * P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett´s multiple comparison test) em relação ao sistema controle.

5.10- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na atividade de enzimas antioxidantes

5.10.1- Catalase

Em resposta a um estimulo pró-oxidante, a célula bacteriana aumenta a atividade de sua maquinaria antioxidante com o intuito de conter os danos deletérios causados por EROs. Por este motivo, quantificou-se a atividade enzimática de catalase após o tratamento com os derivados da fendiona. O controle positivo com o H₂O₂ (17,5 mM) induziu o aumento significativo da atividade de catalase a partir da primeira hora de tratamento. Já o tratamento com concentrações bactericidas de Ag-fendiona e Cu-fendiona promoveu o aumento da atividade enzimática de catalase de maneira tempo-dependente. Observou-se um aumento de 180,3% e 136% na atividade de catalase após 3 h de tratamento com 2×CMI de Ag-fendiona e Cu-fendiona, respectivamente (**Figuras 27B** e **27C**). Em contraste, o ligante fendiona na concentração de 2×CMI aumentou moderadamente a atividade de catalase (**Figura 27A**). Em concordância com resultados anteriores, em que NAC foi capaz de restaurar os níveis de oxidação intracelular de células tratadas com Ag-fendiona ou Cu-fendiona, foi observado que o co-tratatmento com 5 mM NAC e os derivados da fendiona resultou na restauração da atividade de catalase em níveis similares ao controle (**Figuras 27F**).

Também foram avaliados os efeitos destes compostos na atividade catalásica de diferentes isolados clínicos. Para isso, ATCC 27853 e outras 5 cepas clínicas foram tratadas com concentrações equivalentes à CMB por 3 h. Após o período de tratamento, a atividade desta enzima foi mensurada. O tratamento com concentrações bactericidas dos compostos derivados da fendiona resultou no aumento da atividade de catalase em todas as cepas clínicas isoladas. Entre os isolados clínicos utilizados no presente estudo, verificou-se que a cepa 126T apresentou a menor taxa de aumento da atividade de catalase quando tratadas por Ag-fendiona $(1,6\times$ de aumento) e Cu-fendiona $(1,3\times$ de aumento). Já a cepa 09HC apresentou as maiores taxas de incremento da atividade de catalase, aumentando 10,2 e 4,1 vezes em resposta ao tratamento com Ag-fendiona e Cu-fendiona, respectivamente (**Figura 28**).



Figura 26 - Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da catalase em *P. aeruginosa*. 10⁶ células da cepa ATCC 27853 foram tratadas por 1 e 3 h na presença de peroxido de hidrogênio (17,5 mM) em concentrações referentes a $0.5 \times CMI$, $1 \times CMI$ e $2 \times CMI$ de fendiona (A), Ag-fendiona (B) e Cu-fendiona (C) durante 3 h a 37°C, na presença ou ausência de 5 mM do antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC) (D, E e F). Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e, então, a atividade da catalase foi determinada, espectrofotometricamente, através da degração do peroxido de hidrogênio. Na concentração de $2 \times CMI$ o ligante fendiona e seus derivados Ag-fendiona e Cu-fendiona aumentaram a atividade de catalase e o co-tratamento com 5 mM NAC reduz a atividade catalase. *P < 0.05 - Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test) em relação aos sistemas controle.



Figura 27 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade de catalase em cepas clínicas de *P. aeruginosa*. A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 3 h a 37°C. Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e, então, a atividade da catalase foi determinada, espectrofotometricamente, através da degração do peroxido de hidrogênio. Observou-se o aumento da atividade enzimática da catalase nos sistemas tratados com Ag-fendiona e Cu-fendiona. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA pareado (Dunnett's multiple comparison test) em relação aos sistemas controle.

5.10.2- SOD

Avaliou-se também a atividade da enzima SOD, responsável pela dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Para isto, as células bacterianas foram cultivadas na presença de Ag-fendiona e Cu-fendiona em concentrações equivalentes a 0,5×CMI, 1×CMI e 2×CMI durante 1 e 3 h a 37°C. Ao final deste período, os extratos celulares foram obtidos e a atividade de SOD foi mensurada. A atividade antioxidante de SOD foi induzida em resposta ao tratamento com os derivados metálicos da fendiona já na primeira hora de tratamento. O peroxido de hidrogênio promoveu aumento significativo da atividade de SOD. Após 3 h de tratamento com 2×CMI de Ag-fendiona e Cu-fendiona, observou-se o aumento da atividade enzimática de SOD em 54,4% e 44,7%, respectivamente (Figura 29A, 29B e 29C). Além disso, o co-tratamento das células bacterianas com os compostos derivados da fendiona (2×CMI) e 5 mM NAC reduziu de maneira significativa a atividade de SOD em níveis compatíveis ao controle (Figuras 29D, 29E e 29F). O tratamento com sais de prata e cobre não alterou a resposta antioxidante bacteriana. Complementarmente, os compostos derivados da fendiona foram capazes de induzir a atividade SOD em isolados clínicos (Figura 30).



Figura 28 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em *P. aeruginosa.* 10⁶ células da cepa ATCC 27853 foram tratadas por 1 e 3 h na presença de peróxido de hidrogênio (17,5 mM) e concentrações referentes a $0,5 \times CMI$, $1 \times CMI$ e $2 \times CMI$ de fendiona (A), Agfendiona (B) e Cu-fendiona (C) durante 3 h a 37°C, na presença ou na ausência do antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC, 5 mg/ml) (D, E e F). Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e, então, a atividade de SOD foi determinada através da redução do sal cromogênio WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4- nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio). *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett´s multiple comparison test) em relação aos sistemas controle.



Figura 29 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em *P. aeruginosa*. A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas resistentes aos antimicrobianos clássico (ceftazidima, meropenem e imipenem) foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 3 h a 37°C. Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e, então, a atividade de SOD foi determinada através da redução do sal cromogênio WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio). *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA pareado (Dunnett's multiple comparison test) em relação ao controle.

5.11- Danos oxidativos induzidos por compostos derivados da fendiona em P. aeruginosa

Frente a um estímulo pró-oxidante a célula pode aumentar seu arsenal antioxidante, na tentativa de neutralizar os efeitos deletérios das EROs. Assim, o aumento da atividade das enzimas catalase e SOD pode ser interpretado como uma estratégia adaptativa da célula bacteriana para superar o dano oxidativo causado pelos compostos derivados da fendiona. Portanto, avaliou-se parâmetros celulares marcadores de danos oxidativos.

5.11.1- Atividade aconitase

Aconitase é uma enzima pertencente ao ciclo do ácido cítrico que catalisa a isomerização estéreo-específica do L-citrato a isocitrato, de acordo com a equação abaixo (**equação 13**):

$$L - citrato \leftrightarrow cis - aconitato \leftrightarrow isocitrato$$

(Eq. 13)
A medida da atividade da enzima aconitase serve como sensor da presença do radical superóxido (O_2^{-}) na célula bacteriana (GARDNER, 1997). O O_2^{-} ataca, dentre outros, o átomo de ferro do grupamento [4Fe-4S]²⁺ causando a oxidação de um elétron do grupamento [4Fe-4S]²⁺, a liberação do átomo de ferro no estado ferroso e a perda da atividade da enzima (GARDNER, 2002).

Quantificou-se a atividade da enzima aconitase após o tratamento com 0,5×CMI, 1×CMI, e 2×CMI do ligante fendiona e seus derivados metálicos, Ag-fendiona e Cu-fendiona, por 1 e 3 h. Observou-se que após 1 h de tratamento, o ligante fendiona não foi capaz de induzir alterações na atividade da aconitase. Por outro lado, na primeira hora de tratamento com os compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona foi observado um aumento da atividade de aconitase em todas as concentrações utilizadas. Em contrapartida, após 3 h de tratamento, na concentração de 2×CMI, o ligante fendiona e seus derivados, Ag-fendiona e Cu-fendiona, inibiram a atividade de aconitase em 42%, 67% e 75%, respectivamente (**Figuras 31A, 31B** e **31C**). Portanto, nestas condições pode-se inferir que os compostos derivados da fendiona induzem danos oxidativos. Adicionalmente, foi observado que o co-tratamento com o antioxidante NAC (5 mM) foi capaz de atenuar a inativação oxidativa da enzima aconitase (**Figuras 31D, 31E e 31F**).

Em seguida, as alterações na atividade de aconitase induzidos pelo tratamento em concentrações bactericidas dos compostos derivados da fendiona foram avaliadas em 5 isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Em média, Ag-fendiona e Cu-fendiona inibiram, respectivamente, 45,85% e 56,35% da atividade de aconitase em cepas clínicas de *P. aeruginosa* (Figura 32).



Figura 30 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima aconitase de *P. aeruginosa.* 10^6 células da cepa ATCC 27853 foram tratadas por 1 e 3 h na presença de peroxido de hidrogênio (17,5 mM) e concentrações referentes a 0,5×CMI, 1×CMI e 2×CMI de fendiona (A), Ag-fendiona (B) e Cu-fendiona (C) durante 3 h a 37°C, na presença ou ausência do antioxidante NAC (5 mM) (D, E e F). Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e a atividade enzimática da aconitase foi mensurada. *P < 0,05 – Análise de variância Oneway ANOVA (Dunnett´s multiple comparison test) em relação ao controle.



Figura 31 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade da enzima aconitase em cepas clínicas de *P. aeruginosa*. A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas resistentes aos antimicrobianos clássico foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 3 h a 37°C. Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e a atividade enzimática da aconitase foi mensurada. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA perado (Dunnett's multiple comparison test) em relação ao controle.

5.11.2 - Efeitos dos compostos derivados da fendiona na degradação do DNA bacteriano

A fragmentação do DNA é um dano oxidativo relacionado ao processo de morte celular. Agentes pró-oxidantes induzem a oxidação específica de guanina, seguida da quebra de fita dupla do DNA, fragmentação do DNA e morte celular bacteriana (FOTI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2014). Inicialmente, a fim de verificar o perfil de fragmentação do DNA, foram realizadas análises de eletroforese em gel de agarose utilizando-se o DNA total extraído das culturas tratadas ou nãotratadas com concentrações bactericidas de compotos derivados da fendiona. Observou-se que compostos derivados de fendiona, induziram, tardiamente (após 5 h de tratamento), a fragmentação do DNA. O tratamento com Cu-fendiona resultou em formação de rastros ao longo do gel, evidenciando o DNA degradado, especialmente nos isolados ATCC 27853, 160T e 126T (**Figura 33**).

Paralelamente, avaliou-se a fragmentação do DNA através da análise de TUNEL. Esta técnica se baseia na incorporação de nucleotídeos marcados com corante fluorescente (FITC) na extremidade 3'-OH livre. A polimerização dos nucleotídeos modificados às regiões de fragmentação do DNA é catalisada pela enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Então, a quantidade de fragmentos de DNA é diretamente proporcional à fluorescência obtida através da incorporação de d-UTP fluoresceína (DUTTA *et al.*, 2007). O tratamento de isolados

clínicos de *P. aeruginosa* com compostos derivados da fendiona por 5 h em concentrações bactericidas foi capaz de induzir a fragmentação de DNA (**Figura 34**). No geral, tanto Ag-fendiona como Cu-fendiona apresentaram, respectivamente, um aumento de 53,7% e 51,6%, na incorporação de nucleotídeos fluorescentes.



Figura 32 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na fragmentação do DNA de cepas clínicas de *P. aeruginosa.* A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas resistentes aos antimicrobianos clássico (ceftazidima, meropenem e imipenem) foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 1, 3 e 5 h a 37°C. Ao final do período de incubação, o DNA foi extraído e a integridade do DNA foi avaliada através da carrida em gel de agarose. Observou-se o composto Cu-fendiona induziu a degradação do DNA após 5 h de tratamento. CT – controle. Ag-fendiona, Cu-fen- Cu-fendiona.



Figura 33 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na fragmentação do DNA de cepas clínicas de *P. aeruginosa.* A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas resistentes aos antimicrobianos clássico (ceftazidima, meropenem e imipenem) foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona durante 5 h a 37°C. Ao final do período de incubação, as células foram lavadas, fixadas com paraformolaldeído 4% e permeabilizadas com etanol 70% e, em seguida, foram utilizadas para a marcação com a sonda TUNEL, para detecção da DNA com a extremidade OH'3 livre. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA pareado (Dunnett's multiple comparison test) em relação aos sistemas não tratados. MIF- Média de intensidade de fluorescência.

5.11.3- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na peroxidação de lipídeos

Em presença de EROs, os ácidos graxos poliinsaturados sofrem reações de peroxidação lipídica, amplificando a produção destas espécies reativas e produzindo, como produto final desta reação, o malondialdeído (MDA). Por este motivo, quantificou-se a formação MDA após o tratamento com os derivados de fendiona. Para isso, realizou-se o tratamento das amostras com concentrações bactericidas com os derivados da fendiona por 1 e 3 h. Após esses períodos, os extratos celulares foram obtidos e, então, o MDA foi quantificado através do método de TBARs.

Durante a primeira hora de tratamento não foi possível quantificar o MDA formado, pois os valores obtidos foram inferiores ao limite da técnica empregada. Após 3 h, células tratadas com 2×CMI com os derivados metálicos de fendiona exibiram maior acúmulo de MDA. Observou-se que Ag-fendiona e Cu-fendiona aumentaram, respectivamente, 14% e 23% os níveis de MDA formado em resposta ao tratamento com esses compostos (**Figura 35**).

Tendo em vista que isolados clínicos utilizados no presente trabalho apresentaram diferentes respostas ao tratamento com compostos derivados da fendiona, avaliou-se o acúmulo de MDA após o tratamento com Ag-fendiona e Cu-fendiona. No geral, células tratadas com os derivados da fendiona exibiram maior acúmulo de MDA. Ainda, Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram maior formação de MDA no isolado 09HC, que foi a cepa mais susceptível aos compostos estudados (**Figura 36**).



Figura 34 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na peroxidação de lipídeos em *P. aeruginosa.* Uma cultura da cepa padrão ATCC 27853 (50 ml a 10⁶ UFC/ml) foram tratadas por 1 e 3 h na presença de peróxido de hidrogênio (17,5 mM) e concentrações referentes a $\frac{1}{2}$ ×CMI, 1×CMI e 2×CMI de fendiona (A), Ag-fendiona (B) e Cu-fendiona (C) durante 3 h a 37°C, na presença ou na ausência do antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC, 5 mg/ml) (D, E e F). Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e a peroxidação lipídica foi quantificada através da dosagem da malondialdeído. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett s multiple comparison test) em relação ao sistema controle.



Figura 35 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na peroxidação de lipídeos em *P. aeruginosa.* A cepa ATCC 27853 e outros 5 isolados clínicos foram tratadas durante 3 h em concentrações referentes à CMB de Agfendiona e Cu-fendiona. Ao final do período de incubação, o extrato celular foi obtido e quantificou-se a formação de MDA. *P < 0.05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test) em relação controle.

Parte IV: Efeitos dos compostos derivados de fendiona na ultraestrutura e na fisiologia de membrana de *P. aeruginosa*

Tendo observado que os compostos derivados da fendiona promoveram a peroxidação de lipídeos de membrana, avaliou-se parâmetros relacionados à fisiologia de membrana. O envoltório celular bacteriano é uma estrutura complexa, essencial para manutenção da viabilidade celular. Uma vez que a fisiologia de membrana seja desregulada, ocorre o colapso das membranas externa e plasmática, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular e, conssequente, morte celular. Portanto, avaliou-se o potencial de compostos derivados da fendiona em alterar a estabilidade, permeabilidade e polarização de membrana citoplasmática.

5.12- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na ultraestrutura bacteriana

Alterações ultraestruturais nas células de *P. aeruginosa*, induzidas pela ação dos compostos derivados da fendiona, foram avaliados através de microscopia eletrônica de varredura. Para isto 10⁶ células bacterianas (ATCC 27853) foram incubadas na presença e ausência de ½×CMI de Agfendiona e Cu-fendiona por 24 h a 37°C. Posteriormente, as células foram fixadas e processadas para visualização em microscópio de varredura. Nas células sem tratamento foi possível observar a presença de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, às vezes isolados, aos pares ou em cadeias curtas, com diâmetro regular e sem deformações na superfície (**Figura 37**). Em contrapartida, o tratamento com os compostos derivados da fendiona resultou em alterações ultraestruturais severas, sendo possível observar células que apresentaram irregularidades e/ou deformações por toda a superfície bacteriana, incluindo: redução do diâmetro celular (algumas assumindo forma esférica), concavidades/invaginações, envoltório celular intensamente rugoso e perfurações. Em conjunto, essas observações nos permitem inferir que o envoltório bacteriano é um dos alvos celulares afetados pelos compostos derivados da fendiona.



Figura 36 – Efeitos dos compostos derivados da fendiona sobre a ultraestrutura de *P. aeruginosa.* As células da cepa ATCC 27853 foram tratadas com ½×CMI dos compostos por 24 h a 37°C. Observou-se que concentrações subinibitórias de fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, induziram drásticas alterações ultraestuturais indicando danos no envoltório bacteriano. Setas verdes – bastonetes regulares e sem deformação. Setas azuis – bactérias com diâmetro celular reduzido; Setas brancas – concavidade na superfície celular e setas vermelhas – perfurações na membrana bacteriana. A barra branca indica o tamanho relativo a 1 μm.

5.13- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na estabilidade de membrana externa

As alterações na permeabilidade de membrana externa de *P. aeruginosa* foram avaliadas através da sensibilidade da célula bacteriana ao SDS, um agente desestabilizador de membranas. Para isto, as células foram incubadas em concentrações bactericidas por 3 h. Em seguida, as células foram desafiadas com detergente SDS (0,1%) e a densidade ótica foi mensurada por 25 min (**Figura 38**). Observou-se que as células que receberam o tratamento com Ag-fendiona e Cu-fendiona foram menos resistentes ao desafio com o agente desestabilizador de membrana, apresentando uma acentuada lise bacteriana. Comparativamente, o tratamento com a Ag-fendiona foi mais efetivo na desestabilização da membrana externa de *P. aeruginosa*, especialmente para as cepas 22U e 186FC.

5.14- Efeitos de compostos derivados da fendiona na estabilidade de membrana plasmática

Complementarmente, avaliou-se a integridade de membrana plasmática utilizando-se o intercalante de bases, iodeto de propídio (PI). Para isto, os isolados clínicos foram tratados por 3 h na presença de concentrações bactericidas de compostos derivados da fendiona. Em seguida, as células foram lavadas e a integridade de membrana foi mensurada através da incorporação do fluoróforo PI. Para todos os isolados clínicos estudados observou-se o aumento da incorporação do PI após o tratamento com os derivados da fendiona. Em células tratadas com Ag-fendiona, Cu-fendiona foram observadas, respectivamente, um aumento da fluorescência em 25,92% e 26,06%, evidenciando, assim, a formação de poros na membrana plasmática bacteriana. Já em células tratadas com o inóforo FCCP foi verificado o aumento de 32,65% da incorporação da sonda fluorescente (**Figura 39**).



Figura 37 – Desestabilização da membrana externa de *P. aeruginosa.* A cepa padrão ATCC 27853 e 5 isolados clínicos de *P.aeruginosa* foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Agfendiona e Cu-fendiona durante 3 h a 37°C. Ao final do tratamento, as células foram resuuspendidas em tampão Hepes de sódio 50 mM + glucose a 5 mM, ajustando a DO_{600nm} em 0,4. Foi então adicionado SDS (0,1% final) e determinouse o grau de lise bacteriana pela redução da absorbância registrada a 660 nm.



Figura 38 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na integridade de membrana plasmática de *P. aeruginosa*. A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas de *P. aeruginosa* foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) durante 3 h a 37°C. Ao final do tratamento, as células foram lavadas e a integridade de membrana foi mensurada pela incorporação do fluoróforo iodeto de propídeo. O ionóforo FCCP foi utilizado como controle positivo. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA pareado (Dunnett's multiple comparison test) em relação ao controle de células não-tratadas.

5.15- Efeitos dos compostos derivados da fendiona na polarização de membrana plasmática

A fim de confirmar a despolarização de membrana plasmática bacteriana, culturas de *P. aeruginosa* foram incubadas na presença de Ag-fendiona e Cu-fendiona, ambos em concentrações referentes $5 \times CMI$ por 3 h. Após o período de tratamento, o potencial de membrana foi mensurado através do fluoróforo DiOC₂. O indicador de potencial de membrana DiOC₂, em baixas concentrações exibe fluorescência verde (FL1) em todas as células bacterianas. Porém, em células saudáveis (em que o potencial de membrana é mantido), é observado o aumento da concentraçõe intracelular de DiOC₂ de modo que o fluoróforo se auto associe e a emissão de fluorescência mude para vermelho (FL3). Observou-se que os compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram à despolarização de membrana em todas os isolados clínicos estudados (**Figura 40**). Os compostos derivados da fendiona foram capazes de alterar a polarização de membrana em níveis similares aos observados em sistemas tratados com o ionóforo clássico, FCCP (**Figura 40**). Coletivamente, concluiu-se que Ag-fendiona e Cu-fendiona foram capazes de alterar a polarização de membrana em sistemas tratados com o ionóforo clássico, FCCP (**Figura 40**). Coletivamente, concluiu-se que Ag-fendiona e Cu-fendiona foram capazes de desestabilizar a fisiologia de membrana plasmática bacteriana de *P. aeruginosa*.



Figura 39 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na polarização de membrana plasmática de *P. aeruginosa*. A cepa padrão ATCC 27853 e 5 cepas clínicas de *P. aeruginosa* foram tratadas com as respectivas concentrações bactericidas dos derivados da fendiona, Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) durante 3 h a 37°C. Ao final do tratamento, as células foram lavadas e a polarização de membrana foi mensurada pelo fluoróforo DiOC₂. O ionóforo FCCP foi utilizado como controle positivo. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA pareado (Dunnett's multiple comparison test) em relação ao controle de células não-tratadas.

Parte V: Efeitos dos compostos derivados da fendiona no metabolismo de P. aeruginosa

5.16- Alterações no perfil metabólico induzidos por derivados da fendiona

Realizou-se a análise do metaboloma de *P. aeruginosa* com o objetivo de rastrear as alterações metabólicas globais induzidas pelos compostos derivados da fendiona – Ag-fendiona e Cu-fendiona – em comparação com o estado metabólico de células não tratadas. Inicialmente, verificou-se o efeito dos compostos derivados da fendiona em culturas bacterianas de alta densidade celular, para otimizar a obtenção e identificação dos metabólitos. Nossos resultados confirmaram a ação bactericida de Ag-fendiona e Cu-fendiona em culturas de *P. aeruginosa* em alta densidade celular ($OD_{600nm} = 1,0$) (**Figura 41**).



Figura 40 – Curva tempo-morte dos compostos derivados da fendiona em culturas de *P. aeruginosa* com alta densidade celular. Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; OD_{600nm}=1,0) foram tratadas com concentrações referentes a 1×CMI e 5×CMI de Ag-fendiona (A), Cu-fendiona (B) por até 8 h a 37°C. Após tempos fixos de 0, 1, 3, 6 e 8 h, 10 µl de cada um dos sistemas foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Considerou-se efeito bactericida o tratamento que induziu redução de \ge 3×log10 do crescimento bacteriano em relação ao controle (LORRIAN *et al.*, 2005).

Em seguida, extraiu-se os metabólitos de células planctônicas de *P. aeruginosa* tratadas com 5×CMI de Ag-fendiona e Cu-fendiona por 3 h. Após a obtenção dos extratos, os metabólitos foram separados e identificados por LC-MS. Nestas condições de tratamento, foi possível obter informações sobre a resposta metabólica que guia o processo de morte celular. Os 174 diferentes metabólitos alterados pelo tratamento com os compostos derivados da fendiona foram apresentaram na forma de *heatmap*, para visualização da tendência de variação no perfil metabólito de *P. aeruginosa* (Figura 42). A análise completa do metaboloma comparando os sistemas tratados ou não com Ag-fendiona e Cu-fendiona foi sumarizada na Tabela A1, do anexo 1 (Figura 42). A partir destes dados, podemos inferir que o tratamento com estes compostos induz efeitos amplos e complexos sobre o metabolismo bacteriano, ao invés de, meramente, extinguirem toda a atividade metabólica.

Metabólitos positivamente

Metabólitos negativamente

Controle	Ag-fen	Cu-fen		Controle	Ag-fen	Cu-fen	
			Pseudouriaine				D-Glucono-1.5-lactone
			rumarate 1.2-Dihydroxy-7-hydroxymethylnaphthalene				2.5-Diaminohexanoate
			2-0xo-7-methylthioheptanoic acid				4.5-Bisphenol-o-quinone
			N2-citryl-N6-acetyl-N6-hydroxy-L-lysine Dopaxanthin				Deoxyuridine
			Choline sulfate				Resveratrol Xanthoxic acid
			Chitobiose				Nicotinamide-beta-riboside
			N-Acetyl-L-aspartate				3-Deoxy-D-manno-octulosonate
			7-Cyano-7-carbaguanine				Palmitoylglycerone phosphate
			Inosine				Deamino-alpha-keto-demethylphosphinothricin
			2-Oxoglutarate				4-Oxoproline
			N-Acetyl-L-glutamate				Pidolic acid
			2-Aminophenoxazin-3-one				CMP
			Paraoxon Betalamic acid				D-Rhamnose
			FMN				Glutathione
			L-Serine-phosphoethanolamine				Stealthin C
			Homoisocitrate				Decanoyl-CoA
			2-C-Metny1-D-erythritol 2.4-cyclodiphosphate 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethy1-7.8-dihydropteridine				Protoporphyrin
			2-Amino-2-deoxy-D-gluconate				Glutarate
			2-Dehydro-3-deoxy-L-arabinonate Spermidine				(4S)-4.5-Dihydroxypentan-2.3-dione
			5'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide				Butanoyipnosphate Thiourocanic acid
			3-Methylpyrrole-2.4-dicarboxylic acid (R)-Lactate				Diethylthiophosphoric acid
			D-Glyceraldehyde				L-Metanephrine Orotate
			3-Hydroxyindolin-2-one				(2R)-2-Hydroxy-2-methylbutanenitrile
			11.12-Dihydroxybenzo[a]pyrene				gamma-L-Glutamylputrescine beta-Alanvl-L-lvsine
			a-N-Acetylglucosamine				(R)-b-amino-isobutyric acid
			2-Hydroxyethylphosphonate				beta-D-Glucose
			Orthophosphate				Theophylline
			D-Methionine				2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate
			PG(16:0/18:1(9Z))				beta-D-Glucose 1-phosphate
			2.4-Dichlorotoluene PE(16:0/18:1(9Z))				Sedoheptulose 7-phosphate
			5-Pyridoxolactone				dCMP
			L-Methionine (S)-S-oxide Propanoate				dAMP
			Succinate				Xanthine
			Propanoyl phosphate L-Phenylalanine				L-Alanine
			cis-Aconitate				L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate
			N-Formimino-L-glutamate Citrate				1-Aminocyclopropane-1-carboxylate
			3-Propylmalate				epsilon-Caprolactam dGMP
			4-Hydroxy-L-glutamic acid				АМР
			Actinorhodin				L-Tyrosine (E)-Phenylacetaldoxime
			UDP-N-acetyl-D-galactosamine				4-Aminobenzoate
			Glycine				L-Threonine S-(Indolvlmethvlthiohydroximovl)-L-cysteine
			D-Alanyl-D-alanine				L-Ornithine
			Emetine				L-Proline Piperideine
			2-(3'-Methylthio)propylmalic acid				L-Lysine
			NAD+				Actinidine L-Pipecolate
			Pantothenate				2-Hydroxy-6-oxo-6-(2-carboxyphenyl)-hexa-2.4-dienoate
			2'-Deoxyinosine 5'-phosphate				Putrescine Cadaverine
			Uracil				Rosmarinate
							5'-Methylthioadenosine
							Digalacturonate
							gamma-L-Glutamyl-L-cysteine Thiogyapate
							(S)-Malate
							N-Glycoloyl-neuraminate
							dTMP
							1-Guanidino-1-deoxy-scyllo-inositol
							5-Hydroxyectoine
							Indolepyruvate
							L-2-Aminoadipate
							Ethanolamine
							I-Aspartate
							Dehydroalanine
							Maleamate Cys-Gly
							UMP
							UDP-glucose UDP-alpha-D-galactose
							L-Asparagine
							L-Histidine N-Acetylornithine
							L-Leucine
							L-Valine Adenosine
							S-Glutathionyl-L-cysteine
							5-Amino-6-(5'-phospho-D-ribitylamino)uracil

Figura 41 – Heatmap representando a regulação metabólica de *P. aeruginosa* após o tratamento por 1 h em concentrações bactericidas dos compostos derivados da fenadiona, Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fenadiona (Cu-fen). A escala na lateral direita representa o nível das variações: vermelho indica acúmulo de referido metabólito e verde indica diminuição relativa do referido metabólito.

Com o objetivo de identificar os metabólitos que sofrearam alterações estatisticamente significativas, os gráficos de *Volcano plot* foram gerados plotando no eixo "x" o logarítimo da razão entre os sistemas tratados sobre os sistemas controle (**Equação 13**). No eixo "y" plotou-se o antilogarítimo dos P-valores obtidos através de análise de variância *One-way* ANOVA (**Figuras 43 A e B**). Os metabólitos que apresentaram alterações de abuandância relativa superiores a duas vezes de aumento e P-valores <0,1 foram considerados estatisticamente significativos e foram destacados em rosa no *volcano plot* exposto na **Figura 43**. Em relação ao controle, Ag-fendiona promoveu o acúmulo significativo de 29 metabólitos e reduziu a abundância de outros 34 metabólitos, enquanto Cu-fendiona alterou de maneira significativa a abundância de 77 metabólitos dos quais: 52 metabólitos foram regulados positivamente e outros 25 metabólitos foram modulados negativamente (**Figuras 43 A e B**).

 $Taxa \ de \ alteração(FC) = \ Log_2 \ \frac{Contagem \ iônica \ _{Ag-fendiona \ ou \ Cu-fendiona}}{Contagem \ iônica \ _{controle}}$ (Eq. 13)

Em seguida, realizou-se a análise das vias metabólicas alteradas pelo tratamento com os compostos derivados da fendiona utilizando-se o programa MetaboAbalyst 2.0. Os resultados indicaram que, de maneira geral, Ag-fendiona e Cu-fendiona agiram de maneira similar no metabolismo de *P. aeruginosa*. Ambos compostos derivados da fendiona foram capazes de alterar o funcionamente de 29 vias metabólicas, das quais 23 vias foram comumente alteradas por Ag-fendiona e Cu-fendiona (Figura 43 C). As vias que foram unicamente alteradas em Ag-fendiona e Cu-fendiona foram relatadas no diagrama de Venn (Figura 43 C).



Figura 42 – Comparação dos metabólitos e vias metabólicas alteradas por Ag-fendiona e Cu-fendiona em *P. aeruginosa.* Representação gráfica de Volcano plot ilustrando os metabólitos que apresentaram alterações significativa após o tratamento com concentrações bactericidas (5×CMI) de Ag-fendiona (A) e Cu-fendiona (B). Diagrama de Venn comparando as vias metabólicas alteradas pelos compostos derivados da fendiona (C).

5.16.1 – TCA

Para explorar ainda mais as alterações induzidas pelos compostos derivados da fendiona no metabolismo de *P. aeruginosa*, examinamos mais detalhadamente a abundância relativa de metabólitos pertencentes a vias centrais do metabolismo bacteriano. Com relação ao TCA, verificou-se que o tratamento das células planctônicas de *P. aeruginosa* com os derivados da fendiona (5×CMI) resultou no acúmulo dos metabólitos pertencentes ao TCA, a saber: citrato, oxaloacetato, α -cetoglutarato e fumarato (**Figura 44**).



Figura 43 – Alterações do ciclo de ácidos tricarboxílicos induzidos por compostos derivados da fendiona em *P. aeruginosa*. Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; $OD_{600nm} = 1,0$) foram tratadas com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Obteve-se os extratos celulares e a abundância relativa dos metabólitos foi quantificada por LC-MS. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett s multiple comparison test) em relação ao grupo controle.

No intuito de confirmar a hiperativação do TCA, foram avaliadas as atividades enzimáticas de isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase (**Figuras 45A** e **45B**). O tratamento de células de *P. aeruginosa* com Ag-fendiona aumentou, respectivamente, a atividade de isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase, quando comparada ao sistema que não recebeu tratamento. Similarmente, foi observado um aumento de 9,45 vezes na atividade de isocitrato desidrogenase e 1,56 vezes na atividade de malato desidrogenase em células tratadas com Cu-fendiona (**Figuras 45A** e **45B**).

Uma vez que o TCA resulta na formação de intermediários reduzidos, como por exemplo NADH, monitoramos a proporção NAD⁺/NADH das células de *P.aeruginosa* tratadas com Ag-fendiona e Cu-fendiona. Células que receberam o tratamento com Ag-fendiona apresentaram a proporção NAD⁺/NADH 39% menor que células não tratadas. No entanro, nos sistemas incubados com Cu-fendiona, foi observada a redução da proporção NAD⁺/NADH em apenas 10% (**Figura 45C**).



Figura 44 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na atividade de enzimas relacionados ao TCA. Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; OD_{600nm}=1,0) foram tratadas com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Após o período de tratamento, obteve-se os extratos celulares e quantificou-se atividade enzimática de isocitrato desidrogenase (A), malato desidrogenase (B) e a proporção NAD⁺/NADH (C). Observou-se que os sistemas que receberam o tratamento com Ag-fendiona e Cu-fendiona promoveram o aumento da atividade do ciclo TCA. A hiperativação do TCA resultou na produção acentuada de NADH, reduzindo a proporção de NAD⁺/NADH. * P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett´s multiple comparison test) em relação ao grupo controle.

Tendo em vista que os intermediários reduzidos produzidos pelo TCA dão suporte à produção energética via cadeia transportadora de elétrons, foi observado o aumento nos níveis intracelulares do cofator mononucleótideo de flavina (FMN) em células tratadas com os derivados da fendiona (**Figura 46A**). Além disso, em concordância com os resultados anteriores, Agfendiona e Cu-fendiona promoveram aumento da atividade da enzima NADH:ubiquinona oxiredutase (**Figura 46B**). Coletivamente, esses achados indicam que os compostos derivados da fendiona levam a mudanças na atividade no TCA e na fosforilação oxidativa de *P. aeruginosa*.



Figura 45 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na cadeia transportadora de elétrons de *P. aeruginosa.* Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; OD_{600nm}=1,0) foram tratadas por 1 h com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Após o período de tratamento, os extratos celulares foram obtidos e quantificou-se o a abundância relativa de mononucleótideo de flavina (FMN) (A) bem como a atividade da enzima NADH:ubiquinona oxiredutase (B). * P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett s multiple comparison test) em relação ao grupo controle.

5.16.2 – Equilíbrio NADP⁺/NADPH: via das pentoses fosfato e via de biossíntese de folato

Uma estratégia fundamental para contornar danos oxidativos é manutenção dos níveis intracelular de NADPH e NADP⁺. A via das pentoses fosfato é a principal fonte de produção de NADPH, o que aumenta o potencial eletroquímico bacteriano que está envolvido na tolerância antioxidante. O tratamento com os compostos derivados da fendiona levou à inibição da via das pentoses fosfatos. Observou-se que os metabólitos glicose-6-fosfato, glucono-1,5-lactona-6-fosfato e sedoheptulose-7-fosfato foram significativamente diminuídos em resposta ao tratamento com Ag-fendiona e Cu-fendiona (**Figura 47**).



Figura 46 – Alterações da via da pentose fosfato induzidos por compostos derivados da fendiona. Culturas de P. aeruginosa (ATCC 27853; OD_{600nm} = 1,0) foram tratadas com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Agfen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Os extratos celulares foram obtidos e a abundância relativa dos metabólitos foi quantificado por LC-MS. *P < 0,05 - Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test) em relação ao grupo controle.

Outra via bioquímica responsável pela formação de NADPH é a via de biossíntese de folato. Esta via é complexa e possui várias vias afluentes que culminam na formação de folato (**Figuras 48** e **49**). Os compostos estudados foram capazes de induzir o acúmulo de parte dos metabólitos relacionados à via de formação de 4-hidroxibenzoato colateral à biossíntese do folato. Dentre os metabólitos que foram positivamente modulados pelos compostos derivados da fendiona, destacam-se: 7-ciano-7-carbaguanine, 7,8-dihidroxantopterina, 6-(hidroximetil)-7,8-dihidropterina, 4-(β -D-ribofuranosil) anilina 5'-fosfato) (**Figuras 48A** e **48B**). Ao mesmo tempo, o tratamento de *P. aeruginosa* com os compostos derivados da fendiona resultou na diminuição de metabólitos diretamente relacionados à síntese de folato e seu co-produto NADPH. Dentre os metabólitos da via de biossíntese de folato que foram negativamente modulados, destacam-se: piranopterina cíclica monofofato, 7,8-dihidroneopterina, 4-aminobenzoato, tetrahidrofolato (**Figuras 48A e 48B**).

Ao inibir as vias de síntese de NADPH (via das pentoses fosfato e via de biossíntese de folato), os compostos derivados da fendioan promoveram a redução no conteúdo intracelular de NADPH e, consequentemente, aumentaram a proporção NADP⁺/NADPH. Observou-se que a proporção NADP⁺/NADPH de culturas tratadas com Ag-fendiona e Cu-fendiona foi, respectivamente, 4,62 e 2,89 vezes maior em relação ao controle (**Figura 50**).







Figura 47 – Alterações na via de biossíntese de folato induzidos por compostos derivados da fendiona em *P. aeruginosa*. Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; $OD_{600nm} = 1,0$) foram tratadas com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Obteve-se os extratos celulares e a abundância relativa dos metabólitos foi quantificado por LC-MS. (A) *Heatmap* representando a regulação metabólica da via de biossíntese de folato em *P. aeruginosa* após o tratamento por 1 h em concentrações bactericidas dos compostos derivados da fenadiona. (B) Observou-se que o tratamento de Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram a diminuição de metabólitos relacionados à biossíntese de folato, em especial o tetrafolato. *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test) em relação ao controle.



Figura 48 – Esquema ilustrando a via de biossíntese de folato. Destacou-se os metabólitos alterados em resposta ao tratamento com os compostos derivados da fendiona. Em verde, foram destacados os metabólitos regulados negativamente e, em vermelho, os metabólitos regulados positivamente.



Figura 49 – Efeitos de compostos derivados da fendiona na proporção NADP⁺/NADPH em *P. aeruginosa*. Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; OD_{600nm} = 1,0) foram tratadas com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Os extratos celulares foram obtidos e, em seguida, quantificouse o conteúdo intracelular de NADP⁺/NADPH. Os resultados apontaram que o tratamento com Ag-fendiona e Cufendiona induziram a acentuada redução do conteúdo NADPH, resultando no aumento da proporção NADP⁺/NADPH. *P < 0,05 – Variance analysis One-way ANOVA (Dunnett[´]s multiple comparison test) em relação ao controle.

5.16.3 – Metabólitos relacionados ao equilíbrio redox

Tendo observado que os derivados da fendiona promovem a geração de EROs em *P. aeruginosa*, verificamos possíveis alterações em vias relacionadas ao equilíbrio redox. Observamos que Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram depleção dos níveis de glutationa reduzida (GSH). Em paralelo, os compostos estudados aumentaram substancialmente as concentrações intracelulares de glutationa oxidada (GSSG). Ainda, tendo em mente que a via de biossíntese de poliaminas é uma das vias que sustentam a formação de glutationa, investigou-se possíveis alterações desta via induzidas pelos compostos derivados da fendiona. Nossos achados evidenciaram o acúmulo de importantes intermediários da biossíntese de poliaminas (ornitina, cadaverina, putrescina e espermidina). Coletivamente, as mudanças destes metabólitos sugerem o aumento na alteração da proporção GSH/GSSG como resultado do consumo contínuo por enzimas antioxidantes e pelo bloqueio do *turnover* de GSSG \rightarrow GSH, afetado pela depleção de NADPH (**Figuras 51 e 52**).



Figura 50- Alterações na via do metabolismo relacionado à glutationa induzida por compostos derivados da fendiona em *P. aeruginosa*. Culturas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; OD600nm = 1,0) foram tratadas com concentrações referentes a 5×CMI de Ag-fendiona (Ag-fen) e Cu-fendiona (Cu-fen) por 1 h. Os extratos celulares foram obtidos e a abundância relativa dos metabólitos foi quantificado por LC-MS. O tratamento de Ag-fendiona e Cu-fendiona foram *P < 0,05 – Análise de variância One-way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test)em relação ao grupo controle.



Figura 51 – Esquema ilustrando a via de biossíntese de glutationa. Destacou-se os metabólitos alterados em resposta ao tratamento com os compostos derivados da fendiona. Em verde, foram destacados os metabólitos regulados negativamente e, em vermelho, os metabólitos regulados positivamente.

5.13- Efeitos da combinação de compostos derivados da fendiona e antioxidantes no metabolismo de *P. aeruginosa*

O estudo do metaboloma de culturas tratadas com os compostos derivados da fendiona revelou significantes perturbações no metabolismo bacteriano, sustentando a hipótese que estes compostos induzem estresse oxidativo em P. aeruginosa. Conforme observado anteriormente, o co-tratamento com NAC foi capaz de mitigar os efeitos deletérios induzidos pelo tratamento com os compotos derivados da fendiona. Portanto, avaliou-se o perfil metabólico de culturas de P. aeruginosa tratadas com os derivados da fendiona na presença e ausência de antioxidantes, com o objetivo de rastrear as vias metabólicas recuperadas pela ação do antioxidante. Para isto, realizouse análise não-supervisionada de componentes principais (PCA, do inglês principal componente analysis) comparando os perfis metabólicos de sistemas tratados com os derivados da fendiona (Ag-fendiona e Cu-fendiona em concentrações referentes a 5×CMI) e sistemas que receberam o tratamento combinado com antioxidantes (100 mM de tioureia ou 5 mM de NAC). Os resultados da análise multivariada revelaram a clara diferenciação entre o sistema não tratado e os sistemas que receberam o tratamento com Ag-fendiona (Figura 53A) e Cu-fendiona (Figura 53B). Já as células tratadas com os antioxidantes foram agrupadas próximo ao sistema controle, indicando o perfil metabólico destes dois grupos são similares. Por outro lado, os sistemas que receberam cotratamento com os compostos derivados da fendiona e os antioxidantes sofreram um deslocamento no gráfico PCA em direção ao grupo controle (Figuras 53A e 53B). Os resultados indicam que os antioxidantes, tioureia e NAC, foram capazes de evitar os danos relacionados ao tratamento com os derivados, restaurando vias metabólicas essenciais à atividade bactericida destes compostos.

Em seguida, realizou-se a análise das vias metabólicas para identificar as vias restauradas pelo co-tratamento com tioureia, uma vez que este antioxidante apresentou melhores resultados na recuperação do metabolismo bacteriano. Os resultados mostraram que o co-tratamento com Ag-fendiona e tioureia resultou na recuperação significativa (P<0,05) de sete vias metabólicas: metabolismo de arginina e prolina, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo de amino-açúcares, metabolismo de tirosina, biossíntese de peptídeoglicano, metabolismo de nicotinate e nicotinamide além ciclo dos ácidos tricarboxílicos (**Figura 53C**). Já o co-tratamento com Cu-fendiona e tioureia foi capaz de recuperar sete vias metabólicas: biossíntese de aminoacil-t-RNA, metabolismo relacionado à glutationa, via das pentoses fosfato, metabolismo de purinas,

metabolismo de arginina e prolina, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo de cisteína, metabolismo de glicina, serina e treonina (**Figura 53D**).



Figura 52 – Efeitos da combinação de compostos derivados da fendiona e antioxidantes no metabolismo de *P. aeruginosa.*

6- DISCUSSÃO

Apesar dos avanços no desenvolvimento de agentes antimicrobianos nos últimos 70 anos, as doenças infecciosas permanecem entre as cinco principais causas de morte em todo o mundo (CARLET *et al.*, 2012; WHO, 2018; BURNHAM *et al.*, 2019). Neste contexto, *P. aeruginosa* se destaca como um patógeno oportunista humano capaz de causar infecções graves, sobretudo em pacientes com internação prolongada em UTI (MUDAU *et al.*, 2013; TASHIRO *et al.*, 2013; CORNFORTH *et al.*, 2018). Considerando o problema mundial de resistência bacteriana, *P. aeruginosa* é uma preocupação constante relacionada às infecções comunitárias e hospitalares, devido ao surgimento e à rápida disseminação de cepas refratárias a todos os medicamentos antimicrobianos clinicamente disponíveis (STRATEVA & YORDANOV, 2009; SUBEDI *et al.*, 2018; PACHORI *et al.*, 2019). Assim, o fracasso emergente e previsível de terapias antimicrobianas clássicas tem encorajado a comunidade científica a desenvolver novas estratégias para combater os patógenos MDR (DIKEY *et al.*, 2017; BURROWS, 2018).

Uma esperança para o tratamento de infeções multirresistentes é a terapia anti-virulência. A abordagem anti-virulência visa à atenuação da patogênese sem que, necessariamente, haja a inibição do crescimento bacteriano (LEE et al., 2011; DIKEY et al., 2017). Em contraste à antibióticoterapia clássica, que afeta diretamente a viabilidade celular, essa nova abordagem visa "desarmar" o patógeno pela inibição de fatores de virulência. Acredita-se que é possível reduzir os danos ao hospedeiro ao se inibir os mecanismos de patogenicidade bacteriano. Assim, o sistema imune do hospedeiro é capaz de atuar na resolução da infeção. Além disso, uma vez que as drogas anti-virulência não induzem diretamente a morte bacteriana, acredita-se que a pressão de seleção para mutantes resistentes pode ser retardada. Entretanto, já foi descrita a existência de cepas resistentes aos compostos anti-virulência através do aumento da expressão de bombas de efluxo, que auxiliam a bactéria a se adaptar a supressão do sistema QS, com a probabilidade do surgimento de mecanismos de resistência aparentemente dependentes da importância do fator de virulência para o patógeno (RASKO & SPARANDIO, 2010; ALEN et al., 2014; CALVERT et al., 2018). Somado a isto, compostos anti-virulência atingem alvos celulares distintos dos antimicrobianos tradicionais, o que representaria uma grande vantagem na associação terapêutica destes compostos aos antibióticos clássicos, de modo que ambos atuem em seus respectivos alvos celulares e, sinergicamente, contenham a infecção (RASKO & SPARANDIO, 2010; DIKEY et al., 2017). Por estes motivos, diversos grupos vêm relatando a atividade anti-virulência de (i) compostos naturais (HENTZER *et al.*, 2003; RUDRAPPA *et al.*, 2009; ULREY *et al.*, 2014, ASFOUR, 2018; REMY *et al.*, 2018; OKADA *et al.*, 2019), (ii) peptídeos antimicrobianos (POMPILIO *et al.*, 2011; TOTSIKA *et al.*, 2013; MAHLAPUU *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2019; VASILCHENKO & ROGOZHIN, 2019), (iii) concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos clássicos (HUSAIN *et al.*, 2014; SOLLETI *et al.*, 2015; ERWIN *et al.*, 2018; VIEDMA *et al.*, 2018) e (iv) novas moléculas sintetizadas quimicamente (EL-MOWAFY *et al.*, 2014a, 2014b; MILLER *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015; IMPERI *et al.*, 2019; KANNAPPAN *et al.*, 2019). A partir do exposto, no presente trabalho, investigou-se o efeito de compostos derivados da fendiona, Cu-fendiona e Agfendiona, na modulação de mecanismos relacionados à virulência de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa possui um notável conjunto de atributos de virulência, que atuam em sinergia para aumentar a capacidade do patógeno em causar danos ao hospedeiro e, consequentemente, agravar o processo infeccioso e o curso da doença (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; DIKEY *et al.*, 2017). Neste contexto, a produção de peptidases extracelulares funciona como protagonista no processo de invasão e disseminação de infecções causadas por *P. aeruginosa* (KESSLER *et al.*, 1998; GALDINO *et al.*, 2019). A versatilidade de peptidases na fisiopatologia de *P. aeruginosa* é refletida na abundância de regiões genômicas encarregadas para codificá-las. Dentre 5.568 quadros de leitura aberta (ORFs) codificados por *P. aeruginosa* (cepa referência PAO1), 155 (2,8%) ORFs foram preditas como peptidases pseudomonais (STOVER *et al.*, 2000). Além disso, os múltiplos sistemas secretórios sintetizados por este microrganismo são capazes de secretar maciçamente grandes quantidades de peptidases (MORADALI *et al.*, 2017).

Dentre o arsenal de peptidases produzido por *P. aeruginosa*, destaca-se a LasB como o fator de virulência predominantemente encontrado no sobrenadante desta bactéria (MORIHARA & TSUZUKI, 1966; KESSLER *et al.*, 1998). LasB pertence à classe das metalopeptidases e, consequentemente, agentes quelantes são capazes de inibir a atividade elastinolítica desta enzima. Assim, o EDTA e o EGTA impedem a atividade enzimática da LasB ao sequestrarem íons zinco e cálcio, que são essenciais para a atividade proteolítica e estabilização da estrutura tridimensional (KOCABIYIK *et al.*, 1995, AOKI *et al.*, 2010). Da mesma maneira, a 1,10-fenantrolina, um agente quelante de metais divalentes, foi relatado como um potente inibidor de LasB (KESSLER *et al.*, 1998; JAOUADI *et al.*, 2013; GALDINO *et al.*, 2019). Nesse contexto, nosso grupo relatou que a 1,10-fenantrolina não interagiu *in silico* de maneira efetiva com o sítio catalítico de LasB (GALDINO *et al.*, 2019). A interação entre 1,10-fenantrolina e o sítio catalítico de LasB resulta

da formação de uma ponte de higrogênio com uma molécula de água e baixa energia de interação $(-26,25 \text{ kcal mol}^{-1})$ (GALDINO *et al.*, 2019). A partir desse resultado, podemos inferir que a atividade inibitória de 1,10-fenantrolina se deve devido à remoção dos íons Ca²⁺ e Zn⁺², primordiais para a manutenção da plena atividade enzimática de LasB (KOCABIYIK *et al.*, 1995, AOKI *et al.*, 2010). No presente trablho, reportamos a inibição da atividade enzimática de LasB pelo ligante fendiona e seus derivados metálicos, Ag-fendiona e Cu-fendiona. Apesar da similaridade estrutural entre 1,10-fenantrolina e fendiona (um derivado quinônico de 1,10-fenantrolina), as análises *in silico* revelaram que esses dois compostos interagiram com o sítio ativo de LasB de maneira diferente. Ao interagir com o sítio catalítico de LasB, fendiona foi capaz de formar duas pontes de hidrogênio estáveis, uma com o resíduo Arg₁₉₈ e outra com molécula de água, além de apresentar energia de interação de –40.47 kcal mol⁻¹. Assim, podemos inferir que o ligante fendiona é capaz de inibir a atividade de LasB ao bloquear o acesso do substrato proteico ao sítio ativo.

LasB é capaz de clivar uma enorme variedade de substratos proteicos, hidrolisando ligações peptídicas de proteínas e peptídeos especificamente na porção N-terminal, em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (MATTHEWS, 1988; MIYOSHI E SHINODA, 2000). Além disso, o sub-sítio S₁' é uma cavidade hidrofóbica que aceita grupos de cadeia alifática grandes e aromáticos volumosos (CARSON et al., 2012). Esta característica estrutural permite que o esqueleto hidrofóbico dos compostos derivados da fendiona possa interagir com o sítio ativo LasB. Utilizando abordagens in silico, observou-se que os derivados da fendiona se sobrepuseram ao ligante padrão de LasB, o HPI. Em especial, destaca-se que Cu-fendiona ancorou-se à estrutura de HPI englobando todo a molécula, de modo a favorecer interações de π -stacking entre os anéis de ressonância. O ligante HPI se liga ao sítio ativo de LasB nos dos sub-sítios S₁-S₁' através de estabilização de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações fracas de van der Waal (LUTFULLAH et al., 2008). Portanto, dada a compatibilidade estrutural entre os compostos derivados da fendiona e ligante clássico de LasB, HPI, podemos inferir que Cu-fendiona > Agfendiona > fendiona interagem com o sítio ativo de LasB. ZHU e colaboradores (2015) relataram a atividade inibitória de compostos derivados da mercaptoacetamida contra a atividade enzimática de LasB. Os autores observaram que a porção amida dos mercaptoacetamida interage com o resíduo Asn₁₁₂, enquanto o anel fenólico atua mascarando os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Phe₁₂₉, Leu₁₃₂, Val₁₃₇, Ile₁₉₀ e Leu₁₉₇), bloqueando, assim, a atividade enzimática de LasB (ZHU

et al., 2015). De maneira similar, a Cu-fendiona foi capaz de interagir com a região S_1 do sítio catalítico de LasB através da formação de pontes de hidrogênio com os resíduos Arg₁₉₈ e Asn₁₁₂.

Tendo avaliado as interações moleculares entre os compostos derivados da fendiona e o sítio ativo de LasB, verificou-se a eficácia destes compostos em inibir a atividade elastinotítica in *vitro*. Observou-se que o ligante fendiona e seus complexos de coordenação com Ag⁺ e Cu²⁺ foram capazes de inibir a atividade enzimática da LasB purificada de maneira dose-dependente. Adicionalmente, os compostos estudados inibiram a atividade elastinolítica de LasB nos sobrenadantes obtidos do cultivo planctônico e biofilme. Como previsto pelos estudos de ancoragem molecular, Cu-fendiona foi o composto mais eficiente em bloquear a atividade de LasB produzida por P. aeruginosa. Considerando o potencialidade de LasB como um promissor alvo para o desenvolvimento de um novo medicamento anti-virulência, vários outros grupos de pesquisa descreveram a ação inibitória de moléculas naturais e/ou sintéticas sobre a atividade enzimática de LasB. Por exemplo, grupamentos hidroxamato, fosforil, tiol e mercaptoacetil apresentaram excelentes atividades quelantes de íons e, assim, emergiram como candidatas para o desenvolvimento de novos inibidores de LasB (KESSLER et al., 1982; GARNER et al., 2012, ZHU et al., 2015). Neste contexto, os dipeptídeos 2-mercaptoacetil-HSAc-Leu-Phe e HSAc-Phe-Leu (0,1 mM) inibiram 97% da capacidade de LasB em degradar os substratos azocaseína e elastina (KESSLER et al., 1982). Adicionalmente, foi observado que o tratamento da cartilagem articular de coelho com estes dipeptídeos quelantes (1 mM) foi capaz de prevenir os efeitos destrutivos de LasB ao tecido cartilaginoso (KESSLER et al., 1982). Em outro estudo, CATHCART e colaboradores (2011) sintetizaram uma biblioteca de aproximadante 400 dipeptídeos, a fim de encontrar novos compostos anti-LasB. Entre os candidatos, o dipeptídeo Nmercaptoacetil-Phe-Tyr-amida foi o inibidor de LasB que apresentou a menor constante de inibição ($K_i = 41$ nM). Além de inibir a clivagem do substrato fluorogênico sintético, o dipeptídeo HS-CH2-CO-Phe-Tyr-NH2, a 200 µM e 25 µM, também inibiu a degradação dos substratos naturais da LasB, a saber: nucleosídeo difosfato quinase (NDK) e IgG, respectivamente (CATHCART et al., 2011). A acetilação do grupamento tiol nos dipeptídeos de mercaptoacetamida melhorou a estabilidade dos compostos e aumentou a eficácia in vivo (ZHU et al., 2015). Também foi demonstrado que o pró-fármaco tioacetato derivado do dipeptídeo de mercaptoacetamida aumentou a meia-vida de C. elegans infectados pela cepa PAO1 de P.

aeruginosa de $3,9 \pm 0,2$ dias (vermes não tratados) para $6,2 \pm 0,1$ dias (vermes tratados) (ZHU *et al.*, 2015).

Diante da ineficiência dos antibióticos clássicos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, nos últimos anos tem sido proposto o reposicionamento de antibióticos aprovados pelo FDA em concentrações sub-inibitórias, como agentes anti-virulência para P. aeruginosa. Por exemplo, a eritromicina, um macrolídeo comumente utilizado no tratamento de infecções do trato respiratório, é completamente ineficaz no tratamento de infecções causadas por P. aeruginosa. Apesar disso, SAKATA e colaboradores (1993) propuseram o uso deste macrolídeo como um composto anti-virulência. A eritromicina na concentração de 8 µg/ml inibiu completamente a atividade elastinolítica produzida por 58,5% (20/34) dos isolados clínicos de P. aeruginosa (SAKATA et al., 1993). Além disso, observou-se que o tratamento com concentrações sub-inibitórias de doxiciclina (4 µg/ml) diminuiu 67% da produção/secreção de LasB (HUSAIN & AHMAD, 2013). Adicionalmente, a administração de doses sub-inibitórias de tobramicina (0,063 mg/l) em combinação com o composto bismuto-etanoditiol (0,1 µM) diminuiu a produção de LasB em 70% na cepa PAO1 (ALIPOUR et al., 2010). Já a ciprofloxacina, em concentração sub-inibitória (0.06 μ g/ml = $\frac{1}{4} \times CMI$), foi capaz de atenuar o perfil de virulência de cepas clínicas de P. aeruginosa. O tratamento com concentrações sub-inibitórias de ciprofloxacina reduziu em 90% a produção de peptidases, incluindo a elastase, na cepa PAO1 e em outros quatro isolados clínicos MDR (GUPTA et al., 2016). Abordagens anti-virulência foram também sugeridas para o tratamento de infeccões do trato urinário causadas por P. aeruginosa associados ao uso de cateter. Observou-se que ¹/₄×CMI de azitromicina inibiu mais de 50% a atividade de LasB proveniente de isolados de P. aeruginosa recuperados de infecções de trato urinário associados ao uso de cateter (GAO et al., 2015).

A nanotecnologia é outra abordagem que surgiu como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas drogas anti-virulência. O óxido de zinco nanoparticulado (200 μg/ml) foi capaz de inibir completamente a atividade de LasB *in vitro*, além de prevenir os danos teciduais e ulceração epitelial relacionados à ação de LasB em lesões ocasionadas por queimaduras em coelhos (ALI *et al.*, 2017). Da mesma forma, a associação de nanopartículas de selênio e polifenóis (4,5 μg/ml) obtidos a partir do mel inibiu 52,7% da atividade LasB da cepa PAO1 (PRATEEKSHA *et al.*, 2017). Além disso, os metabólitos derivados do fungo *Rhizopus arrhizus*, quando associados a nanopartículas de prata (25 μg/ml), reprimiram 84% da expressão do gene *lasB* em *P. aeruginosa*

(SINGH et al., 2015). Nossos resultados evidenciaram que Ag-fendiona e Cu-fendiona atuaram como potentes inibidores de LasB apresentando constantes de inibição (K_i) de 0.31 μ M e 0.09 μ M, respectivamente. Adicionalmente, o tratamento de células de P. aeruginosa com concentrações sub-inibitórias dos compostos à base de fendiona reprimiu de forma significativa a expressão do gene *lasB*, bem como preveniu a produção e/ou secreção da proteína lasB madura. A expressão do gene lasB e de outros fatores de virulência produzidos por P. aeruginosa são finamente orquestrados pelos sistemas regulatórios do quorum sensing (QS) (SMITH & IGLEWSKI et al., 2003). A relevância dos sistemas de regulação do QS na expressão de lasB foi anteriormente demonstrado através da incubação de cepas clínicas QS-deficientes na presença dos sinalizadores dos intermediários sinalizadores do QS, N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona (OdDHL), Nbutirilhomoserina lactona (BHL); 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS, do inglês Pseudomonal Quinolone Signal) e 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído (IQS, do inglês Integrated Quorumsensing Signal) (HUANG et al., 2003 GEORGE et al., 2005; BERRE et al., 2008; LEE et al., 2015). Observou-se que as moléculas sinalizadoras de QS foram capazes de restaurar a produção de LasB em isolados clínicos QS-deficientes e cepas mutantes $\Delta rhl \in \Delta las$ (WINSON et al., 1995; SMITH et al., 2002; ZHU et al., 2004). Portanto, baseado nos dados da literatura, sugerimos que a inibição de expressão gênica de lasB está relacionada ao efeito dos compostos derivados da fendiona sobre as intricadas redes de regulação de QS. No entanto, ressalta-se a importância de estudos adicionais acerca dos mecanismos moleculares da inibição do OS pelos derivados de fendiona.

A capacidade de *P. aeruginosa* de causar infecções invasivas em diferentes tecidos é primordialmente mediada pela ação de LasB (BEAUFORT *et al.*, 2011; REBOUD *et al.*, 2016). LasB promove a degradação de proteínas de matriz extracelular, além de clivar proteínas de adesão célula-célula e célula-matriz, essenciais para a manutenção da integridade da barreira endotelial, por exemplo (BEAUFORT *et al.*, 2013). Portanto, a inibição da atividade de LasB poderia mitigar os seus efeitos citotóxicos e atenuar a patogênese causada por *P. aeruginosa*. Neste contexto, a co-incubação do sobrenadante de cultivo planctônico de *P. aeruginosa* com Ca-EDTA reduziu o efeito destrutivo da LasB sobre a monocamada de células epiteliais pulmonares A549 (AOKI *et al.*, 2010). O ácido dietileno triamina penta-acético (DTPA) também tem sido proposto como um inibidor de LasB (GI *et al.*, 2014). Os autores reportaram que o tratamento de células de *P. aeruginosa* (cepa PAO1) com 50 µM de DTPA reduziu significativamente a quantidade de LasB

recuperada do sobrenadante de cultivo e, consequentemente, produziu um sobrenadante não tóxico para as células pulmonares (GI *et al.*, 2014). Em nosso estudo, Ag-fendiona e Cu-fendiona (25 μM) foram capazes de bloquear os efeitos tóxicos de LasB em células epiteliais de pulmão A549.

Os ensaios *in vivo* mostraram que o sobrenadante obtido do cultivo da cepa padrão ATCC 27853 foi mais tóxico às larvas de G. mellonella quando comparado ao sobrenadante da cepa resistente 09HC. Seguindo esta mesma linha de pensamento, ANDREJKO e colaboradores (2013) compararm o perfil de virulência da cepa ATCC 27853 e outras duas cepas clínicas. Os autores verificaram que embora todas as cepas produzissem e secretassem peptidases, a produção de LasB tinha maior relevância na infecção de larvas por *P. aeruginosa* (ANDREJKO et al., 2013, 2014). O sobrenadante da cepa ATCC 27853 induziu a ativação do sistema fenoloxidade de G. mellonella, que apresenta papel crucial na regulação dos sistema imunológico de insetos (ANDREJKO et al., 2013). Além disso, em comparação com as outras duas cepas clínicas, o sobrenadante proveniente da cepa ATCC 27853 degradou de maneira mais intensa os polipeptídeos presentes na hemolinfa de G. mellonella (ANDREJKO et al., 2014). Em outro estudo, HWANG & YOON (2019) demonstraram que isolados clínicos MDR de P. aeruginosa foram significativamente menos virulentos quando comparados a cepa antibiótico-susceptível PAO1. O perfil de virulência atenuado observado em cepas MDR foi correlacionado à reduzida atividade de LasB apresentada por estas amostras (HWANG & YOON, 2019). Portanto, uma vez que o sobrenadante obtido do cultivo da cepa ATCC 27853 apresentou efeitos tóxicos mais potentes em larvas de G. mellonella, utilizamos essa cepa para investigar in vivo os efeitos anti-virulência, mais especificamente anti-LasB, do composto Cu-fendiona. Nossos resultados apontaram que Cu-fendiona foi capaz de neutralizar os esfeitos tóxicos induzidos por LasB em larvas de G. mellonella. Em relação a larvas que foram inoculadas com o sobrenadante ativo de P. aeruginosa, foi observado uma melhora na sobrevida das larvas que receberam o sobrenadante previamente neutralizado por Cu-fendiona (50 µM). Neste mesmo sentido, AOKI e colaboradores (2010) mostraram que a injeção de sobrenadante de cultivo de P. aeruginosa em pulmões de camundongos induziram a morte dos animais após 5 dias. No entanto, camundongos que foram inoculados com sobrenadante neutralizado com Ca-EDTA apresentaram um aumento significativo das taxas de sobrevivência quando comparados ao grupo que foi injetado apenas com LasB (AOKI et al. 2010). Isto posto, considerando o protagonismo de LasB na patogenese de P. aeruginosa, a atenuação desta enzima impede o estabelecimento do processo infecciosos deste microrganismo. Trabalhos anteriores

mostraram que a deleção do gene *lasB* promovia infecções menos invasivas em células epiteliais de córnea de coelho (COWELL *et al.,* 2003). De maneira similar, TAN e colaboradores (1999) relataram que camundongos e *C. elegans* infectados com a cepa $\Delta lasB$ apresentaram infecções menos severas quando comparadas à infecção causada pela cepa selvagem (TAN *et al.,* 1999).

Coletivamente, nossos resultados destacam os compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona como inibidores de LasB. Neste contexto, a terapia anti-virulência, e em especial, anti-LasB, representam uma poderosa ferramenta a ser explorada. Um potente inibidor de LasB, como por exemplo, Cu-fendiona, pode ser usado em combinação com antibióticos utilizados na prática médica, afim de maximizar o efeito antimicrobiano (CEGELSKI *et al.*, 2008; CULP *et al.*, 2017). No entanto, apesar da potencialidade de LasB como alvo de uma nova droga anti-virulência, apenas um inibidor de LasB foi submetido a ensaios pré-clínicos. Em 2017, a empresa biofarmacêutica Antabio (Paris, França) recebeu investimentos do CARB-X para financiar o desenvolvimento, até testes clínicos de Fase 1, de um potencial inibidor de LasB em formulações inalatórias para o tratamento de infecções crônicas de *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (ANTABIO, 2019; CARB-X, 2019). Espera-se que este exemplo positivo de desenvolvimento de droga anti-virulência, estimule e acelere a descoberta de novos inibidores de LasB, que possam emergir uma alternativa para combater de forma eficaz as crescentes taxas de insucessos no tratamento desta infecção.

Os regimes tradicionais de antibióticos estão rapidamente se tornando ineficazes para o tratamento de infecções causadas por cepas MDR de *P. aeruginos*a (CHOJNACKI *et al.*, 2018). Por este motivo, a emergente crise de ineficácia dos antibióticos clássicos tem motivado a comunidade científica a continuamente buscar novas moléculas com ação antibiótica. Reforçando esta ideia, recentemente, a OMS recomendou a priorização de pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos contra bactérias Gram-negativas, em especial para *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemas (TACONELLI *et al.*, 2017). Neste cenário, os compostos de coordenação têm se destacado como potencias candidatos a agentes antimicrobianos (REZACOVA *et al.*, 2009; KELLETT *et al.*, 2013; UIVAROSI *et al.*, 2013; KORKMAZ *et al.*, 2017; LOTLIKAR *et al.*, 2019; ROSTAMIZADEH *et al.*, 2019). A síntese de compostos de coordenação, com potencias aplicações terapêuticas, baseia-se em diferentes estados de oxidação dos metais de transição. Esta característica permite que os complexos de coordenação interajam com inúmeros alvos celulares e apresentem mecanismos de ação variados (MENG *et al.*, 2009; THANGAMAN *et al.*, 2016;
SHAH *et al.*, 2018; VINCENT *et al.*, 2018; DAVIS *et al.*, 2019). Alguns fármacos pertencentes à esta classe já são utilizados clinicamente, como exemplo: a cisplatina (cis-[PtCl₂(NH₃)₂]), que é um importante fármaco utilizado na quimioterapia de diferentes tipos de câncer (MENG *et al.*, 2009) e os antimoniais pentavalentes como o pentostan (estibogluconato de sódio coordenado ao íon pentavalente de antimônio-Sb⁵⁺) e glucantime (*N*-metil-D-glucamina coordenado ao antimônio-Sb⁵⁺), que são fármacos de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose (FRÉZARD *et al.*, 2009). Recentemente, o FDA aprovou um fármaco antimicrobiano baseado na coordenação de Galio (Ganite[®]). Os ensaios clínicos mostraram que este composto de coordenação foi capaz de controlar infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa* em camundongos e humanos (GOSS *et al.*, 2018).

As propriedades antimicrobianas de substâncias coordenadas a metais têm sido amplamente exploradas ao longo da história da medicina humana (GOLD et al., 2018). Desde 1500 a.C, povos egípcios utilizavam vasilhames de prata para armazenamento prolongado de água potável (BORKOW & GABBAY, 2009). Na Grécia antiga, soluções contendo íons Ag⁺ eram prescritas para o tratamento de enfermidades estomacais e cicatrização de feridas (BARRAS et al., 2018). De acordo com Mijnendonckx, até a introdução dos antibióticos modernos, soluções de Ag⁺ eram os principais opções antimicrobianas (MIJNENDONCKX et al., 2013). No início do século XX, fármacos derivados da arsfenamina coordenados à prata (Silvol®240 Neo) e bismuto (Salvarsan[®]238) eram as principais alternativas para o tratamento de sífilis e neurosífilis (KLASEN et al., 2000; HOBMANN & CROSSMAN, 2015). Apesar do enorme potencial antimicrobiano de compostos de prata, após o desenvolvimento da antibioticoterapia moderna, o uso desta classe de metalofármacos sofreu uma drástica redução. Atualmente, a deposição de soluções iônicas de prata é usada em superfícies em hospitalares com o objetivo de evitar a transmissão de infecções nosocomiais (BROCHADO et al., 2018). Para o uso humano, a solução de nitrato de prata a 2% continua sendo utilizada na cauterização de verrugas e para o tratamento profilático contra a oftalmia neonatal causada por *Neisseria gonorrhoeae* (KLASEN et al., 2000).

Outro metal com distintas propriedades antimicrobianas é o cobre. O cobre é um metal essencial aos microrganismos aeróbios, uma vez que está envolvido na doação ou acepção de elétrons em enzimas redox-ativas, ou na cadeia de transporte de elétrons (SOLIOZ *et al.*, 2010). Entretanto, o cobre em concentrações intracelulares elevadas pode apresentar efeitos antimicrobianos (VICENT *et al.*, 2018). O uso medicinal do cobre é datado há pelo menos 4.000

anos, sendo inicialmente utilizado como agente antisséptico e no tratamento de feridas (GRASS *et al.*, 2011). Compostos de cobre ainda são amplamente utilizados na medicina moderna como adstringentes, antissépticos, antifúngicos, no tratamento de feridas e em dispositivos anticoncepcionais intra-uterinos (BORKOW & GABBAY, 2009; VICENT *et al.*, 2018; ARMENDARIZ *et al.*, 2019). Além disso, compostos de cobre têm sido utilizados na agricultura como agentes antimicrobianos, algicidas, pesticidas e antifúngicos, e como aditivos para ração animal (RUSSELL *et al.*, 2005; GRASS *et al.*, 2011; BARRETT *et al.*, 2019). Neste contexto, a coordenação de moléculas de prata e cobre a derivados da ligantes orgânicos também tem ganhado destaque pela excelente atividade antimicrobiana.

Diante do potencial antimicrobiano de compostos de coordenação, nosso grupo tem explorado o potencial antimicrobiano dos compostos de coordenação baseados em 1,10fenantrolina e fendiona (McCANN et al., 2012; MAHALAKSHMI et al., 2016; VIGANOR et al., 2017). A estrutura rígida dos anéis aromáticos da 1,10-fenantrolina favorece à formação de complexos estáveis com íons metálicos, o que permite a síntese de uma ampla variedade de compostos de coordenação (ZHAO et al., 2005; ACCORSI et al., 2009; McCANN et al., 2012). Por este motivo, diversos grupos sintetizaram compostos de coordenação derivados da 1,10fenantrolina com potencial atividade antimicrobiana. AHITESH e colaboradores (2013) demonstraram a atividade antibacteriana de complexos de cobre(II) co-coordenado ao dicumarol e 1,10-fenantrolina contra E. coli (CMI₁₀₀ variando de 70 a 600 µg/ml), P. aeruginosa (CMI₁₀₀ variando de 100 a 400 µg/ml), Streptococcus pyogenes (CMI100 variando de 20 a 100 µg/ml) e B. subtilis (CMI₁₀₀ variando de 20 a 70 µg/ml) bem como atividade antifúngica contra C. albicans (CMI₁₀₀ variando de 100 a 200 μ g/ml) e A. niger (CMI₁₀₀ variando de 10 a 200 μ g/ml). SMOLEŃSKI e colaboradores (2013) relataram a atividade antimicrobiana do derivado da 1,10fenantrolina [Ag(phen)(PTA)₂](NO₃)] em S. aureus (CMI = 32 µM), Enterococcus faecalis (CMI = 64 μ M), *P. aeruginosa* (CMI = 16 μ M) e *C. albicans* (CMI = 8 μ M). LOBANA e colaboradores (2014) relataram a ação antimicrobiana de derivados da 1,10-fenantrolina coordenados ao cobre(II) e salicilaldeído tiossemicarbazonas em S. aureus resistente à meticilina (MRSA), Klebsiella pneumoniae, Shigella flexner e P. aeruginosa. Nosso grupo descreveu que ambos Agfendiona e Cu-fendiona apresentaram ação inibitória contra células planctônicas e formadoras de biofilme de P. aeruginosa (VIGANOR et al., 2016). Além disso, esses compostos foram capazes de matar isolados clínicos de Trichomonas vaginalis resistentes ao metronidazol (RIGO et al.,

2018) e exibiram atividade antifúngica contra fungos multiressistentes, tai como: *Phialophora verrucosa*, *Scedosporium apiospermum*, *C. albicans* e *Candida haemulonii* (McCANN *et al.*, 2012, GRANATO *et al.*, 2017, GANDRA *et al.*, 2017). A fendiona erradicou a formação de biofilme produzido por *E. fecalis* através da ação quelante de metais divalentes essenciais para o metabolismo bacteriano (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Ni²⁺) (TAY *et al.*, 2015).

No presente trabalho, investigou-se mais aprofundadamente a ação anti-*P. aeruginosa* dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona. Os derivados da fendiona inibiram o crescimento planctônico de *P. aeruginosa* em diferentes meios de cultivo bacteriano. Os resultados mostraram que os compostos de coordenação Ag-fendiona (CMI = 16 μ M) e Cu-fendiona (CMI = 8 μ M) apresentaram efeitos anti-*P. aeruginosa* mais potentes em relação ao ligante fendiona (CMI = 32 μ M) e aos sais de prata (CMI = 32 μ M) e cobre (CMI = 250 μ M). Além disso, observou-se que Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram ação bactericida enquanto, o ligante orgânico, fendiona, apresentou efeito bacteriostático sobre células de *P. aeruginosa*. RAMAN e colaboradores (2010) demonstraram que compostos de coordenação derivados de 4-aminoantipirino apresentaram atividade antimicrobiana mais eficientes, quando comparados ao ligante orgânico e o íon metálico isoladamente. Os autores relacionaram a melhoria da atividade antimicrobiana de compostos metálicos às alterações físico-químicas que levam à redução da densidade total de elétrons, bem como ao deslocamento dos elétrons π no anel quelante. Estas modificações físico-químicas aumentaram a lipofilicidade dos compostos, otimizando a permeabilidade destas moléculas através do envoltório bacteriano (RAMAN *et al.*, 2010).

A antibióticoterapia combinada tem ganhado cada vez mais relevância no cenário da prática médica, como uma alternativa no combate a microrganismos resistentes (DUNDAR & OTKUN, 2010; TANGDEN, 2014; KHAMENEH *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019). No presente trabalho foram avaliadas as combinações entre o antimicrobiano clássico ceftazidima e os compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona. Os resultados evidenciaram que as combinações de drogas agiram de maneira aditiva para a maioria dos isolados clínicos testados. Entretanto, destaca-se que a associação dos compostos de coordenação (em concentrações sub-inibitórias) e antimicrobianos clássicos reduziu a CMI da ceftazidima em 4 vezes para a cepa resistente 160T. Nosso grupo também relatou o efeito sinérgico da combinação de coordenação de prata derivados da 1,10-fenantrolina (PMCC 75 = Ag₂(3,6,9-tdda)(phen)₄]EtOH e PMCC 77 = [Ag(phen)₃ClO₄]) na

inibição do crescimento planctônico de isolados clínicos resistentes de *P. aeruginosa* (GALDINO, 2015). ZHU (2001) mostrou que os níveis não letais de 2,4,5-triclorofenol (0,2 mM) e do complexo Cu(II)-bis-(1,10-fenantrolina) (0,1 μ M) quando combinados apresentaram uma notável ação sinérgica, observada pela redução significativa de UFCs (0,1% de sobrevivência) em *E. coli*. PAÉZ e colaboradores (2013) observaram o notável sinergismo da combinação entre ciprofloxacina e [Cr(1,10-fenantrolina)₃]³⁺ na inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*.

O conhecimento aprofundado sobre o(s) mecanismo(s) de ação de uma nova molécula antimicrobiana é necessário para otimizar combinações terapêuticas, ou avaliar o risco de indução de resistência. No entanto, embora os mecanismos de ação de drogas antimicrobianas clássicas sejam parcialmente bem definidos, nos últimos anos, inúmeras publicações relatam similaridades na resposta celular bacteriana, independente dos alvos primariamente descritos (KOHANSKI et al., 2008; BELENKY et al., 2015; DWYER et al., 2015; ZHAO et al., 2015). KOHANSKI e colaboradores (2008) observaram aumento nos níveis do radical hidroxil (HO[•]) em culturas de E. coli e S. aureus que receberam o tratamento com antibióticos bactericidas (β-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos). Além disso, um dos principais alvos de compostos de coordenação a metais de transição é a homeostase redox. Cepas de E. coli, P. aeruginosa e S. cerevisiae deficientes dos sistemas enzimáticos antioxidantes são mais sensíveis aos íons Cr, As, Te, Fe e Cu (TOUATI et al., 1995; PARVATIYAR et al., 2005; SUMNER et al., 2005). Baseado neste dado, o acúmulo intracelular de EROs foi mensurado em culturas de P. aeruginosa após o tratamento com os compostos derivados da fendiona. Nossos resultados ilustraram que o tratamento de isolados clínicos de P. aeruginosa com concentrações bactericidas de Ag-fendiona e Cu-fendiona promoveram o aumento da formação de EROs. Estudos de voltametria cíclica revelaram que a 1,10-fenantrolina não apresentou características eletroativas na faixa entre +1000 a -1000 mV. Em contraste, a solução de fendiona mostrou duas ondas de eletroatividade, sendo a primeira onda relativa à redução da quinona à semiquinona ($E_{\frac{1}{2}}$ = -471 mV) e a segunda relativa à redução da semiquinona à hidroquinona ($E_{\frac{1}{2}}$ = -1042 mV). As características eletroativas da fendiona permitem que este ligante atue doando elétrons para outras moléculas, favorecendo o desequilíbrio redox (McCANN et al., 2000; 2012). Além disto, sob condições aeróbicas, compostos de coordenação a metais de transição são capazes de estimular a formação de radicais hidroxil através da reação de Fenton (LIOCHEV & FRIDOVICH, 2002).

PARKER e colaboradores (2012) observaram que íons prata causaram perturbações na cadeia respiratória bacteriana, que culminaram com o aumento da produção de EROs. Entretanto, de acordo com SMITH e colaboradores (2010), o tratamento de *S. aureus* com íons prata induziu a uma resposta protetora de curto prazo aos danos oxidativos. Os autores relataram que o tratamento com 17,7 μM de AgNO₃ (MIC₈₀) promoveu, nos primeiros 30 min, o aumento da atividade enzimática de SOD, catalase e glutationa redutase. Porém, após 60 min, os autores observaram a diminuição da atividade destas enzimas antioxidantes (SMITH *et al.*, 2010). Corroborando os nossos resultados, SILVA (2014) observou que o tratamento de *P. aeruginosa* com derivados da 1,10-fenantrolina induziu a um aumento na expressão de proteínas de resposta ao estresse, incluindo: proteínas envolvidas no enovelamento de polipeptídeos deformados pelo estresse oxidativo, como chaperonas (GroEl) e proteínas de choque térmico (IbpA e GrpE), além de aumentar a expressão de proteínas que apresentam atividade antioxidante em resposta ao estresse celular como tioredoxina e a proteína osmoticamente induzida (OsmC) (SILVA, 2014).

P. aeruginosa depende da respiração como principal via de geração de energia. Durante os processos aeróbios de obtenção de energia, P. aeruginosa também conta com um potente maquinário antioxidante para neutralizar a formação de EROs, sendo os principais a Fe-SOD e Mn-SOD, catalases (KatA, KatB e KatC), hidroperóxidos redutase de alquila (AhpA, AhpB, AhpCF) e hidroperóxido redutase orgânica (Ohr) (HASSET et al., 2007). Frente a um desafio próoxidante, o arsenal antioxidante bacteriano é ativado na tentativa de superar e se adaptar ao agente causador de estresse oxidativo (BELENKY et al, 2015; NINGANAGOUDA et al., 2014). Por este motivo, avaliamos a produção de SOD e catalase em resposta ao tratamento com os compostos derivados da fendiona. Nossos resultados mostraram que os tratamentos com Ag-fendiona e Cufendiona foram capazes de ativar a resposta antioxidante de P. aeruginosa ao induzirem o aumento da atividade de catalase e SOD. NGUYEN e colaboradores (2011) demonstraram que a tolerância aos antibióticos por P. aeruginosa é mediada, em parte, pelo aumento da atividade do maquinário antioxidante. Entretanto, quando a produção de EROs sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante bacteriano são observados fenômenos celulares relacionados ao estresse oxidativo (VATANSEVER et al., 2013). O acúmulo intracelular de EROs induz danos aos constituintes celulares (lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucléicos) podendo levar à morte celular (DALECKI et al., 2017). Por este motivo, investigou-se se o tratamento de P. aeruginosa com Agfendiona e Cu-fendiona seria capaz de induzir danos relacionados ao estresse oxidativo, incluindo: inibição de aconitase, fragmentação oxidativa do DNA e peroxidação lipídica.

O ânion radical O₂⁻⁻ é capaz de inativar a enzima aconitase através da desestruturação dos centros ferro-enxofre (4Fe-4S²⁺), presentes no sítio catalítico desta enzima. Além disso, o radical ânion radical O_2^{-} ao desestruturar os centros 4Fe-4S²⁺ liberam os íons Fe²⁺, que podem amplificar a formação de EROs através da reação de Fenton (VATANSEVER et al., 2013). Observou-se que Ag-fendiona e Cu-fendiona induziram o sutil aumento da atividade de aconitase após 1 h de tratamento; porém, após 3 h de tratamento, a atividade de aconitase foi completamente inibida pela ação dos compostos derivados da fendiona. GORDON e colaboradores (2010) relataram a ação bactericida de materiais poliméricos coordenados ao íon Ag⁺ em S. epidermidis. Os autores descreveram o mecanismo de ação deste composto de coordenação, que envolvia a interação de íons Ag⁺ com grupamentos tiol, perturbando a estrutura de centros [4Fe-4S²⁺] de enzimas do TCA e da cadeia transportadora de elétons (GORDON et al., 2010). Seguindo esta mesma linha de raciocínio, isolados clínicos de A. baumanii resistentes à colistina reduziram a expressão de AcnB (gene responsável pela transcrição da enzima aconitase em *A. baumanii*), além de inibir a ação de algumas enzimas envolvidas na resposta antioxidante como, por exemplo, catalase, SOD e alguilhidroperóxido redutase (POURNARAS et al., 2014). A inibição da atividade de aconitase é uma estratégia adaptativa de cepas resistentes para vencer o estresse oxidativo induzido pela colistina (POURNARAS et al., 2014). Em concordância, os mutantes ∆acnB de E. coli foram mais resistentes aos efeitos bactericidas de quinolonas (GRUER et al., 1997; MARTÍNEZ & ROJO; 2011; PÉREZ-LLARENA & BOU, 2016).

Outro importante indicador relacionados a danos oxidativos é a fragmentação do DNA. A produção acentuada de EROs é capaz de danificar pentoses e bases nitrogenadas constituintes dos nucleotídeos (RASOULY *et al.*, 2018). As EROs reagem com as pentoses abstraindo um átomo de hidrogênio, de modo a favorecer a ruptura da cadeia de DNA (HALLIWELL *et al.*, 1999; RASOULY *et al.*, 2018). Além disso, o reparo inadequado de bases nitrogenadas oxidadas, em especial 8-oxoguanina (8-Oxo-G), também resulta na fragmentação de fita dupla de DNA (FAN *et al.*, 2018). No presente estudo, observou-se um aumento dos níveis de DNA fragmentado em células de *P. aeruginosa* que receberam o tratamento com os derivados da fendiona. De maneira similar, o tratamento de *E. coli* com antibióticos bactericidas (β-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) apresentaram maiores níveis de oxidação e fragmentação do DNA (DWYER *et*

al., 2012). Esses resultados reforçam que, independente do alvo primário, antibióticos bactericidas apresentam os mesmos mecanismos de ação através da indução de estresse oxidativo nos sistemas bacterianos (KOHANSKI *et al.*, 2008; DWYER *et al.*, 2012; RASOULY *et al.*, 2018). Vários trabalhos têm reportado que nanoparticulas de prata e cobre alteram drasticamente os sistemas celulares que culminam com a fragmentação do DNA bacteriano (GRASS *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014; SIVAMARUTHI *et al.*, 2019).

A peroxidação de lipídeos de membrana está envolvida em um mecanismo de morte celular desencadeado pela formação exacerbada de EROs. EROs, por apresentarem alta reatividade, reagem com ácidos graxos poli-insaturados de membrana levando a uma reação em cadeia. Os lipoperóxidos, resultados da peroxidação lipídica, são instáveis e se decompõem formando uma complexa série de compostos incluindo compostos carbônios reativos. O MDA (malondialdeído) e o 4-HNE (4-hidroxi-2(E)-nonenal) são produtos da decomposição dos peróxidos de ácidos graxos poli-insaturados presentes em bicamadas lipídicas. Esses compostos eletrofílicos podem causar danos estruturais e comprometer as funções celulares. Nossos dados revelaram que os elevados níveis intracelulares de MDA em células de P. aeruginosa tratadas com concentrações bactericidas de Ag-fendiona e Cu-fendiona indicam a peroxidação de fosoflipídeos presentes na bicamada lipídica. A peroxidação lipídica pode resultar na desorganização da estrutura de membrana plasmática e culminar em perda de função desta crucial estrutura e, finalmente, morte celular. Com isto em mente, investigou-se os efeitos de derivados da fendiona em parâmetros relacionados à homeostase da membrana externa e plasmática de P. aeruginosa. Nossos resultados mostraram que os compostos derivados da fendiona alteraram drasticamente a fisiologia de membrana de P. aeruginosa modificando o perfil de permeabilidade e resistência ao agente desestabilizador de membranas (SDS), induzindo a despolarização do potencial de membrana plasmática. Os compostos derivados da 1,10-fenantrolina, assim como o ligante fendiona, podem facilmente atravessar a membrana bacteriana devido ao seu elevado grau de lipofilicidade (VIGANOR et al., 2017). Além disso, a membrana bacteriana é primordialmente composta por lipídeos eletronegativos que favorecem a adsorção de compostos de coordenação e são um importante sítio de ação antimicrobiana (LEIMIERE et al., 2013). Uma vez adsorvidos à membrana ou no ambiente intracelular, os compostos de coordenação podem exercer suas ações antimicrobianas, interagindo com biomoléculas (RAMAB et al., 2007; OLADIPO et al., 2013; VIGANOR *et al.*, 2017).

Analises de microscopia eletrônica de varredura sugeriram que a integridade do envoltório celular de E. coli e S. aureus foi gravemente comprometida após a exposição de doses tóxicas de prata (JUNG et al., 2008; LI et al., 2010). Estudos anteriores demostraram que a 1,10-fenantrolina foi capaz de alterar a ultraestrutura de superfície de leveduras de C. albicans (McCANN et al., 2012), do fungo filamentoso demátiáceo Phialophora verrucosa (GRANATO et al., 2016) e epimastigostas de T. cruzi (LANE et al., 1998), indicando a interação prejudicial destes compostos aos envoltórios celulares, causando aumento da permeabilidade/rompimento celular e extravasamento do conteúdo intracelular. Nossos resultados indicaram que a o tratamento de células de P. aeruginosa com concentrações sub-inibitórias de Ag-fendiona e Cu-fendiona, induziram diferentes alterações ultraestuturais que incluíram: formação de grumos celulares, alteração da morfologia, com células arredondadas e de diâmetro reduzido, além de concavidades irregulares por toda superfície bacteriana. Complementarmente, compostos de coordenação a metais de transição são capazes de interromper a atividade da enzima NADH:quinona oxidoredutase, que é um componente da cadeia transportadora de elétrons e contribui para a formação do potencial transmembrana (YAGANZA et al., 2004; LOK et al., 2006; FADEEVA et al., 2015). Em V. harveyi, observou-se que íons prata inibiram a atividade enzimática de NADH:quinona oxidoredutase e que mutações sítio-específicas nesta enzima conferem resistência ao cátion estudado. A inibição dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons promove a dissipação do potencial quimiosmótico da membrana, causando vazamento de prótons e, consequentemente, morte celular (DIBROV et al., 2002). Coletivamente, podemos concluir que que Ag-fendiona e Cu-fendiona levaram à célula bacteriana a um estado de desequilíbrio redox, e, consequentemente, causaram danos celulares irreparáveis que culminaram com a morte bacteriana.

Durante as últimas décadas, a investigação sobre os mecanismos de ação focou na identificação de um alvo direto e específico para a ação de um candidato a antimicrobiano. As abordagens adotadas para identificar o possível alvo de candidato a fármaco são baseadas na aplicação ensaios bioquímicos e genéticos, incluindo: a utilização de biblioteca de mutantes resistentes aos compostos de estudo, ensaios *in vitro* livres de células para identificar a ação inibitória em enzimas centrais na fisiopatologia bacteriana e confirmação de alvos utilizando citometria de fluxo e análise da expressão genica (SCHIRLE *et al.*, 2012; SIANGLUM *et al.*, 2012; EOH *et al.*, 2014; TANG, 2015). No entanto, esta estratégia fornece uma visão simplificada sobre o mecanismo de ação de uma nova molécula. Recentemente, o estudo integrado das "ômicas"

(genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), associadas ao uso de sofisticadas ferramentas de bioinformática, forneceram informações cruciais sobre os processos relacionados à fisiologia bacteriana, sendo potencialmente mais eficientes na determinação de novos alvos à terapia antibiótica (SANTOS et al., 2016). Neste contexto, a investigação do perfil de metabólitos alterados e da reconstrução de suas vias metabólicas fornecem um meio rápido, eficaz e robusto para entender como os microrganismos respondem a um agente antimicrobiano, auxiliando na compreenção dos mecanismos de ação de compostos com ação antibiótica (EOH et al., 2004; KIM & CREEK, 2015; HUSSEIN et al., 2018). O metaboloma é definido como o conjunto de moléculas de baixa massa molecular (metabólitos <1500 Da), que resumem todas as reações metabólicas ocorridas em um organismo. Geralmente essas moléculas incluem espécies orgânicas como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e lipídeos, cada qual com diferentes propriedades químicas (massa molecular, polaridade, solubilidade) e físicas (volatilidade). Portanto, metabólitos apresentam uma diversidade muito maior de arranjos atômicos comparado a proteínas (arranjo de 20 aminoácidos) e transcritos (quatro diferentes bases nitrogenadas ligadas a um acúcar e um fosfato), além de uma ampla variação de concentrações estimadas no intervalo de picomolar a milimolar (EOH et al., 2004; KIM & CREEK, 2015; HUSSEIN et al., 2018). Por este motivo, no presente trabalho avaliou-se as alterações metabólicas em células de P. aeruginosa induzidas pelos compostos derivados da fendiona.

O TCA é uma via metabólica central, crucial para microrganismos aeróbicos pois é a principal fonte produtora de intermediários reduzidos que abastecem a cadeia transportadora de elétrons (SOMERVILLE *et al.*, 2009). Estudos anteriores sugeriram que agentes antimicrobianos bactericidas dependem da regulação positiva dos processos respiratórios, por meio da hiperativação do TCA, como fonte significativa de EROs (KOHANSKI *et al.*, 2008; BELENKY *et al.*, 2015; HUSSEIN *et al.*, 2018). Anteriormente, também foi observado que os antimicrobianos clássicos utilizados no tratatamento de *Mycobacterium tuberculosis* induziam marcadores relacionados ao estresse oxidativo, além de regularem positivamente os genes *gltA1* e *icl* relacionados ao ciclo do TCA (WADDELL *et al.*, 2012). Em concordância com os achados da literatura, observamos que os derivados da fendiona induziram o acúmulo de citrato, α - cetoglutarato, fumarato, bem como o aumento da atividade das enzimas do TCA. Além disso, nossos resultados evidenciaram o desequilíbrio da proporção (NAD⁺/NADH), como resultado da hiperprodução de intermediários reduzidos pelo TCA. Ainda foi observado nos sistemas tratados

com os derivados da fendiona, o acúmulo de FMN, que funciona como grupamento prostético em diversas flavopoteínas com ação oxidorredutase, que constituem a cadeia transportadora de elétrons (NELSON & COX, 2002). Observou-se que a ação bactericida de Ag-fendiona e Cu-fendiona está relacionada à aceleração da respiração celular, impulsionada pela formação de intermediários reduzidos. Mesmo em condições fisiológicas normais, os complexos da cadeia respiratória correspondem ao principal sítio de produção EROs. Portanto, o aumento da respiração celular pode favorecer a formação de EROs e levar à morte quando não é adequadamente neutralizada (VATANSEVER *et al., 2013).* Reforçando esta ideia, observou-se que a co-administração de Ag⁺ com metabólitos do ramo oxidativo do TCA, em especial o citrato, potencializaram a ação bactericida dos íons Ag⁺, uma vez que promoveram maior absorção destes (WANG *et al., 2019).* A combinação de Ag⁺ e citrato apresentou efeito sinérgico no tratamento de infeção urogenitais causadas por *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (WANG *et al., 2019).*

A via das pentoses fosfato tem um papel crucial no crescimento microbiano, fornecendo precursores para a biossíntese de nucleotídeos, essenciais no processo de proliferação, e NADPH que é usado tanto para desintoxicação intracelular de ROS quanto para inúmeros reações catabólicas (NELSON & COX, 2002; LEE et al., 2015). Observou-se que o tratamento de culturas de P. aeruginosa com concentrações bactericidas dos derivados da fendiona bloqueou as vias relacionadas à manutenção do conteúdo de NADPH. Observou-se a diminuição da quantidade relativa de metabólitos relacionados à via das pentoses fosfato (glicose-6-fosfato, glucono-1,5lactona-6-fosfato e sedoheptulose-7-fosfato), bem como associados à via de biossíntese de folato (piranopterina monofosfato ciclico, 7,8-dihidroeopterina, 4-aminobenzoato e tetrahidrofolato). Consequentemente, o bloqueio destas vias levou ao desbalanço na proporção de NADP⁺/NAPDH. Em P. aeruginosa, a via das pentoses fosfato está intimamente relacionada à via Entner-Doudoroff, que é controlada pelo repressor HexR. O HexR modula a expressão da via fosforilativa de metabolização da glucose, detectando especificamente os níveis do metabólito 2-ceto-3-desoxi-6fosfogluconato, um intermediário na via Entner-Doudoroff (DADDAOUA et al., 2009). Neste contexto, tem sido demonstrado que a inibição oxidativa da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, em resposta a um estimulo pró-oxidante, leva ao redirecionamento da glicólise para a vida das pentoses fosfato, para atender a demanda de NAPDH (CHEN et al., 2011; DENG et al., 2014). Portanto, ao inibir esta via metabólica, os derivados da fendiona provocam o colapso da

NADP⁺/NADPH, impossibilitando que *P. aeruginosa* neutralize com seu arsenal antioxidante, dependente de NADPH, a formação de EROs.

A glutationa reduzida (GSH, γ -glutamilcistenilglicina) participa de inúmeras funções celulares, incluindo: regulação do transporte de enxofre, conjugação de metabólitos, desintoxicação xenobiótica, resistência a antibióticos, detoxificação de EROs (LUSHCHAK et al., 2012; WONGSAROJ et al., 2018). A GSH pode ser oxidada diretamente por agentes oxidantes como, por exemplo, radical hidroxila (HO') e peroxinitrito (ONOO⁻) (LUSHCHAK et al., 2012). A oxidação direta de GSH leva à produção de radicais tiil, cuja fusão resulta na forma oxidada da glutationa (GSSG). Além disso, GSH é utilizado como co-substrato de importantes enzimas antioxidantes, como por exemplo as glutationa peroxidases, que atuam reduzindo o peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos (CHANG et al., 2008). O tratamento combinado com colistina e doripenem em culturas de A. baumanii perturbou o equilíbrio do conteúdo de GSH (MAIFIAH et al., 2016). Nesta mesma linha de pensamento, BELENKY e colaboradores (2015) relataram que β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas alteraram o metabolismo da glutationa e reduziram a relação GSH/GSSG, indicando uma resposta antioxidante contínua consistente com a geração de oxidantes (BELENKY et al., 2015). Além disso, observou-se que 2-(2-nitrovinil)furano foi capaz de diminuir significativamente a GSH e aumentar concomitantemente GSSG (AJIBOYE et al., 2015). Em outro trabalho, observou-se que nanopartículas de prata foram capazes de disparar a resposta antioxidande de E. coli, e depletar os reservatórios de GSH bacteriano para conter efeitos deletérios da formação de EROs (LIAO et al., 2019). Os resultados obtidos da análise do metaboloma de células tratadas com os compostos derivados da fendiona revelou que Ag-fendiona e Cu-fendiona levaram à depleção do pool de GSH, ao mesmo tempo que foi observado o aumento significativo de GSSG. Apesar de ter sido observada a redução dos níveis de GSH, verificamos o acúmulo de importantes intermediários da via de biossíntese de GSH, sobretudo da via de poliaminas. Esses resultados sugerem que os compostos derivados da fendiona tentam incrementar a biossíntese de GSH, na tentativa de neutralizar as EROs. No entanto, o aumento da via de biossíntese de GSH não é suficiente para suprir a demanda contínua por este tripeptídeo. Além disso, os compostos derivados da fendiona inibiram a reciclagem da GSSG para GSH, através da depleção do pool intracelular de NADPH.

Coletivamente, os dados obtidos nos permitem inferir que o desbalanço da homeostase redox é o evento chave que desencadeia a ação bactericida dos compostos Ag-fendiona e Cufendiona. A relação entre o estresse oxidativo e a ação bactericida de agentes antimicrobianos foi extensivamente investigada (KOHANSKI et al., 2008; WANG et al., 2010; ALLISON et al., 2011; BELENKY & COLLINS, 2011; FOTI et al., 2012; DWYER et al., 2015). GRANT e colaboradores (2012) demonstraram que a ação anti-M. tuberculosis de clofazimina foi dependente da formação de EROs, e o co-tratmento com o tioureia foi capaz de reverter a ação bactericida desta droga em cepas deficientes da enzima isocitrato liase (GRANT et al., 2012). De maneira similar, foi demonstrado que drogas bactericidas apresentaram suas atividades atenuadas pela ação da tioureia ou pelo quelante de ferro 2,2'-dipiridil, que reduz os efeitos in vivo da reação de Fenton (IMLAY et al, 1988; KOHANSKI et al., 2008). Nesta mesma linha de pensamento, GOSWAMI e colaboradores (2014) observaram que os antioxidantes glutationa e ácido ascórbico aumentaram as CIMs de vários antibióticos fluoroquinolonas para E. coli e reduziram a sensibilidade à ciprofloxacina em ensaios de difusão de disco. Em concordância com os dados da literatura, foi observado que NAC foi capaz de neutralizar os danos oxidativos induzidos por Ag-fendiona e Cufendiona em P. aeruginosa. Observou-se que tanto o NAC como a tioureia foram capazes de restaurar vias metabólicas relacionadas ao efeito bactericida dos compostos estudados, incluindo: metabolismo de aminoácidos que abastecem o TCA (alanina, aspartato, glicina e glutamato), via das pentoses fosfato, metabolismo de nicotinate e nicotinamide, biossíntese de aminoacil-t-RNA, metabolismo da glutationa.

Atualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos representa um dos maiores desafios para a saúde pública em escala global. Diante da enorme demanda pelo desenvolvimento de novas moléculas ativas no tratamento de infecções persistentes, destaca-se a importância da contínua busca por novos agentes antibacterianos que atuem de forma multimodal, garantindo o rápido efeito bactericida e impedindo assim a rápida emergência de cepas MDRs. Neste contexto, desde o início dos anos 1950, com o trabalho pioneiro de Francis Dwyer, tem sido relado o potencial antibacteriano de complexos metálicos de 1,10-fenantrolina (DWYER *et al.*, 1952). Apesar dos resultados promissores, a potencialidade de compostos de coordenação não foi adequadamente explorado pela indústria farmacêutica uma vez que os mecanismos de ação de compostos derivados da 1,10-fenantrolina permanecem ainda obscuros. Considerando a importância de se compreender os alvos celulares e mecanismos de ação de uma nova droga antimicrobiana, o presente trabalho teve como objetivo investigar os possíveis eventos celulares relacionados à ação anti-*P. aeruginosa* de compostos derivados da fendiona coordenação à prata e cobre. Neste

contexto, Ag-fendiona e Cu-fendiona se destacam como possíveis candidatos a metalofármacos para o tratamento de infeccões persistentes de *P. aeruginosa*, por: (i) apresentarem ação bactericida em cepas MDRs; (ii) exibirem efeitos aditivos ou sinérgicos na combinação com o carbapenema clássico, ceftazidima e; (iii) por serem capazes de desarmar a virulência de *P. aeruginosa*, através da inibição de LasB, um relevante atributo de virulência secretado por este patógeno. Os compostos derivados da fendiona apresentam ação pleotrópica, atuando em diferentes alvos celulares de P. aeruginosa. Os resultados discutidos no presente trabalho mostraram que a formação de EROs representa o principal componente do mecanismo de ação bactericida destes compostos. Ainda, a comparação do perfil metabólico de sistemas na presença e ausência de compostos derivados da fendiona revelou que estes compostos atuam em diferentes vias metabólicas, incluindo a via de biossíntese de NADPH (via das pentoses fosfato e biossíntese de folato). Assim, confirmando os dados anteriormente discutidos, a deficiência de NADPH resulta na insuficiência da resposta antioxidante de P. aeruginosa. Diante da complexidade do mecanismo desta classe de compostos, ressalta-se a importância do uso de abordagens avançadas de biologia de sistemas que fornecam informações mais robustas acerca das principais alvos e respostas celulares que resultam na morte do microrganismo. McCANN e colaboradores (2012) reportaram que Ag-fendiona e Cu-fendiona são adequadamente tolerados em modelos murinos e de G. mellonella. No entanto, reforça-se a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre a eficácia destes compostos em modelo murino. Por fim, diante da enorme demanda pelo desenvolvimento de novas moléculas ativas no tratamento de infecções causadas por P. aeruginosa, o presente trabalho evidenciou os efeitos bactericidas e anti-virulência de compostos de coordenação derivados da fendiona.

7- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- Os derivados da fendiona representam um potencial agente anti-virulência devido a sua atividade inibitória sobre LasB;
- Os metalocompostos de fendiona, em especial Cu-fendiona, foram capazes de formar interações estáveis com o sítio ativo de LasB, e assim, impedir sua atividade enzimática *in vitro*;
- Estes compostos modularam negativamente a expressão do gene *lasB* bem como a produção/secreção da enzima LasB madura;
- Ag-fendiona e Cu-fendiona foram capazes de neutralizar os danos às células epiteliais pulmonares induzidos por LasB;
- Os derivados da fendiona foram capazes de reverter a toxidez mediada pelo sobrenadante de *P. aeruginosa*, rico em LasB, bem como pela LasB purificada em larvas de *G. mellonella*;
- Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram excelente atividade bactericida em isolados clínicos MDR de *P. aeruginosa* cultivados em diferentes meios;
- A combinação entre os compostos derivados da fendiona e o antimicrobiano clássico (ceftazidima) gerou um FIC índice aditivo ou sinérgico de maneira cepadependente;
- Os compostos derivados da fendiona coordenados à prata e cobre apresentaram ação pleotrópica em *P. aeruginosa,* alterando a ultraestrutura e a fisiologia das membranas externas e plasmáticas, DNA e metabolismo redox;
- Ag-fendiona e Cu-fendiona promoveram danos celulares relacionados ao estresse oxidativo, como peroxidação lipídica e clivagem de DNA;
- Os compostos derivados da fendiona afetaram dramaticamente o metabolismo global de *P. aeruginosa*;
- A hiperativação do TCA e da respiração celular, foram as principais fontes de formação de EROs, por este motivo, esses compostos desregularam a proporção NAD⁺/NADH;

- Ag-fendiona e Cu-fendiona modularam negativamente a via das pentoses fosfato, reduzindo assim o conteúdo intracelular de NADPH;
- O baixo conteúdo de NADPH impossibilitou o *turnover* de GSSG à GSH, resultando na completa depleção da forma reduzida da glutationa,
- O co-tratamento de Ag-fendiona e Cu-fendiona com agentes antioxidantes promoveram o resgate de vias metabólicas afetadas pelo tratamento com os derivados da fendiona.

8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCORSI G, LISTORTI A, YOOSAF K, ARMAROLI N. **1,10-Phenanthrolines: versatile building blocks** for luminescent molecules, materials and metal complexes. Chem Soc Rev 2009; 38: 1690-700.
- ADEOYE O, OLAWUMI J, OPEYEMI A, CHRISTIANIA O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA Assist Reprod 2018; 22: 61-66.
- AEBI H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984; 105: 121-126.
- AFESSA B, SHORR AF, ANZUETO AR, CRAVEN DE, SCHINNER R, KOLLEF MH. Association between a silver-coated endotracheal tube and reduced mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. Chest 2010, 137: 1015–1021.
- AL-WRAFY F, BRZOZOWSKA E, GÓRSKA S, GAMIAN A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. Postepy Hig Med Dosw 2017; 71: 78-91.
- ALBESA I, BECERRA MC, BATTÁN PC, PÁEZ PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. Biochem Biophys Res Commun 2004; 317: 605-609.
- ALESSIO E, MESSORI L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. Molecules 2019; 24: 1995-1999.
- ALFARO-FUENTES I, CASTRO-RAMÍREZ R, ORTIZ-PASTRANA N, MEDINA-GUERRERO RM, SOLER-JIMÉNEZ LC, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I, BETANCOURT-LOZANO M, IBARRA-CASTRO L, BARBA-BEHRENS N, FAJER-ÁVILA EJ. Novel antihelmintic activity of tinidazole coordination compounds relevance of the metal ion and structural properties. J Inorg Biochem 2017; 176:159-167.
- ALI SS, MORSY R, EL-ZAWAWY NA, FAREED MF, BEDAIWY MY. Synthesized zinc peroxide nanoparticles (ZnO2-NPs): a novel antimicrobial, anti-elastase, anti-keratinase, and antiinflammatory approach toward polymicrobial burn wounds. Int J Nanomedicine 2017; 12: 6059-6073.
- ALIPOUR M, SUNTRES ZE, LAFRENIE RM, OMRI A. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 684-693
- ALLEN RC, POPAT R, DIGGLE SP, BROWN SP. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? Nat Rev Microbiol 2014; 12: 300-308.
- AMARAL L, MARTINS A, SPENGLER G, MOLNAR J. Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. Front Pharmacol 2014; 4:168.
- ANACONA JR, OSORIO I. Synthesis and antibacterial activity of copper (II) complexes with sulphathiazole and cephalosporin ligands. Transition Met Chem 2008; 33: 517-521.
- ANDES D, ANON J, JACOBS MR, CRAIG WA. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antimicrobial therapy of respiratory tract infections. Clin Lab Med 2004; 24:477–502.

- ANDREINI C, BERTINI I, ROSATO A. A hint to search for metalloproteins in gene banks. Bioinformatics 2004; 20: 1373–1380.
- ANVERSA L, TIBURCIO MGS, RICHINI-PEREIRA VB, RAMIREZ LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. Rev Assoc Med Bras 2018; 64: 281-289.
- ANVISA. **Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde** - Rede RM, Brasília, 2016. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede_rm/2016/agosto/relatorio_editorial.p df. Acesso em 16 de maio de 2019.
- AOKI N, ISHII Y, TATEDA K, SAGA T, KIMURA S, KIKUCHI Y, KOBAYASHI T, TANABE Y, TSUKADA H, GEJYO F, YAMAGUCHI E. Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallolactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. Antimicrobial Agents Chemother 2010; 54: 4582-4588.
- ARIAS-LEÓN G. (2018) Resistance Mechanisms: A Problem and an Approach to the Solution. In: ORTIZ-RUIZ G., DUEÑAS-CASTELL C. (eds) Sepsis. Springer, New York, 2018. p. 73-96.
- ARMENDARIZ ONTIVEROS M, QUINTERO Y, LLANQUILEF A, MOREL M, ARGENTEL MARTÍNEZ L, GARCÍA GARCÍA A, GARCIA A. Anti-biofouling and desalination properties of thin film composite reverse osmosis membranes modified with copper and iron nanoparticles. Materials (Basel) 2019; 12: e2081.
- ASFOUR HZ. Anti-Quorum Sensing Natural Compounds. J Microsc Ultrastruct 2018; 6: 1–10.
- ATICHARTPONGKUL S, VATTANAVIBOON P, WISITKAMOL R, JAROENSUK J, MONGKOLSUK S, FUANGTHONG M. Regulation of organic hydroperoxide stress response by two OhrR homologs in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One 2016; 11: e0161982.
- AZAM MW, KHAN AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. Drug Discov 2018; 24: 350-359.
- AZGHANI AO, MILLER EJ, PETERSON BT. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. Lung 2000; 178: 261-269.
- BAINBRIDGE T, FICK RB. Functional importance of cystic fibrosis immunoglobulin G fragments generated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. J Lab Clin Med 1989; 114: 728–733.
- BALASUBRAMANIAN D, SCHNEPER L, KUMARI H, MATHEE K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acids Res 2013; 41:1–20.
- BALLO MK, RTIMI S, MANCINI S, KIWI J, PULGARIN C, ENTENZA JM, BIZZINI A. Bactericidal activity and mechanism of action of copper-sputtered flexible surfaces against multidrug-resistant pathogens. Appl Microbiol Biotechnol 2016;100: 5945-5953.
- BANBULA A, POTEMPA J, TRAVIS J, FERNANDEZ-CATALAN C, MANN K, HUBER R, BODE W, MEDRANO F. Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the *Staphylococcus aureus* metalloproteinase at 1.72 A resolution. Structure 1998; 6: 1185-1193.
- BARRAS F, AUSSEL L, EZRATY B. Silver and Antibiotic, New Facts to an Old Story. Antibiotics 2018; 7: e79.

- BARRETT TC, MOK WWK, MURAWSKI AM, BRYNILDSEN MP. Enhanced antibiotic resistance development from fluoroquinolone persisters after a single exposure to antibiotic. Nat Commun. 2019; 10:1177
- BARTLETT JG, GILBERT DN, SPELLBERG B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. Clin Infect Dis 2013; 56:1445-50.
- BASSETTI M, DE WAELE JJ, EGGIMANN P, GARNACHO-MONTERO J, KAHLMETER G, MENICHETTI F, NICOLAU DP, PAIVA JA, TUMBARELLO M, WELTE T, WILCOX M, ZAHAR JR, POULAKOU G. Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. Intensive Care Med 2015; 41: 776-795.
- BASSETTI M, MERELLI M, TEMPERONI C, ASTILEAN A. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013; 12: 22.
- BASSETTI M, POULAKOU G, RUPPE E, BOUZA E, VAN HAL SJ, BRINK A. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. Intensive Care Med 2018; 43: 1464–1475.
- BEAUFORT N, CORVAZIER E, HERVIEU A, CHOQUEUX C, DUSSIOT M, LOUEDEC L, CADY A, DE BENTZMANN S, MICHEL JB, PIDARD D. The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. Cell Microbiol 2011; 13: 1149-1167.
- BEAUFORT N, CORVAZIER E, MLANAOINDROU S, DE BENTZMANN S, PIDARD D. Disruption of the endothelial barrier by proteases from the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: implication of matrilysis and receptor cleavage. PLoS One 2013; 8: e75708.
- BELENKY P, YE JD, PORTER CB, COHEN NR, LOBRITZ MA, FERRANTE T, JAIN S, KORRY BJ, SCHWARZ EG, WALKER GC, COLLINS JJ. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. Cell Rep 2015; 13: 968-980.
- BELL RA, KRAMER JR. Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: critical review. Environ Toxicol Chem 1999; 18: 9–22.
- BELLUCO S, LOSASSO C, PATUZZI I, RIGO L, CONFICONI D, GALLOCCHIO F, CIBIN V, CATELLANI P, SEGATO S, RICCI A. Silver as antibacterial toward *Listeria monocytogenes*. Front Microbiol 2016; 7: 307.
- BEVER A, IGLEWSKI BH. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. J Bacteriol 1988; 170: 4309–4314.
- BHATTACHARYA R, MUKHERJEE P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60: 1289-1306.
- BLAIR JMA, WEBBER MA, BAYLAY AJ, OGBOLU DO, PIDDOCK LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Rev Microbiol 2015; 13: 42-51.
- BONDARENKO OM, SIHTMÄE M, KUZMIČIOVA J, RAGELIENĖ L, KAHRU A, DAUGELAVIČIUS R. Plasma membrane is the target of rapid antibacterial action of silver nanoparticles in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Nanomedicine 2018; 13: 6779-6790.

- BORKOW G, GABBAY J. COPPER. An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. Current Chemical Biology 2009; 3: 272-278.
- BOUCHER HW, TALBOT GH, BENJAMIN DK JR, BRADLEY J, GUIDOS RJ, JONES RN, MURRAY BE, BONOMO RA, GILBERT D. 10 x 20 Progress--development of new drugs active against gramnegative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2013; 56: 1685-1694.
- BOUCHER HW, TALBOT GH, BRADLEY JS, EDWARDS JE, GILBERT D, RICE LB, SCHELD M, SPELLBERG B, BARTLETT J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009; 48: 1-12.
- BOUSKILL NJ, BARNHART EP, GALLOWAY TS, HANDY RD, FORD TE. Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* sodA, htpX and mt gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential in situ biomarker of environmental health. FEMS Microbiol Ecol 2007; 60: 276-286.
- BRAHMA U, KOTHARI R, SHARMA P, BHANDARI V. Antimicrobial and anti-biofilm activity of hexadentated macrocyclic complex of copper (II) derived from thiosemicarbazide against *Staphylococcus aureus*. Sci Rep 2018; 8: 8050.
- BREIDENSTEIN EBM, FUENTE-NÚÑEZ C, HANCOCK REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol 2011; 19: 419-26.
- BREINL A, TODD JL. Atoxyl in the treatment of trypanosomiasis. Br Med J 1907; 1:132-134.
- BROCHADO AR, TELZEROW A, BOBONIS J, BANZHAF M, MATEUS A, SELKRIG J, HUTH E, BASSLER S, ZAMARREÑO BEAS J, ZIETEK M, NG N, FOERSTER S, EZRATY B, PY B, BARRAS F, SAVITSKI MM, BORK P, GÖTTIG S, TYPAS A. **Species-specific activity of antibacterial drug combinations**. Nature 2018; 559: 259–263.
- BROWN ED, WRIGHT GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. Nature 2016; 529: 336-343.
- BRUCE MC, PONCZ L, KLINGER JD, STERN RC, TOMASHEFSKI JF, DEARBORN DG. Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1985; 132: 529-535.
- BURNHAM JP, OLSEN MA, KOLLEF MH. Re-estimating annual deaths due to multidrug-resistant organism infections. Infect Control Hosp Epidemiol 2019; 40: 112-113.
- BURROWS LL. The Therapeutic Pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. ACS Infect 2018; 7:1041-1047.
- CALDERÓN IL, ELÍAS AO, FUENTES EL, PRADENAS GA, CASTRO ME, ARENAS FA, PÉREZ JM, VÁSQUEZ CC. Tellurite-mediated disabling of [4Fe-4S] clusters of *Escherichia coli* dehydratases. Microbiology 2009; 155:1840-1846.
- CALVERT MB, JUMDE VR, TITZ A. Pathoblockers or antivirulence drugs as a new option for the treatment of bacterial infections. Beilstein J Org Chem 2018; 14: 2607-2617.
- CAMERON JC, PAKRASI HB. Glutathione facilitates antibiotic resistance and photosystem I stability during exposure to gentamicin in cyanobacteria. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 3547-3550.

- CARLET J, JARLIER V, HARBARTH S, VOSS A, GOOSSENS H, PITTET D. Ready for a world without antibiotics? the pensières antibiotic resistance call to action. Antimicrob Resist Infect Control 2012; 1: 11.
- CARSON L, CATHCART GR, CERI H, WALKER B, GILMORE BF. Comparison of the binding specificity of two bacterial metalloproteases, LasB of *Pseudomonas aeruginosa* and ZapA of Proteus mirabilis, using N-alpha mercaptoamide template-based inhibitor analogues. Biochem Biophys Res Commun 2012; 422: 316-320.
- CATHCART GR, QUINN D, GREER B, HARRIOTT P, LYNAS JF, GILMORE BF, WALKER B. Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2670-2678.
- CEGELSKI L, MARSHALL GR, ELDRIDGE GR, HULTGREN SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nat Rev Microbiol 2008; 6:17-27.
- CEZÁRIO RC, MORAIS LD, FERREIRA JC, COSTA-PINTO RM, DARINI ALC, GONTIJO-FILHO PP. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. Enferm Infec Microbiol Clin 2009; 27: 269-274.
- CHANG EL, SIMMERS C, KNIGHT DA. Cobalt Complexes as Antiviral and Antibacterial Agents. Pharmaceuticals 2010; 3: 1711-1728.
- CHAREST G, SANCHE L, FORTIN D, MATHIEU D, PAQUETTE B. **Optimization of the route of platinum drugs administration to optimize the concomitant treatment with radiotherapy for glioblastoma implanted in the Fischer rat brain.** J Neurooncol 2013; 115: 365-373.
- CHATZINIKOLAOU I, ABI-SAID D, BODEY GP, ROLSTON KV, TARRAND JJ, SAMONIS G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: Retrospective analysis of 245 episodes. Arch Intern Med 2000; 160: 501-509.
- CHEN C, PANKOW CA, OH M, HEATH LS, ZHANG L, DU P, XIA K, PRUDEN A. Effect of antibiotic use and composting on antibiotic resistance gene abundance and resistome risks of soils receiving manure-derived amendments. Environ Int 2019; 128:233-243.
- CHEN F, PANDEY D, CHADLI A, CATRAVAS JD, CHEN T, FULTON DJ. **Hsp90 regulates NADPH** oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production. Antioxid Redox Signal 2011; 14: 2107-2119.
- CHENG V, ABDUL-AZIZ MH, ROBERTS JA, SHEKAR K. Optimising drug dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. J Thorac Dis 2018; 10: 629-641.
- CHOJNACKI M, PHILBRICK A, WUCHER B, REED JN, TOMARAS A, DUNMAN PM, WOZNIAK RAF. Development of a broad-spectrum antimicrobial combination for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* corneal infections. Antimicrob Agents Chemother 2018; 63: e01929-18.
- CHUNG IY, KIM BO, JANG HJ, CHO YH. Dual promoters of the major catalase (KatA) govern distinct survival strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep 2016; 6: 31185.

- CIRIOLO MR, CIVITAREALE P, CARRÌ MT, DE MARTINO A, GALIAZZO F, ROTILIO G. Purification and characterization of Ag, Zn-superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* exposed to silver. J Biol Chem. 1994; 269: 25783-25787.
- CLARDY J, FISCHBACH MA, WALSH CT. New antibiotics from bacterial natural products. Nat Biotechnol 2006; 24:1541-1550.
- CLAUSS-LENDZIAN E, VAISHAMPAYAN A, DE JONG A, LANDAU U, MEYER C, KOK J, GROHMANN E. Stress response of a clinical *Enterococcus faecalis* isolate subjected to a novel antimicrobial surface coating. Microbiol Res 2018; 207: 53-64.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S23. Twenty-third informational supplement. NCCLS, Wayne, Pensylvania. 2013.
- CORNFORTH DM, DEES JL, IBBERSON CB, HUSE HK, MATHIESEN IH, KIRKETERP-MØLLER K, WOLCOTT RD, RUMBAUGH KP, BJARNSHOLT T, WHITELEY M. *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome during human infection. Proc Natl Acad Sci USA 2018; 115: 125-134.
- COWELL BA, TWINING SS, HOBDEN JA, KWONG MS, FLEISZIG SM. Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. Microbiol 2003; 149: 2291-2299.
- CROUSILLES A, MAUNDERS E, BARTLETT S, FAN C, UKOR EF, ABDELHAMID Y, BAKER Y, FLOTO A, SPRING DR, WELCH M. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? Future Microbiol 2015; 10:1825-1836.
- CULP E, WRIGHT GD. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. J Antibiot 2017; 70: 366-377.
- DADDAOUA A, KRELL T, RAMOS JL. Regulation of glucose metabolism in Pseudomonas: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. J Biol Chem 2009; 284: 21360-21368.
- DALECKI AG, CRAWFORD CL, WOLSCHENDORF F. Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. Advances in Microbial Physiology 2017; 70: 193-260.
- DAVIDSON JF, WHYTE B, BISSINGER PH, SCHIESTL RH. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 May 14;93(10):5116-21.
- DAVIS SC, LI J, GIL J, HEAD C, VALDES J, GLINOS GD, SOLIS M, HIGA A, PASTAR I. Preclinical evaluation of a novel silver gelling fiber dressing on *Pseudomonas aeruginosa* in a porcine wound infection model. Wound Repair Regen 2019; 27: 360-365.
- DENG X, LIANG H, ULANOVSKAYA OA, JI Q, ZHOU T, SUN F, LU Z, HUTCHISON AL, LAN L, WU M, CRAVATT BF, HE C. Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2014; 196: 2499-2513.
- DEVEREUX M, MCCANN M, LEON V, KELLY R, SHEA DO, MCKEE V. Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity of manganese (II) complexes of 2,2dimethylpentanedioic and 3,3dimethylpentanedioic acid: X-ray crystal structure of [Mn(3dmepda)(phen)2].5H2O (3dmepdaH2=3,3dimethylpentanedioic acid and PHEN=1,10phenanthroline) Polyhedron 2003; 22: 3187-94.

- DEVEREUX M, MCCANN M, LEON V, MCKEE V, BALL RJ. Synthesis and catalytic activity of manganese(II) complexes of heterocyclic carboxylic acids: X-ray crystal structures of [Mn(pyr)2]n, [Mn(dipic)(bipy)2]·4.5H2O and [Mn(chedam)(bipy)] · H2O (pyr=2-pyrazinecarboxylic acid; DIPIC=pyridine2,6-dicarboxylic acid; CHEDAM=chelidamic acid(4-hydroxypyridine-2,6dicarboxylic acid); BIPY=2,2-bipyridine). Polyhedron 2002; 21: 1063-71.
- DEVEREUX M, MCCANN M, O'SHEA D, O'CONNOR D, KIELY E, MCKEE V, NAUGHTON D, FISHER A, KELLETT A, WALSH M, EGAN D, DEEGAN C. Synthesis, superoxide dismutase mimetic and anticancer activities of metal complexes of 2,2-dimethylpentanedioic acid (2dmepdaH2) and 3,3dimethylpentanedioic acid (3dmepdaH2): X-ray crystal structures of [Cu(3dmepda)(bipy)]2·6H2O and [Cu(2dmepda)(bipy)(EtOH)]2·4EtOH (bipy = 2,2'Bipyridine). Bioinorg Chem Appl 2006; 2006: 80283.
- DEVEREUX M,MCCANN M, LEON V,GERAGHTY M, MCKEE V, WIKAIRA J. Synthesis and biological activity of manganese(II) complexes of phthalic and isophthalic acid: X-ray crystal structures of [Mn(ph)(Phen)2(H2O)]· 4H2O, [Mn(Phen)2(H2O)2]2(Isoph)2(Phen)·12H2O and {[Mn(Isoph)(bipy)]4· 2.75biby}n(phH2 = Phthalic Acid; isoph = Isophthalic Acid; phen = 1,10Phenanthroline; bipy = 2,2-Bipyridine). Met Based Drugs 2000; 7: 275–288.
- DIBROV P, DZIOBA J, GOSINK KK, HASE CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2668–2670.
- DICKEY SW, CHEUNG GYC, OTTO M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. Nat Rev Drug Discov 2017;16: 457-471.
- DORING G, DALHOFF A, VOGEL O, BRUNNER H, DROGE U, BOTZENHART K. *In vivo* activity of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model. J Infect Dis 1984; 149: 532-537.
- DOS SANTOS BS, DA SILVA LC, DA SILVA TD, RODRIGUES JF, GRISOTTO MA, CORREIA MT, NAPOLEÃO TH, DA SILVA MV, PAIVA PM. Application of omics technologies for evaluation of antibacterial mechanisms of action of plant-derived products. Front Microbiol 2016; 7: 1466.
- DRISCOLL JA, BRODY SL, KOLLEF MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs 2007; 67: 351-368.
- DRUSANO GL. Stepping Off the Resistance Treadmill. J Infect Dis 2017; 216: 150-152.
- DUNDAR D, OTKUN M. In-vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Yonsei Med J 2010; 51: 111-116.
- DUSZYŃSKA W, ROSENTHAL VD, DRAGAN B, WĘGRZYN P, MAZUR A, WOJTYRA P, TOMALA A, KÜBLER A. Ventilator-associated pneumonia monitoring according to the INICC project at one centre. Anaesthesiol Intensive Ther 2015; 47: 34-39.
- DUTTA S, CHOWDHURY G, GATES KS. Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA. J Am Chem Soc 2007; 129: 1852-1853.
- DWYER DJ, COLLINS JJ, WALKER GC. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2015, 55: 313-332.
- DWYER DJ, KOHANSKI MA, HAYETE B, COLLINS JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. Mol Syst Biol 2007; 3:91.

- EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE NETWORK (EARS-Net). **Reporting protocol 2018.** Disponível em: https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ears-net-reporting-protocol-2018. Acesso em 17 de dezembro de 2018.
- EL-MOWAFY SA, ABD EL GALIL KH, EL-MESSERY SM, SHAABAN MI. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Pathog 2014; 74: 25-32.
- EL-MOWAFY SA, SHAABAN MI, ABD EL GALIL KH. Sodium ascorbate as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. J Appl Microbiol 2014; 117: 1388-1399.
- ENGLAND J, BILL E, WEYHERMÜLLER T, NEESE F, ATANASOV M, WIEGHARDT K. Molecular and electronic structures of homoleptic six-coordinate cobalt(i) complexes of 2,2:6,2-terpyridine, 2,2-bipyridine, and 1,10-phenanthroline. An experimental and computational study. Inorg Chem 2015; 54:12002-12018.
- EOH H, RHEE KY. Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 6554-6559.
- EOH H, WANG Z, LAYRE E, RATH P, MORRIS R, BRANCH MOODY D, RHEE KY. Metabolic anticipation in *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Microbiol 2017; 2: 17084.
- EOH H. Metabolomics: A window into the adaptive physiology of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2014; 94: 538-543.
- EPAND RF, SAVAGE PB, EPAND RM. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). Biochim Biophys Acta 2007; 1768: 2500-2509.
- ERICKSON DL, ENDERSBY R, KIRKHAM A, STUBER K, VOLLMAN DD, RABIN HR, MITCHELL I, STOREY DG. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. Infect Immun 2002; 70: 1783–1790.
- ERWIN AL. The New Versus Old Target Debate for Drug Discovery. Antimicrobial Resistance in the 21st Century pp 563-592
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, EUROPEAN MEDICINES AGENCY. The bacterial challenge: time to react. Disponível em: http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/antimicrobial_resistance/EMEA-576176-2009.p d f. Acesso em: 21 de maio de 2019.
- EZRATY B, VERGNES A, BANZHAF M, DUVERGER Y, HUGUENOT A, BROCHADO AR, SU SY, ESPINOSA L, LOISEAU L, PY B, TYPAS A, BARRAS F. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. Science 2013; 340: 1583-1587.
- FADEEVA MS, BERTSOVA YV, EURO L, BOGACHEV AV. **Cys377 residue in NqrF subunit confers Ag**⁺ sensitivity of Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. Biochemistry 2011; 76: 186–195.
- FALAGAS ME, KASIAKOU SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrugresistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 2005; 40:1333-1341.

- FAN XY, TANG BK, XU YY, HAN AX, SHI KX, WU YK, YE Y, WEI ML, NIU C, WONG KW, ZHAO GP, LYU LD. Oxidation of dCTP contributes to antibiotic lethality in stationary-phase mycobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2018; 115: 2210-2215.
- FENG QL, WU J, CHEN GQ, CUI FZ, KIM TN, KIM JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res 2000; 52: 662–668.
- FERNANDES CM, FONSECA FL, GOLDMAN GH, PEREIRA MD, KURTENBACH E. A reliable assay to evaluate the virulence of Aspergillus nidulans using the alternative animal model *Galleria mellonella* (Lepidoptera). Bioprotocol 2017; 7: e2329.
- FERREIRA AP, WERMELINGER ED. Concentrações séricas de metais e suas implicações para a saúde pública. J Health Sci Inst 2013; 31:13-19.
- FISCHBACH MA, WALSH CT. Antibiotics for emerging pathogens. Science 2009; 325: 1089-1093.
- FLEITAS MARTÍNEZ O, CARDOSO MH, RIBEIRO SM, FRANCO OL. Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9: 74.
- FLEMING-DUTRA KE, HERSH AL, SHAPIRO DJ, BARTOCES M, ENNS EA, FILE TM, FINKELSTEIN JA, GERBER JS, HYUN DY, LINDER JA, LYNFIELD R1, MARGOLIS DJ, MAY LS, MERENSTEIN D, METLAY JP, NEWLAND JG, PICCIRILLO JF, ROBERTS RM, SANCHEZ GV, SUDA KJ, THOMAS A, WOO TM, ZETTS RM, HICKS LA. Prevalence of inappropriate antibiotic prescriptions among us ambulatory care visits, 2010-2011. JAMA 2016; 315: 1864-1873.
- FLORES-MIRELES AL, WALKER JN, CAPARON M, HULTGREN SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol 2015; 13: 269–284.
- FOLKESSON A, JELSBAK L, YANG L, JOHANSEN HK, CIOFU O, HØIBY N, MOLIN S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 841-851.
- FOTI JJ, DEVADOSS B, WINKLER JA, COLLINS JJ, WALKER GC. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. Science 2012; 336: 315- 319.
- FREI A, RUBBIANI R, TUBAFARD S, BLACQUE O, ANSTAETT P, FELGENTRÄGER A, MAISCH T, SPICCIA L, GASSER G. Synthesis, characterization, and biological evaluation of new Ru(II) polypyridyl photosensitizers for photodynamic therapy. Med Chem 2014; 57: 7280-7292.
- FRÉZARD F, DEMICHELI C, RIBEIRO RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules 2009; 14: 2317-2336.
- GAJDÁCS M. The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design. Molecules 2019; 24: e892.
- GALDIERO S, FALANGA A, CANTISANI M, TARALLO R, DELLA PEPA ME, D'ORIANO V, GALDIERO M. **Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins.** Curr Protein Pept Sci 2012; 13: 843–854.
- GALDINO ACM, DE OLIVEIRA MP, RAMALHO TC, DE CASTRO AA, BRANQUINHA MH, SANTOS ALS. Anti-virulence strategy against the multidrug-resistant bacterial pathogen *Pseudomonas*

aeruginosa: pseudolysin (elastase b) as a potential druggable target. Curr Protein Pept Sci 2019; 20: 471-487.

- GALDINO ACM, VIGANOR L, ZICCARDI M, NUNES APF, DOS SANTOS KRN, BRANQUINHA MH, SANTOS ALS. Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa.* Enferm Infecc Microbiol Clin 2017; 35: 630-637.
- GALDINO ACM, DE OLIVEIRA MP, RAMALHO TC, DE CASTRO AA, BRANQUINHA MH, SANTOS ALS. Anti-virulence strategy against the multidrug-resistant bacterial pathogen *pseudomonas aeruginosa*: pseudolysin (elastase b) as a potential druggable target. Curr Protein Pept Sci 2019; 20: 471-487.
- GALDINO, Anna Clara Milesi. Atividade antibiótica e anti-virulência de compostos derivados da 1,10fenantrolina coordenados à prata sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação (Mestrado-Ciências, Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- GANDRA RM, MC CARRON P, FERNANDES MF, RAMOS LS, MELLO TP, AOR AC, BRANQUINHA MH, MCCANN M, DEVEREUX M, SANTOS ALS. Antifungal potential of copper(ii), manganese(ii) and silver(i) 1,10-phenanthroline chelates against multidrug-resistant fungal species forming the *Candida haemulonii* complex: impact on the planktonic and biofilm lifestyles. Front Microbiol 2017; 8: 1257.
- GAO F, CHAMBON P, OFFERMANNS S, TELLIDES G, KONG W, ZHANG X, LI W. **Disruption of TGF**β signaling in smooth muscle cell prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysm. Biochem Biophys Res Commun 2014; 454: 137-143.
- GARDNER PR. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. Methods Enzymol 2002; 349: 9-23.
- GARDNER PR. Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. Biosci Rep 1997; 17: 33-42.
- GARNER AL, STRUSS AK, FULLAGAR JL, AGRAWAL A, MORENO AY, COHEN SM, JANDA KD. 3-Hydroxy-1-alkyl-2-methylpyridine-4(1H)-thiones: inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor lasb. ACS Med Chem Lett 2012; 3: 668-672.
- GARRETT ES, PERLEGAS D, WOZNIAK DJ. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). J Bacteriol 1999; 181: 7401-7404.
- GELLATLY SL, HANCOCK RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis 2013; 67: 159-73.
- GHORBAL SK, MAALEJ L, CHOURABI K, KHEFACHA S, OUZARI HI, CHATTI A. Antioxidant Defense Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of Iron-Cofactored Superoxide Dismutase in Response to UV-C Radiations. Curr Microbiol 2016; 73:159-164.
- GIRÃO E, LEVIN AS, BASSO M, GOBARA S, GOMES LB, MEDEIROS EAS, BARONE AA, COSTA SF. Trends and outcome of 1121 nosocomial blood- stream infections in intensive care units in a Brazilian hospital, 1999—2008. Inter J of Infect Diseases 2008; 12: 145—146.
- GLASSER NR, KERN SE, NEWMAN DK. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force. Mol Microbiol 2014; 92: 399-412.

- GOLDSTEIN JL, EISEN GM, AGRAWAL N, STENSON WF, KENT JD, VERBURG KM. Reduced incidence of upper gastrointestinal ulcer complications with the COX-2 selective inhibitor, valdecoxib. Alimentary Pharmacology and Therapy 2005; 20: 527–538.
- GOLOVKINE G, FAUDRY E, BOUILLOT S, VOULHOUX R, ATTRÉE I, HUBER P. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. PLoS Pathog 2014; 10: e1003939.
- GÓMEZ-ZORRILLA S, MORANDEIRA F, CASTRO MJ, TUBAU F, PERICHE E, CAÑIZARES R, DOMINGUEZ MA, ARIZA J, PEÑA C. Acute inflammatory response of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections: a prospective study. Microb Drug Resist 2017; 23: 523-530.
- GONCALVES AD, FRANCA TCC, CAETANO MS, RAMALHO TC. Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. J Biomol Struct Dyn 2014; 32, 301-307.
- GORDON O, VIG SLENTERS T, BRUNETTO PS, VILLARUZ AE, STURDEVANT DE, OTTO M, LANDMANN R, FROMM KM. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4208-4218.
- GOSWAMI M, SHARMA D, KHAN NM, CHECKER R, SANDUR SK, JAWALI N. Antioxidant supplementation enhances bacterial peritonitis in mice by inhibiting phagocytosis. J Med Microbiol 2014; 63: 355-66.
- GRANATO MQ, GONÇALVES DS, SEABRA SH, MCCANN M, DEVEREUX M, DOS SANTOS AL, KNEIPP LF. **1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds Are Effective in Disturbing** Crucial Physiological Events of *Phialophora verrucosa*. Front Microbiol 2017; 8:76.
- GRASS G, RENSING C, SOLIOZ M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 1541–1547.
- GRUER MJ, ARTYMIUK PJ, GUEST JR. The aconitase family: three structural variations on a common theme. Trends Biochem Sci 1997; 22: 3-6.
- GU M, IMLAY JA. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. Mol Microbiol 2011; 79: 1136–1150.
- GUPTA P, CHHIBBER S, HARJAI K. Sub-inhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation e reduction of virulence. Indian J Med Res 2016; 143: 643-651.
- GURIDI A, DIEDERICH AK, AGUILA-ARCOS S, GARCIA-MORENO M, BLASI R, BROSZAT M, SCHMIEDER W, CLAUSS-LENDZIAN E, SAKINC-GUELER T, ANDRADE R, ALKORTA I, MEYER C, LANDAU U, GROHMANN E. New antimicrobial contact catalyst killing antibiotic resistant clinical and waterborne pathogens. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2015; 50: 1-11.
- GUSAROV I, SHATALIN K, STARODUBTSEVA M, NUDLER E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. Science 2009; 325: 1380-1384.
- HABASH MB, PARK AJ, VIS EC, HARRIS RJ, KHURSIGARA CM. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 5818-30.

- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000. 936 p.
- HAMPTON T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. JAMA 2013; 310: 1661-1663.
- HAN M, WANG X, DINGB H, JINB M, YUB L, WANGB J, YUA X. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*. Enzyme Microb Technol 2014; 54: 32-37.
- HANGAUER DG, MONZINGO AF, MATTHEWS BW. An interactive computer graphics study of thermolysin-catalyzed peptide cleavage and inhibition by *N*-carboxymethyl dipeptides. Biochemistry 1984. 23: 5730–5741.
- HANI Z, ASFOUR. Anti-Quorum Sensing Natural Compounds. J Microsc Ultrastruct 2018; 6: 1-10.
- HASSETT DJ, IMLAY JA. Bactericidal antibiotics and oxidative stress: a radical proposal. ACS Chem Biol 2007; 2: 708-710.
- HAYAKAWA S, KAWAMURA M, SATO T, HIRANO T, KIKUCHI T, WATANABE A, FUJIMURA S. An *a*-Lipoic acid derivative, and anti-ROS agent, prevents the acquisition of multi-drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother 2019; 25: 28-33.
- HECK LW, MORIHARA K, MCRAE WB, MILLER E.J. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Infect Immun 1986; 51: 115–118.
- HEHRE WJ, DEPPMEIER BJ, KLUNZINGER PE. PC SPARTAN Pro molecular modeling for desktop. Chem. Eng. News 1999; 77: 2.
- HEIMER SR, EVANS DJ, MUN JJ, STERN ME, FLEISZIG SM. Surfactant protein D contributes to ocular defense against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of dry eye disease. PLoS One 2013; 8: e65797.
- HEISS A, FREISINGER B, HELD-FÖHN E. Enhanced antibacterial activity of silver-ruthenium coated hollow microparticles. Biointerphases 2017;12: 05G608.
- HENTZER M, EBERL L, NIELSEN J, GIVSKOV M. Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections. BioDrugs. 2003; 17: 241-250.
- HITESH A, PAL SINGH P, HOODA A. Studies on Temperature Variation and Angular Distortion in Submerged Arc Welded Butt Joint. Advanced Materials Research 2013; 699: 656-661.
- HOBMAN JL, CROSSMAN LC. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. J Med Microbiol 2015; 64: 471-97.
- HOFER U. The cost of antimicrobial resistance. Nature Rev Microbiol 2019; 17: 3.
- HOGARDT M, HEESEMANN J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. Int J Med Microbiol 2010; 300: 557–562.
- HOGARDT M, HOBOTH C, SCHMOLDT S, HENKE C, BADER L, HEESEMANN J. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 2007; 195: 70-80.

- HOLMES AH, MOORE LS, SUNDSFJORD A, STEINBAKK M, REGMI S, KARKEY A, GUERIN PJ, PIDDOCK LJ. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. Lancet 2016; 387: 176-187.
- HONG DJ, BAE IK, JANG IH, JEONG SH, KANG HK, LEE K. Epidemiology and Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Chemother 2015; 47: 81-97.
- HOON MLS, IMOTO S, NOLAN J, MIYANO S. Open source clustering software Bioinformatics 2004; 20: 1453–1454.
- HOUSE JE. Introduction to Coordination Chemistry. Inorganic Chemistry (2 ed) 2013; 553-590.
- HOYLE BD, WILLIAMS LJ, COSTERTON JW. Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Infect Immun 1993; 61:777-780.
- HUSAIN FM, AHMAD I. Doxycycline interferes with quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation in gram-negative bacteria. World J Microbiol Biotechnol 2013; 29: 949-957.
- HUSSEIN M, HAN ML, ZHU Y, SCHNEIDER-FUTSCHIK EK, HU X, ZHOU QT, LIN YW, ANDERSON D, CREEK DJ, HOYER D, LI J, VELKOV T. Mechanistic insights from global metabolomics studies into synergistic bactericidal effect of a polymyxin b combination with tamoxifen against cystic fibrosis mdr *Pseudomonas aeruginosa*. Comput Struct Biotechnol J 2018; 16: 587-599.
- HWANG W, YOON SS. Virulence characteristics and an action mode of antibiotic resistance in multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Sci rep 2019; 9:487.
- IMLAY JA, FRIDOVICH I. Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. Free Radic Res Com 1991; 1: 59–66.
- IMPERI F, FISCARELLI EV, VISAGGIO D, LEONI L, VISCA P. Activity and impact on resistance development of two antivirulence fluoropyrimidine drugs *in Pseudomonas aeruginosa*. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9: 49.
- JACQUELINE C, NAVAS D, BATARD E, MIEGEVILLE AF, LE MABECQUE V, KERGUERIS MF, BUGNON D, POTEL G, CAILLON J. *In vitro* and *in vivo* synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:45-51.
- JAMAN Z, KARIM MR, DUMENYO K, MIRZA AH. Antibacterial activities of new Schiff bases and intermediate silyl compounds synthesized from 5substituted-1,10-phenanthroline-2,9-dialdehyde. Adv Microbiol 2014; 4, 1140-53.
- JAOUADI B, ZARAÎ JAOUADI N, REKIK H, NAILI B, BEJI A, DHOUIB A, BEJAR S. Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase. Int J Biol Macromol 2013; 60: 165-177.
- JIANG S, DESLOUCHES B, CHEN C, DI ME, DI YP. Antibacterial properties and efficacy of a novel splunc1-derived antimicrobial peptide, α4-short, in a murine model of respiratory infection. MBio 2019; 10: e00226-19.
- JOHNSON GG, MORRIS JM, BERK RS. The extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* exhibiting elastase activity. Can J Microbiol 1967; 13: 711-719.

- JUNG WK, KOO HC, KIM KW, SHIN S, KIM SH, PARK YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2008; 74:2171-2178.
- KANNAPPAN A, SRINIVASAN R, NIVETHA A, ANNAPOORANI A, PANDIAN SK, RAVI AV. Antivirulence potential of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its clinical isolates. Appl Microbiol Biotechnol 2019; *in press*.
- KELLETT A, PRISECARUA A, SLATORA C, MOLPHYA Z, M. MCCANN. Metal-based antimicrobial protease inhibitors. Curr Med Chem 2013; 20, 3134-51.
- KESSLER E, ISRAEL M, LANDSHMAN N, CHECHICK A, BLUMBERG S. *In vitro* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase by metal-chelating peptide derivatives. Infect Immun 1982; 38, 716-723.
- KESSLER E, SAFRIN M, GUSTIN JK, OHMAN DE. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. J Biol Chem 1998; 273: 30225-30231.
- KEYS DA, MCALISTER-HENN L. Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 1990; 172: 4280-4287.
- KHAMENEH B, DIAB R, GHAZVINI K, FAZLY BAZZAZ BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. Microb Pathog 2016; 95: 32-42.
- KIM DH AND CREEK DJ. What role can metabolomics play in the discovery and development of new medicines for infectious diseases? Bioanalysis 2015; 7: 629-631.
- KIPNIS E, SAWA T, WIENER-KRONISH J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect 2006; 36: 78–91.
- KLASEN HJ. **Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses.** Burns 2000; 26: 117-30.
- KOCABIYIK S, ERGIN E, TURKOGLU S. Effects of metals on elastase from *Pseudomonas aeruginosa* SES-938-1. Biol Trace Elem Res 1995; 50: 25-31.
- KOHANSKI MA, DEPRISTO MA, COLLINS JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. Mol Cell 2010; 37: 311-320.
- KOHANSKI MA, DWYER DJ, HAYETE B, LAWRENCE CA, COLLINS JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell 2007; 130: 797-810.
- KOMEDA S, CASINI A. Next-generation anticancer metallodrugs. Curr Top Med Chem 2012; 12: 219-235.
- KORKMAZ N, AYDIN A, KARADAĞ A, YANAR Y, MAAŞOĞLU Y, ŞAHIN E, TEKIN Ş. New bimetallic dicyanidoargentate(I)-based coordination compounds: Synthesis, characterization, biological activities and DNA-BSA binding affinities. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2017;173: 1007-1022.
- KORKMAZA SA, KARADAĞ A, AYDINC A, YERLID Y, SOYLUE MS. Binuclear cyanido complexes containing [Pt(CN)4]2– building block: Synthesis, crystal structures, magnetic properties and anticancer activities. Inorganica Chimica Acta 2016; 453: 154-168

- KOSTOVA I, SASO L. Advances in research of Schiff-base metal complexes as potent antioxidants. Curr Med Chem 2013; 20:4609-4632.
- LA ROSA R, JOHANSEN HK, MOLIN S. Convergent metabolic specialization through distinct evolutionary paths in *Pseudomonas aeruginosa*. MBio 2018; 9: e00269-18.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
- LAFAYETTE SL, HOULE D, BEAUDOIN T, WOJEWODKA G, RADZIOCH D, HOFFMAN LR, BURNS JL, DANDEKAR AA, SMALLEY NE, CHANDLER JR, ZLOSNIK JE, SPEERT DP, BERNIER J, MATOUK E, BROCHIERO E, ROUSSEAU S, NGUYEN D. Cystic fibrosis-adapted *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing lasR mutants cause hyperinflammatory responses. Sci Adv 2015; 1: e1500199.
- LAN L, MURRAY TS, KAZMIERCZAK BI, HE C. *Pseudomonas aeruginosa* OspR is an oxidative stress sensing regulator that affects pigment production, antibiotic resistance and dissemination during infection. Mol Microbiol 2010;75: 76-91.
- LANE JE, BOGITSH BJ, RIBEIRO-RODRIGUES R, KRAL MV, JONES MM, CARTER CE. Ultrastructural effects of the chelating agent 1,10-phenanthroline on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. Parasitol Res 1998; 84: 399-402.
- LEE JH, KIM YG, CHO MH, KIM JA, LEE J. 7-fluoroindole as an antivirulence compound agains *Pseudomonas aeruginosa.* FEMS Microbiol Lett. 2012; 329: 36-44.
- LEE JS, HEO YJ, LEE JK, CHO YH. KatA, the Major Catalase, Is Critical for Osmoprotection and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Infect Immun 2005; 73: 4399–4403.
- LEE W, LEE DG. Lycopene-induced hydroxyl radical causes oxidative DNA damage in Escherichia coli. J Microbiol Biotechnol 2014; 24: 1232-1237.
- LEE YL, LIU CE, CHO WL, KUO CL, CHENG WL, HUANG CS, LIU CS. Presence of cytomegalovirus DNA in leucocytes is associated with increased oxidative stress and subclinical atherosclerosis in healthy adults. Biomarkers 2014; 19: 109-113.
- LEIDAL KG, MUNSON KL, JOHNSON MC, DENNING GM. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. J Interferon Cytokine Res 2003; 23: 307–318.
- LEMIRE JA, HARRISON JJ, TURNER RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. Nat Rev Microbiol 2013; 11: 371-384.
- LENHARD JR, SMITH NM, QUACH CD, NGUYEN TQ, DOAN LH, CHAU J. Bacterial brothers in arms: cooperation of Staphylococcus aureus and *Pseudomonas aeruginosa* during antimicrobial exposure. J Antimicrob Chemother 2019; 20: dkz247.
- LI WR, XIE XB, SHI QS, ZENG HY, OU-YANG YS, CHEN YB. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85: 1115-1122.
- LIAO S, ZHANG Y, PAN X, ZHU F, JIANG C, LIU Q, CHENG Z, DAI G, WU G, WANG L, CHEN L. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa.* Int J Nanomedicine 2019; 14: 1469-1487.

- LIMA CD, CALEGARI-SILVA TC, PEREIRA RM, SANTOS SA, LOPES UG, PLOTKOWSKI MC, SALIBA AM. ExoU activates NF-KB and increases IL-8/KC secretion during *Pseudomonas aeruginosa* infection. PLoS One 2012; 7: e41772.
- LIMMATHUROTSAKUL D, SANDOE JAT, BARRETT DC, CORLEY M, HSU LY, MENDELSON M, COLLIGNON P, LAXMINARAYAN R, PEACOCK SJ, HOWARD P. 'Antibiotic footprint' as a communication tool to aid reduction of antibiotic consumption. J Antimicrob Chemother 2019; *in press.*
- LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. Redox Rep 2002; 7: 55-57.
- LISTER PD, WOLTER DJ, HANSON ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 582-610.
- LIU Y, QIN R, ZAAT SAJ, BREUKINK E, HEGER M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. J Clin Transl Res 2015; 1: 140–167.
- LOBANA S, INDORIA S, JASSAL AK, ARORA DS, JASINSKI JP. Synthesis, structures, spectroscopy and antimicrobial properties of complexes of copper (II) with salicylaldehyde N-substituted thiosemicarbazones and 2,20bipyridine or 1,10-phenanthroline. Euro J Med Chem 2014; 76: 145-154.
- LODISE TP, PATEL N, KWA A, GRAVES J, FURUNO JP, GRAFFUNDER E, LOMAESTRO B, MCGREGOR JC. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3510-3515.
- LOK CN, HO CM, CHEN R, HE QY, YU WY, SUN H, TAM PK, CHIU JF, CHEN CM. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J Proteome Res 2006; 5: 916-924.
- LORÈ NI, CIGANA C, DE FINO I, RIVA C, JUHAS M, SCHWAGER S, EBER L, BRAGONZI A. Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. PLoS One 2012; 7: e35648.
- LORIAN V. Antibiotcs in Laboratory Medicine. 5. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2005, p. 365.
- LOTLIKAR SR, GALLAWAY E, GRANT T, POPIS S, WHITED M, GURAGAIN M, ROGERS R, HAMILTON S, GERASIMCHUK NG, PATRAUCHAN MA. Polymeric composites with silver (i) cyanoximates inhibit biofilm formation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Polymers 2019; 11: e1018.
- LOUIE AY, MEADE TJ. A cobalt complex that selectively disrupts the structure and function of zinc fingers. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 6663-6668.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265–275.
- MACOMBER L, ELSEY, SP, HAUSINGER RP. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (class II) is the primary site of nickel toxicity in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 2011; 82: 1291-1300.

- MACOMBER L, IMLAY JA. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 8344–8349.
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, DUNLAP PV, CLARK DP. Microbiologia de Brock. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAHAPATRA DK, BHARTI SK, ASATI V SINGH SK. Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. Eur J Med Chem 2019; 174: 142-158.
- MAHLAPUU M, HÅKANSSON J, RINGSTAD L, BJÖRN C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. Front Cell Infect Microbiol 201; 6:194.
- MARIENCHECK WI, ALCORN JF, PALMER SM. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 28: 528-537.
- MARQUART ME, DAJCS JJ, CABALLERO AR, THIBODEAUX BA, O'CALLAGHAN RJ. Calcium and magnesium enhance the production of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV, a corneal virulence factor. Med Microbiol Immunol 2005; 194: 39-45.
- MARTÍNEZ JL, ROJO F. **Metabolic regulation of antibiotic resistance.** FEMS Microbiol Rev 2011; 35: 768-789.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ K, FLORES N, CASTAÑEDA HM, MARTÍNEZ-BATALLAR G, HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, RAMÍREZ OT, GOSSET G, ENCARNACIÓN S, BOLIVAR F. New insights into Escherichia coli metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. Microb Cell Fact 2012; 11: 46.
- MASIP L, VEERAVALLI K, GEORGIOU G. The many faces of glutathione in bacteria. Antioxid Redox Signal 2006; 8:753-762.
- MATTHEWS BW. Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. Acc Chem Res 1988; 21: 333–340.
- MCCANN M, GERAGHTY M, DEVEREUX M, O'SHEA D, MASON J, O'SULLIVAN L. Insights into the mode of action of the anti-Candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. Met Based Drugs 2000; 7: 185-93.
- MCCANN M, KELLETT A, KAVANAGH K, DEVEREUX M, SANTOS AL. Deciphering the antimicrobial activity of phenanthroline chelators. Curr Med Chem 2012; 19: 2703-14.
- MCCANN M, MCGINLEY J, NI K, O'CONNOR M, KAVANAGH K, MCKEE V, COLLERAN J, DEVEREUX M, GATHERGOOD N, BARRON N, PRISECARU A, KELLETT A. A new phenanthroline-oxazine ligand: synthesis, coordination chemistry and atypical DNA binding interaction. Chem Commun 2013; 49: 2341-3.
- MCCANN M, SANTOS ALS, SILVA BA, ROMANOS MTV, PYRRHO AS, DEVEREUX M, KAVANAGH K, FICHTNERG I, KELLETT A. *In vitro* and *in vivo* studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6dione and its copper (II) and silver (I) complexes. Toxicol Res 2012; 1: 47-54.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049-6655.

- MCCORMICK CC, HOBDEN JA, BALZLI CL, REED JM, CABALLERO AR, DENARD BS, TANG A, O'CALLAGHAN RJ. Surfactant protein D in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. Ocular Immun Inflam 2007; 15: 371–379.
- MELETIS G, SKOURA L. Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic Resistance to Mcr Genes. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2018; 13: 198-206.
- MENG L, FU C, LU Q. Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes. Stress in Natural Science 2009; 19: 801-810.
- MIA GI, JUNHUI JEONG, KEEHOON LEE, KANG-MU LEE, MASANORI TOYOFUKU, DONG EUN YONG, SANG SUN YOON, JAE YOUNG CHOIA. A drug-repositioning screening identifies pentetic acid as a potential therapeutic agent for suppressing the elastase-mediated virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 7205–7214.
- MIJNENDONCKX K, LEYS N, MAHILLON J, SILVER S, VAN HOUDT R. Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance. BioMetals 2013; 26: 609–621.
- MIYOSHI S, SHINODA S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microb Infect 2000; 2: 91–98.
- MJOS KD, ORVIG C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. Chem. Rev.201411484540-4563
- MOON JH, JANG E, SHIM KS, LEE JY. *In vitro* effects of N-acetyl cysteine alone and in combination with antibiotics on *Prevotella intermedia*. J Microbiol 2015; 53: 321-329.
- MORADALI MF, GHODS S, REHM BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 39.
- MORIHARA K, TSUZUKI H. Proteolytic substrate specificity and some elastolytic properties of a thermostable bacterial proteinase. Biochim Biophys Acta 1966; 118: 215-218.
- MUDAU M, JACOBSON R, MINENZA N, KUONZA L, MORRIS V, ENGELBRECHT H, NICOL MP, BAMFORD C. Outbreak of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection in the haematology unit of a South African Academic Hospital. PLoS One 2013; 8: e55985.
- NEVILE NS, LEVERETT P, HIBBS DE, YANG Q, BULANADI JC, WU MJ, ALDRICHWRIGHT JR. The antimicrobial properties of some copper(II) and platinum(II) 1,10-phenanthroline complexes. Dalton Trans 2013; 42: 3196209.
- NEWMAN JW, FLOYD RV, FOTHERGILL JL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. FEMS Microbiol Lett 2017; 15:364(15).
- NG NS, WU MJ, ALDRICH-WRIGHT JR. The cytotoxicity of some phenanthroline-based antimicrobial copper(II) and ruthenium(II) complexes. J Inorg Biochem 2018; 180: 61-68.
- NGUYEN LT, HANEY EF, VOGEL HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol 2011; 29: 464-472.
- NINGANAGOUDA S, RATHOD V, SINGH D, HIREMATH J, SINGH AK, MATHEW J, UL-HAQ M. Growth kinetics and mechanistic action of reactive oxygen species released by silver nanoparticles from *Aspergillus niger* on *Escherichia coli*. Biomed Res Int 2014; 2014: 753419.

- NOMURA K, OBATA K, KEIRA T, MIYATA R, HIRAKAWA S, TAKANO K, KOHNO T, SAWADA N, HIMI T, KOJIMA T. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. Respir Res 2014; 18: 15-21.
- NOVO D, PERLMUTTER NG, HUNT RH, SHAPIRO HM. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique. Cytometry 1999; 35: 55-63.
- OCHSNER UA, VASIL ML, ALSABBAGH E, PARVATIYAR K, HASSETT DJ. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. J Bacteriol 2000; 182: 4533-4544.
- OECD. Stemming the Superbug Tide: Just A Few Dollars More, OECD Health Policy Studies. 2018. OECD Publishing, Paris. Disponível em: https://www.oecd.org/health/stemming-the-superbug-tide-9789264307599-en.htm. Acesso em 21 de maio de 2019.
- OGLESBY AG, FARROW JM 3RD, LEE JH, TOMARAS AP, GREENBERG EP, PESCI EC, VASIL ML. **The influence of iron on** *Pseudomonas aeruginosa* **physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing.** J Biol Chem 2008; 283: 15558-15567.
- OGUNSEITAN OA, YANG S, ERICSON J. Microbial δ-aminolevulinate dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments. Soil Biol Biochem 2000; 32:1899–1906.
- OKADA BK, LI A, SEYEDSAYAMDOST MR. Identification of the Hypertension Drug Guanfacine as an Antivirulence Agent in *Pseudomonas aeruginosa*. Chembiochem. 2019; *In press*
- PACHORI P, GOTHALWAL R, GANDHIC P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes Dis 2019; 6: 109–119.
- PÁEZ PL, BAZÁN CM, BONGIOVANNI ME, TONEATTO J, ALBESA I, BECERRA MC, ARGÜELLO GA. Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium(III) and ruthenium(II) complexes on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Biomed Res Int 2013; 2013: 906912.
- PAIN D, DANCIS A. Roles of Fe-S clusters: From cofactor synthesis to iron homeostasis to protein synthesis. Curr Opin Genet Dev 2016; 38: 45–51.
- PALMER KL, AYE LM, WHITELEY M. Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. J Bacteriol. 2007; 189: 8079-8087.
- PARK S, KIM HS, OK K, KIM Y, PARK HD, BYUN Y. Design, synthesis and biological evaluation of 4-(alkyloxy)-6-methyl-2H-pyran-2-one derivatives as quorum sensing inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 2015; 25: 2913-2917.
- PARVATIYAR K, ALSABBAGH EM, OCHSNER UA, STEGEMEYER MA, SMULIAN AG, HWANG SH, JACKSON CR, MCDERMOTT TR, HASSETT DJ. Global analysis of cellular factors and responses involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance to arsenite. J. Bacteriol 2005; 187: 4853–4864.
- PAVIC A, SAVIĆ ND, GLIŠIĆ BĐ, CROCHET A, VOJNOVIC S, KURUTOS A, STANKOVIĆ DM, FROMM KM, NIKODINOVIC-RUNIC J, DJURAN MI. Silver(I) complexes with 4,7-phenanthroline efficient in rescuing the zebrafish embryos of lethal *Candida albicans* infection. J Inorg Biochem 2019; 195:149-163.

- PÉREZ-LLARENA FJ, BOU G. Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance. Front Microbiol 2016; 7:410.
- PERNIL R, SCHLEIFF E. Metalloproteins in the biology of heterocysts. Life 2019; 9: 32
- PETROSILLO N, IOANNIDOU E, FALAGAS ME. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. Clin Microbiol Infect 2008; 14:816-827
- PIDDOCK LJ. The crisis of no new antibiotics--what is the way forward? Lancet Infect Dis 2012; 12: 249-253.
- PLATISTINE[®] Laboratórios Pfizer Ltda. Relatório de utilização farmacológica. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=25759612016& pIdAnexo=4076529. Acesso em 24 de junho de 2018.
- POIREL L, JAYOL A, NORDMANN P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clin Microbiol Rev 2017; 30: 557-596.
- POMPILIO A, CROCETTA V, SCOCCHI M, POMPONIO S, DI VINCENZO V, MARDIROSSIAN M, GHERARDI G, FISCARELLI E, DICUONZO G, GENNARO R, DI BONAVENTURA G. Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed -helical peptides against Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, and Stenotrophomonas maltophilia. BMC Microbiology 2012; 12: 145.
- POTEMPA J, PIKE RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. J Innate Immun 2009; 1: 70– 87.
- POURNARAS S1, POULOU A, DAFOPOULOU K, CHABANE YN, KRISTO I, MAKRIS D, HARDOUIN J, COSETTE P, TSAKRIS A, DÉ E. Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 828–832.
- PRASAD SV, BALLAL M, SHIVANANDA PG. Slime production a virulence marker in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical and environment specimens: a comparative study of two methods. Indian J Pathol Bacteriol 2009; 52: 191-3.
- PRATEEKSHA, SINGH BR, SHOEB M, SHARMA S, NAQVI AH, GUPTA VK, SINGH BN. Scaffold of selenium nanovectors and honey phytochemicals for inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm formation. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 93.
- QUINN TC. **HIV** epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. AIDS 2008; 22: 7–12.
- RAJKUMAR MAHALAKSHMI, NATARAJAN RAMAN. A therapeutic journey of mixed ligand complexes containing 1,10- phenanthroline derivatives: a review. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2016; 8: 1-6.
- RAMALHO TC, MARTINS TL, BORGES LE, DE PINHO MH, DE AVILLEZ RR, DA CUNHA EF. Influence of Zn-Cd substitution: spectroscopic and theoretical investigation of 8-hydroxyquinoline complexes. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2009; 72: 726-729.

- RAMAN N, KULANDAISAMY A, JEYASUBRAMANIAN K. Synthesis, spectral, redox and biological activities of Schiff base transition metal (II) complexes derived from 4-aminoantipyrine and benzil. Synth React Inorg Met-Org NanoMet Chem 2010; 32: 1583-1610.
- RANA A, RERA M, WALKER DW. Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 8638-8643.
- RASKO DA, SPERANDIO V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 117-128.
- RASOULY A, NUDLER E. Antibiotic killing through oxidized nucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 2018; 115: 1967-1969.
- RATHINAM R, GHOSH S, NEUMANN WL, JAMESDANIEL S. Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4. Cell Death Discov 2015; 1: 15052.
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ. Evolutionary families of metallopeptidases. Meth Enzymol, 1995; 248:183-228.
- RAWLINGS ND, SALVESEN G. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd ed. Waltham: Academic Press; 2012.
- REBOUD E, ELSEN S, BOUILLOT S, GOLOVKINE G, BASSO P, JEANNOT K, ATTRÉE I, HUBER P. Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. Environ. Microbiol 2014; 18: 3425-3439.
- RÉMY B, MION S, PLENER L, ELIAS M, CHABRIÈRE E, DAUDÉ D. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. Front Pharmacol 2018; 9: 203.
 - REZACOVA P, POKORNA J, BRYNDA J, KOZISEK M, CIGLER P, LEPSIK M, FANFRLIK J, REZAC J, GRANTZ SASKOVA K, SIEGLOVA I, PLESEK J, SICHA V, GRUNER B, OBERWINKLER H, SEDLACEK, KRAUSSLICH HG, HOBZA P, KRAL V, KONVALINKA J. **Design of HIV protease** inhibitors based on inorganic polyhedral metallacarboranes. J Med Chem 2009; 52: 7132-7141.
- RICE LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 2008; 197:1079-1081.
- RIDLEY AJ, SCHWARTZ MA, BURRIDGE K, FIRTEL RA, GINSBERG MH, BORISY G, PARSONS JT, HORWITZ AR. Cell migration: integrating signals from front to back. Science 2003; 302: 1704-1709.
- RIDLEY RG. Planting the seeds of new antimalarial drugs. Science 1999; 285: 1502-1503.
- RIGO GV, PETRO-SILVEIRA B, DEVEREUX M, MCCANN M, SANTOS ALS, TASCA T. Anti-Trichomonas vaginalis activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. Parasitology 2018; 12: 1-5.
- RIZZO J, ALBUQUERQUE PC, WOLF JM, NASCIMENTO R, PEREIRA MD, NOSANCHUK JD, RODRIGUES ML. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. Fungal Biol 2017; 121: 602-614.
- RODER C, THOMSON MJ. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. Drugs R D 2015; 15:13-20.
- ROSENTHAL VD, BIJI H, MAKI DG, MEHTA Y, APISARNTHANARAK A, MEDEIROS EA, LEBLEBICIOGLU H, FISHER D, ÁLVAREZ-MORENO C, KHADER I, MARTÍNEZ MDRG, CUELLAR LE, MDL, NAVOA-NG JÁ, ABOUQAL R, GARCELL HG, MITREV Z, GARCÍA MCP, HAMDI A, DUEÑAS L, CANCEL E, GURSKIS V, RASSLAN O, AHMED A, KANJ SS, UGALDE OC, MAPP T, RAKA L, MENG CY, THU LTA, GHAZAL S, GIKAS A, NARVÁEZ LP, MEJÍA N, HADJIEVA N, ELANBYA MOG, SIRITT MEG, JAYATILLEKE K, INICC MEMBERS. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. Am J Infect Control 2012; 40: 396-407.
- ROSTAMIZADEH S, DANESHFAR Z, MOGHIMI H. Synthesis of sulfamethoxazole and sulfabenzamide metal complexes; evaluation of their antibacterial activity. Eur J Med Chem 2019; 171: 364-371.
- ROWAN R, MCCANN M, KAVANAGH K. Analysis of the response of Candida albicans cells to Silver(I). Med Mycol 2010; 48: 498-505.
- RUDRAPPA T, BAIS HP. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. J Agric Food Chem 2008; 56: 1955-1962.
- RUÍZ P, ORTIZ R, PERELLÓ L, ALZUET G, GONZÁLEZ-ALVAREZ M, LIUGONZÁLEZ M, SANZ-RUÍZ F. Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper (II) with norfloxacin and 1,10-phenantroline. J Inorg Biochem 2007; 101:831-40.
- SADER HS, CASTANHEIRA M, SHORTRIDGE D, MENDES RE, FLAMM RK. Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam Tested against Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from U.S. Medical Centers, 2013 to 2016. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61: e01045-17
- SADIKOT RT, BLACKWELL TS, CHRISTMAN JW, PRINCE AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 1209–1223.
- SAKATA K, YAJIMA H, TANAKA K, SAKAMOTO Y, YAMAMOTO K, YOSHIDA A, DOHI Y. Erythromycin inhibits the production of elastase by *Pseudomonas aeruginosa* without affecting its proliferation *in vitro*. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 1061-1065.
- SANTOS BS, DA SILVA LC, DA SILVA TD, RODRIGUES JF, GRISOTTO MA, CORREIA MT, NAPOLEÃO TH, DA SILVA MV, PAIVA PM. Application of omics technologies for evaluation of antibacterial mechanisms of action of plant-derived products. Front Microbiol 2016; 7: 1466.
- SCHICK A, KASSEN R. Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. Proc Natl Acad Sci U S A 2018; 115: 10714-10719.
- SCHIRLE M, BANTSCHEFF M, KUSTER B. Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery. Chem. Biol 2012; 19,: 72–84.
- SCHMIDTCHEN A, FRICK IM, ANDERSSON E, TAPPER H, BJÖRCK L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. Mol Microbiol 2002; 46: 157-168.
- SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat. Protoc 2008; 3:1101-1108.

- SHAH PN, SHAH KN, SMOLEN JA, TAGAEV JA, TORREALBA J, ZHOU L, ZHANG S, ZHANG F, WAGERS PO, PANZNER MJ, YOUNGS WJ, WOOLEY KL, CANNON CL. A novel *in vitro* metric predicts *in vivo* efficacy of inhaled silver-based antimicrobials in a murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. Sci Rep 2018; 8: 6376.
- SHAPIRO HM. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. J Microbiol Methods 2000; 42: 3-16.
- SHATALIN K, SHATALINA E, MIRONOV A, NUDLER E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. Science 2011; 334: 986-990.
- SIANGLUM W, SRIMANOTE P, TAYLOR P W, ROSADO H, VORAVUTHIKUNCHAI SP. **Transcriptome** analysis of responses to rhodomyrtone in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 2012; 7: e45744.
- SILVA LV, GALDINO AC, NUNES AP, DOS SANTOS KR, MOREIRA BM, CACCI LC, SODRÉ CL, ZICCARDI M, BRANQUINHA MH, SANTOS AL. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Med Microbiol 2014; 304:990-1000.
- SILVA, Lívia Viganor. Produção de atributos de virulência em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*: efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre múltiplos processos biológicos. Tese (Doutorado-Ciências, Microbiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- SILVER LL. Challenges of antibacterial discovery. Clin Microbiol Rev 2011; 24:71-109.
- SMITH EE, BUCKLEY DG, WU Z, SAENPHIMMACHAK C, HOFFMAN LR, D'ARGENIO DA, MILLER SI, RAMSEY BW, SPEERT DP, MOSKOWITZ SM, BURNS JL, KAUL R, OLSON MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 8487-8492.
- SMOLEŃSKI P, JAROS SW, PETTINARI C, LUPIDI G, QUASSINTI L, BRAMUCCI M, VITALI LA, PETRELLI D, KOCHEL A, KIRILLOV AM. New water-soluble polypyridine silver(I) derivatives of 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) with significant antimicrobial and antiproliferative activities. Dalton Trans 2013; 42: 6572-81.
- SOARES FV, DE CASTRO AA, PEREIRA AF, LEAL DHS, MANCINI DT, KREJCAR O, RAMALHO TC, DA CUNHA EFF, KUCA K. Theoretical studies applied to the evaluation of the dfpase bioremediation potential against chemical warfare agents intoxication. Int J Mol Sci 2018; 19: e1257.
- SOARES GC, SILVA BA, SANTOS MH, COSTA AF, SANTOS ALS, MORANDI V, NAGAO PE. Metallopeptidases produced by group B Streptococcus: Influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. Int J Mol Med 2008; 22: 119-125.
- SOLIOZ M, ABICHT HK, MERMOD M, MANCINI S. Response of gram-positive bacteria to copper stress. J Biol Inorg Chem 2010; 5: 3-14.
- SOLLETI VS, ALHARIRI M, HALWANI M, OMRI A. Antimicrobial properties of liposomal azithromycin for Pseudomonas infections in cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother 2015; 70: 784-796.
- SOMERVILLE GA, PROCTOR RA. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. Microbiol Mol Biol Rev 2009; 73: 233-248.

- SONMEZER MC, ERTEM G, ERDINC FS, KAYA KILIC E, TULEK N, ADILOGLU A, HATIPOGLU C. Evaluation of risk factors for antibiotic resistance in patients with nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2016 ;2016: 1321487.
- SOUSA I, CLARO V, PEREIRA JL, AMARAL AL, CUNHA-SILVA L, DE CASTRO B, FEIO MJ, PEREIRA E, GAMEIRO P. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex. J Inorg Biochem 2012; 110: 64-71.
- STADTMAN, ER, LEVINE RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids 2003; 25: 207–218.
- STATHOPOULOS GP, STATHOPOULOS J, DIMITROULIS J. Two consecutive days of treatment with liposomal cisplatin in non-small cell lung cancer. Oncol Lett 2012; 4: 1013-1016.
- STATHOPOULOS GP. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. Anticancer Drugs 2010; 21:732-736.
- STOVER, C. K., X. Q. PHAM, A. L. ERWIN, S. D. MIZOGUCHI, P. WARRENER, M. J. HICKEY, F. S. BRINKMAN, W. O. HUFNAGLE, D. J. KOWALIK, M. LAGROU, R. L. GARBER, L. GOLTRY, E. TOLENTINO, S. WESTBROCK-WADMAN, Y. YUAN, L. L. BRODY, S. N. COULTER, K. R. FOLGER, A. KAS, K. LARBIG, R. LIM, K. SMITH, D. SPENCER, G. K. WONG, Z. WU, I. T. PAULSEN, J. REIZER, M. H. SAIER, R. E. HANCOCK, S. LORY, AND M. V. OLSON. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406: 959-964.
- STRATEVA T, YORDANOV D. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009; 58: 1133–1148.
- STREMPEL N, NEIDIG A, NUSSER M, GEFFERS R, VIEILLARD J, LESOUHAITIER O, BRENNER-WEISS G, OVERHAGE J. Human host defense peptide ll-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One 2013; 8: e82240.
- SUAREZ-CUARTIN G, SMITH A, ABO-LEYAH H, RODRIGO-TROYANO A, PEREA L, VIDAL S, PLAZA V, FARDON TC, SIBILA O, CHALMERS JD. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG antibodies and chronic airway infection in bronchiectasis. Respir Med 2017; 128: 1-6.
- SUBEDI D, VIJAY AK, WILLCOX M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. Clin Exp Optom 2018;101: 162-171.
- SULEMAN L. Extracellular bacterial proteases in chronic wounds: a potential therapeutic target? Adv Wound Care 2016; 5: 455-463.
- SUMNER ER, SHANMUGANATHAN A, SIDERI TC, WILLETTS SA, HOUGHTON JE, AVERY SV. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. Microbiology 2005; 151: 1939–1948.
- SUN HJ, WANG AL, CHU HB, ZHAO YL. Fluorescent studies on the interaction of DNA and ternary lanthanide complexes with cinnamic acid-phenanthroline and antibacterial activities testing. Luminescence 2015; 30:131-136.
- TACCONELLI E, CARRARA E, SAVOLDI A, HARBARTH S, MENDELSON M, MONNET DL, PULCINI C, KAHLMETER G, KLUYTMANS J, CARMELI Y, OUELLETTE M, OUTTERSON K, PATEL J, CAVALERI M, COX EM, HOUCHENS CR, GRAYSON ML, HANSEN P, SINGH N, THEURETZBACHER U, MAGRINI N. **WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery**,

research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 2018; 18: 318-327.

- TAN MW, RAHME LG, STERNBERG JA, TOMPKINS RG, AUSUBEL FM. Pseudomonas aeruginosa killing of Caenorhabditis elegans used to identify P. aeruginosa virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 2408-2413.
- TANG B, NIRASAWA S, KITAOKA M, MARIE-CLAIRE C, HAYASHI K. General function of N-terminal propeptide on assisting protein folding and inhibiting catalytic activity based on observations with a chimeric thermolysin-like protease. Biochem Biophys Res Commun 2003; 301:1093-1098.
- TANG HB, DIMANGO E, BRYAN R, GAMBELLO M, IGLEWSKI BH, GOLDBERG JB, PRINCE A. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. Infect Immun 1996; 64: 37–43.
- TANG Y. Non-genomic omic techniques, in Molecular Medical Microbiology. London: Academic Press 2014: 399–406.
- TÄNGDÉN T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Ups J Med Sci 2014; 119: 149–153.
- TAPPER ML, ARMSTRONG D. Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* complicating neoplastic disease: a progress report. J Infect Dis 1974; 130: 14-23.
- TASHIRO Y, YAWATA Y, TOYOFUKU M, UCHIYAMA H, NOMURA N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. Microbes Environ 2013; 28: 13–24.
- TAY CX, QUAH SY, LUI JN, YU VS, TAN KS. Matrix metalloproteinase inhibitor as an antimicrobial agent to eradicate *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2015; 41: 858-863.
- TAYLOR PK, ZHANG L, MAH TF. Loss of the two-component system tctd-tcte in *Pseudomonas aeruginosa* affects biofilm formation and aminoglycoside susceptibility in response to citric acid. mSphere. 2019 Mar 6;4(2).
- THANGAMANI S, MOHAMMAD H, ABUSHAHBA MF, SOBREIRA TJ, HEDRICK VE, PAUL LN, SELEEM MN. Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. Sci Rep 2016; 6: 22571.
- THANNER S, DRISSNER D, WALSH F. Antimicrobial Resistance in Agriculture. MBio 2016; 7:e02227-15.
- THATI B, NOBLE A, ROWAN R, CREAVEN BS, WALSH M, MCCANN M, EGAN D, KAVANAGH K. Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. Toxicol *In Vitro* 2007; 21:801-818.
- THAYER MM, FLAHERTY KM, MCKAY DB. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-a resolution. J Biol Chem 1991; 266: 2864-2871.
- THOMSEN, R, CHRISTENSEN, MH. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. J Med Chem 2006; 49: 3315–3321.

- TODESCHINI G, FRANCHINI M, TECCHIO C, MENEGHINI V, PIZZOLO G, VENERI D, MURARI C, RICETTI MM, PERONA G. Improved prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in 127 consecutive neutropenic patients with hematologic malignancies. Int J Infect Dis 1999; 3: 99-104.
- TOH HS, BATCHELOR-MCAULEY C, TSCHULIK K, COMPTON RG. Chemical interactions between silver nanoparticles and thiols: a comparison of mercaptohexanol against cysteine. Science China Chemistry 2016; 57:1199–1210.
- TOTSIKA M, KOSTAKIOTI M, HANNAN TJ, UPTON M, BEATSON SA, JANETKA JW, HULTGREN SJ, SCHEMBRI MA. A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic Escherichia coli ST131. J Infect Dis 2013; 208: 921– 928.
- TOUATI D, JACQUES M, TARDAT B, BOUCHARD L, DESPIED S. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of Escherichia coli: protective role of superoxide dismutase. J. Bacteriol 1995; 177: 2305–2314.
- UIVAROSI V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. Molecules 2013; 18: 11153-11197.
- ULREY RK, BARKSDALE SM, ZHOU W, VAN HOEK ML. Cranberry proanthocyanidins have antibiofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Complement Altern Med 2014; 14: 499.
- URQUIZA NM, ISLAS MS, DITTLER ML, MOYANO MA, MANCA SG, LEZAM L, ROJO T, MEDINA JJM, DIEZ M, TÉVEZ LL, WILLIAMS PAM, FERRER EG. Inhibition behavior on alkaline phosphatase activity, antibacterial and antioxidant activities of ternary methimazole-phenanthroline-copper(II) complex. *Inorg Chim Acta* 2013; 405: 243-251.
- VAARA M. New polymyxin derivatives that display improved efficacy in animal infection models as compared to polymyxin B and colistin. Med Res Rev 2018; 5: 1661-1673.
- VAISHAMPAYAN A, DE JONG A, WIGHT DJ, KOK J, GROHMANN E. A novel antimicrobial coating represses biofilm and virulence-related genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol 2018; 9: 221.
- VALENTINI M, GONZALEZ D, MAVRIDOU DA, FILLOUX A. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Opin Microbiol 2018; 41: 15-20.
- VALLETTI A, MARZANO F, PESOLE G, SBISÀ E, TULLO A. Targeting chemoresistant tumors: could TRIM proteins-p53 axis be a possible answer? Int J Mol Sci 2019; 20: e1776.
- VAN ACKER H, COENYE T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. Trends Microbiol 2017; 25: 456-466.
- VASILCHENKO AS, ROGOZHIN EA. Sub-inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides. Front Microbiol 2019; 10:1160.
- VATANSEVER F, DE MELO WC, AVCI P, VECCHIO D, SADASIVAM M, GUPTA A, CHANDRAN R, KARIMI M, PARIZOTTO NA, YIN R, TEGOS GP, HAMBLIN MR. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiol Rev. 2013 Nov;37(6):955-89.

- VELKOV T, ROBERTS KD, NATION RL, THOMPSON PE, LI J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. Future Microbiol 2013; 8: 711-724.
- VIEDMA E, PÉREZ-MONTARELO D, VILLA J, MUÑOZ-GALLEGO I, LARROSA N, FERNÁNDEZ-HIDALGO N, GAVALDÀ J, ALMIRANTE B, CHAVES F. Sub-inhibitory concentrations of oxacillin modify the expression of *agr* locus in *Staphylococcus aureus* clinical strains belonging to different clonal complexes. BMC Infect Dis 2018; 18: 177.
- VIGANOR L, GALDINO AC, NUNES AP, SANTOS KR, BRANQUINHA MH, DEVEREUX M, KELLETT A, MCCANN M, SANTOS AL. Anti-Pseudomonas aeruginosa activity of 1,10-phenanthrolinebased drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. J Antimicrob Chemother. 2016; 71: 128-134.
- VIGANOR L, HOWE O, MCCARRON P, MCCANN M, DEVEREUX M. The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Antibiotic Resistance. Curr Top Med Chem 2017; 17: 1280-1302.
- VINCENT M, DUVAL RE, HARTEMANN P, ENGELS-DEUTSCH M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. J Appl Microbiol 2018; 124:1032-1046.
- VITKAUSKIENE A, SKRODENIENE E, DAMBRAUSKIENE A, MACAS A, SAKALAUSKAS R. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. Medicina (Kaunas) 2010; 46: 490-495.
- WALDRON KJ, ROBINSON NJ. **How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?** Nature Rev Microbiol 2009, 7: 25-35.
- WALDRON KJ1, RUTHERFORD JC, FORD D, ROBINSON NJ. Metalloproteins and metal sensing. Nature 2009; 460: 823-830.
- WANG R, LAI TP, GAO P, ZHANG H, HO PL, WOO PC, MA G, KAO RY, LI H, SUN H. **Bismuth** antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo-β-lactamase inhibitors. Nat Commun 2018; 9:439.
- WANG, JJ., ZHANG, DJ., ZHANG, RC, LU X, FENG EX, SHI JY. Syntheses, crystal structures and properties of complexes with two anthracene-based bulky backbone ligands. Transition Met Chem 2015; 40: 69.
- WELTE W, NESTEL U, WACKER T, DIEDERICHS K. Structure and function of the porin channel. Kidney Int 1995; 48: 930-940.
- WHELAN A, DIETRICH LE, NEWMAN DK. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. J Bacteriol 2007; 189: 6372-6381.
- WINSTANLEY C, FOTHERGILL JL. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. FEMS Microbiol Lett 2009; 290:1–9.
- WONG A, NGU DY, DAN LA, OOI A, LIM RL. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. Nutr J 2015; 14: 95.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trypanosomiasis, Human African (Sleeping Sickness)**; Fact sheet No. 259; WHO Press: Geneva, 2013. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness). Acesso em 02 de fevereiro de 2019.

- WORLD HEALTH STATISTICS.2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.Geneva:WorldHealthOrganization;2018.Disponívelem:https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/.Acessoem:13demarçode2019.
- WRIGHT H, BONOMO RA, PATERSON DL. New agents for the treatment of infections with Gramnegative bacteria: restoring the miracle or false dawn? Clin Microbiol Infect 2017; 23: 704-712.
- WU G, WANG G, FU X, ZHU F. Synthesis, crystal structure, stacking effect and antibacterial studies of a novel quaternary copper (ii) complex with quinolone. Molecules 2003; 8: 287-296.
- XIA J, SINELNIKOV IV, HAN B, WISHART DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. Nucleic Acids Res 2015; 43: 251-257.
- XU FF, IMLAY JA. Silver(I), mercury (II), cadmium (II), and zinc (II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol 2012; 78:3614–3621.
- XU X, XU L, YUAN G, WANG Y, QU Y, ZHOU M. Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance. Sci Rep 2018; 8: 7237.
- XU ZG, GAO Y, HE JG, XU WF, JIANG M, JIN HS. Effects of azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheter-associated urinary tract infection. Exp Ther Med 2015; 9: 569-572.
- YANG J, ZHAO HL, RAN LY, LI CY, ZHANG XY, SU HN, SHI M, ZHOU BC, CHEN XL, ZHANG YZ. Mechanistic insights into elastin degradation by pseudolysin, the major virulence factor of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep 2015; 23: e9936.
- YASUI H, YOSHIKAWA Y. Frontier of development for metallodrugs on the basis of metallomic pharmacology and medicinal inorganic chemistry. 2017; In: Ogra Y., Hirata T. (eds) Metallomics. Springer, Tokyo
- YEATS C, RAWLINGS ND, BATEMAN A. The PepSY domain: a regulator of peptidase activity in the microbial environment? Trends Biochem Sci 2004; 29: 169-172.
- ZAMAN SB, HUSSAIN MA, NYE R, MEHTA V, MAMUN KT, HOSSAIN N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. Cureus 2017; 9: e1403.
- ZANDALINAS SI, BALFAGÓN D, ARBONA V, GÓMEZ-CADENAS A. modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. Front Plant Sci 2017; 8: 953.
- ZANDALINAS SI, MITTLER R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells. Free Radic Biol Med 2018; 122: 21-27.
- ZGURSKAYA HI, RYBENKOV VV, KRISHNAMOORTHY G, LEUS IV. Trans-envelope multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria and their synergism with the outer membrane barrier. Res Microbiol 2018; 169: 351-356.
- ZHANG Y, CHEN XL, HUANG A, LIU S, LIU W, ZHANG N, LU X. Mortality attributable to carbapenemresistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. Emerg Microbes Infect 2016; 5: e27.

- ZHAO G, LIN H. Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5: 137-147.
- ZHU BZ. The lethal interaction and formation of a lipophilic ternary complex between 2,4,5trichlorophenol and the Cu(II)-bis(1,10-phenanthroline) complex. Chem Res Toxicol 2001; 14: 222-227.
- ZHU J, CAI X, HARRIS TL, GOOYIT M, WOOD M, LARDY M, JANDA KD. Disarming Pseudomonas aeruginosa virulence factor LasB by leveraging a Caenorhabditis elegans infection model. Chem Biol, 2015, 22(4), 483-491.
- ZHU X, LI T, GU X, ZHANG S, LIU Y, WANG Y, TAN X. Structural and functional investigation into acetyl-coenzyme A synthase and methyltransferase from human pathogen *Clostridium difficile*. Metallomics. 2013; 5: 551-558.

9- ANEXOS

Anexo 1: Alterações metabólicas em P. aeruginosa (ATCC 27853) induzidas por compostos derivados da fendiona.

Tabela A 1- Metabolitos de *P. aeruginosa* alterados em resposta ao tratamento com concentrações bactericidas de compostos derivados da fendiona.

Metabolito	Cont	role		Ag-fe	ndiona		Cu-fendiona			
A ctabolito	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC
Thiocyanate	19178.44	931.29	18170.55	5950.73	0.95	-0.08	79870.79	3822.15	4.16	2.06
Propanoate	16912.70	2872.03	46937.98	6614.69	2.78	1.47	46614.34	4809.11	2.76	1.46
(R)-Lactate	97714.28	12511.66	128072.24	11407.36	1.31	0.39	134533.61	18668.62	1.38	0.46
D-Glyceraldehyde	95899.52	12207.43	125184.95	10048.23	1.31	0.38	132367.07	18474.53	1.38	0.46
(R)-b-amino-isobutyric acid	73277.21	3390.49	60113.86	6269.47	0.82	-0.29	65997.23	543.22	0.90	-0.15
Uracil	17908.60	198.45	26633.08	8055.84	1.49	0.57	18770.73	5465.56	1.05	0.07
Fumarate	30941.66	2592.72	51769.59	9398.19	1.67	0.74	33020.35	443.23	1.07	0.09
Succinate	589098.68	111623.54	1687591.35	175641.64	2.86	1.52	1769861.64	220518.05	3.00	1.59
2-Hydroxyethylphosphonate	64276.58	12659.48	69948.58	4232.22	1.09	0.12	74454.69	9821.42	1.16	0.21
4-Oxoproline	26853.79	10404.31	21064.40	1349.03	0.78	-0.35	12093.73	1729.56	0.45	-1.15
Pidolic acid	26853.79	10404.31	20962.01	1475.09	0.78	-0.36	11944.01	1579.85	0.44	-1.17
Glutarate	187148.14	3415.65	85292.21	11546.25	0.46	-1.13	140032.27	12094.69	0.75	-0.42
(4S)-4.5-Dihydroxypentan-2.3-dione	188213.91	3280.99	86013.65	12047.38	0.46	-1.13	141225.61	12329.92	0.75	-0.41
(S)-Malate	196397.47	10106.55	190532.04	9540.02	0.97	-0.04	228870.92	3713.51	1.17	0.22
2-Oxoglutarate	46677.28	539.33	121236.19	16882.70	2.60	1.38	91765.79	903.61	1.97	0.98
Methyloxaloacetate	47055.14	917.19	122058.12	16661.55	2.59	1.38	92839.00	1120.75	1.97	0.98
2.5-Diaminohexanoate	83771.79	14306.82	64326.09	4163.15	0.77	-0.38	76624.27	18862.27	0.91	-0.13
2-Dehydro-3-deoxy-L-arabinonate	45696.16	1016.09	670741.25	80448.17	14.68	3.88	336652.68	18601.16	7.37	2.88
3-Hydroxyindolin-2-one	31329.51	2604.49	37901.90	2638.68	1.21	0.27	39362.01	264.48	1.26	0.33
L-Methionine	28518.77	3879.30	35731.25	3360.14	1.25	0.33	36516.58	1735.56	1.28	0.36
Propanoyl phosphate	90114.79	18027.22	192124.90	22528.46	2.13	1.09	208317.94	18573.89	2.31	1.21
Orotate	40200.75	2449.83	15813.67	1341.81	0.39	-1.35	26884.31	697.37	0.67	-0.58

Metabolito	Cont	role		Ag-fei	ndiona		Cu-fendiona				
Victabolito	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC	
2.4-Dichlorotoluene	71316.64	11191.49	71661.43	6517.83	1.00	0.01	93361.40	6029.78	1.31	0.39	
D-Rhamnose	119432.12	13208.27	49495.71	7191.02	0.41	-1.27	54031.79	5275.39	0.45	-1.14	
L-Phenylalanine	34783.78	8075.45	72361.53	7571.70	2.08	1.06	102602.35	8325.13	2.95	1.56	
Phthalate	10139.09	325.34	18439.34	986.48	1.82	0.86	18052.11	40.73	1.78	0.83	
Butanoylphosphate	54025.53	104.56	22762.90	3330.70	0.42	-1.25	36999.93	2201.38	0.68	-0.55	
Urate	38226.22	1490.22	19294.36	4220.31	0.50	-0.99	16937.74	1433.44	0.44	-1.17	
Thiourocanic acid	16524.52	114.45	7728.67	957.44	0.47	-1.10	11096.22	241.16	0.67	-0.57	
Diethylthiophosphoric acid	16524.52	114.45	7728.67	957.44	0.47	-1.10	11096.22	241.16	0.67	-0.57	
sn-Glycerol 3-phosphate	299477.54	38751.82	152079.83	22688.54	0.51	-0.98	203134.89	13137.05	0.68	-0.56	
cis-Aconitate	1210.11	429.82	98272.02	18291.54	81.21	6.34	250549.05	44502.02	207.05	7.69	
N-Formimino-L-glutamate	0.00	0.00	123805.44	51008.50	123805.44	16.92	518885.18	71951.43	#DIV/0!	#DIV/0!	
N-Acetyl-L-aspartate	57836.90	1200.31	716385.93	182795.09	12.39	3.63	692566.97	48169.21	11.97	3.58	
7-Cyano-7-carbaguanine	57836.90	1200.31	716086.33	183005.31	12.38	3.63	692566.97	48169.21	11.97	3.58	
L-Citrulline	365285.28	91110.08	232520.30	39121.92	0.64	-0.65	431270.86	38782.67	1.18	0.24	
3-Propylmalate	3714.30	971.94	133180.49	63708.88	35.86	5.16	287483.88	41433.69	77.40	6.27	
D-Glucono-1.5-lactone	117214.86	1389.96	89058.42	12096.54	0.76	-0.40	79460.07	3737.67	0.68	-0.56	
beta-D-Glucose	83520.47	14109.78	54780.17	5183.27	0.66	-0.61	71161.26	8560.83	0.85	-0.23	
Theophylline	84899.82	13593.88	54780.17	5183.27	0.65	-0.63	71628.23	9027.81	0.84	-0.25	
4-Sulfobenzyl alcohol	24977.44	437.56	24090.70	9427.64	0.96	-0.05	22245.25	1767.13	0.89	-0.17	
1.2-Dihydroxy-7-hydroxymethylnaphthalene	43190.80	420.59	70678.67	12226.10	1.64	0.71	53437.12	1946.71	1.24	0.31	
2-Oxo-7-methylthioheptanoic acid	43190.80	420.59	70379.06	12103.36	1.63	0.70	53437.12	1946.71	1.24	0.31	
Citrate	19845.14	7174.60	1548901.29	380283.35	78.05	6.29	2876133.16	349836.78	144.93	7.18	
Dihydroclavaminic acid	5106.42	411.96	10068.05	1765.92	1.97	0.98	9273.03	78.65	1.82	0.86	
Homoisocitrate	0.00	0.00	19574.98	4737.47	19574.98	14.26	43261.01	4944.36	43261.01	15.40	
2-Aminophenoxazin-3-one	0.00	0.00	378801.93	55170.51	378801.9	18.53	77887.19	13318.85	77887.19	16.25	
sn-Glycero-3-phosphoethanolamine	24494.26	1735.46	15328.35	3737.81	0.63	-0.68	17534.19	3518.01	0.72	-0.48	
2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate	31020.53	4670.79	23501.27	1699.58	0.76	-0.40	28543.94	1984.09	0.92	-0.12	

Matabalita	Cont	role		Ag-fe	ndiona		Cu-fendiona				
Metabolito	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC	
gamma-L-Glutamylputrescine	24579.27	1150.61	9923.25	3563.79	0.40	-1.31	17207.89	1017.86	0.70	-0.51	
1-Guanidino-1-deoxy-scyllo-inositol	68967.52	16438.87	42418.99	6291.95	0.62	-0.70	72583.60	3282.51	1.05	0.07	
L-Arogenate	90427.33	9954.77	56890.45	6388.02	0.63	-0.67	85981.37	8634.45	0.95	-0.07	
Deoxyuridine	5575.65	311.90	4273.19	644.79	0.77	-0.38	5109.17	213.17	0.92	-0.13	
Resveratrol	5575.65	311.90	4273.19	644.79	0.77	-0.38	5109.17	213.17	0.92	-0.13	
3-Deoxy-D-manno-octulosonate	113443.26	9415.43	150339.75	44832.27	1.33	0.41	115513.01	17136.72	1.02	0.03	
Thymidine	19338.35	1703.07	13303.54	735.95	0.69	-0.54	17054.69	5057.74	0.88	-0.18	
4.5-Bisphenol-o-quinone	19338.35	1703.07	13303.54	735.95	0.69	-0.54	17286.31	4826.12	0.89	-0.16	
Pseudouridine	13522.56	1064.05	17703.56	5456.47	1.31	0.39	14039.41	1128.45	1.04	0.05	
beta-D-Glucose 1-phosphate	635413.81	70529.03	258673.87	52155.49	0.41	-1.30	349975.81	15469.86	0.55	-0.86	
2-Hydroxy-6-oxo-6-(2-carboxyphenyl)-2.4-											
dienoate	15017.52	8347.38	7408.80	899.18	0.49	-1.02	8115.71	207.88	0.54	-0.89	
Xanthoxic acid	13897.62	3577.32	15044.47	2046.05	1.08	0.11	27118.16	16429.14	1.95	0.96	
S-Ribosyl-L-homocysteine	21022.17	1575.52	8025.00	1183.43	0.38	-1.39	21652.93	499.66	1.03	0.04	
Paraoxon	0.00	0.00	101839.02	31985.01	101839.0	16.64	29052.13	4531.91	29052.13	14.83	
2-C-Methyl-D-erythritol 2.4-cyclodiphosphate	0.00	0.00	382268.83	109952.26	382268.8	18.54	381009.07	13875.52	381009.07	18.54	
11.12-Dihydroxybenzo[a]pyrene	47936.85	12331.95	73562.80	13084.87	1.53	0.62	65125.62	5342.00	1.36	0.44	
Sedoheptulose 7-phosphate	194994.88	39107.37	41667.57	10624.92	0.21	-2.23	62557.72	3516.30	0.32	-1.64	
Prunasin	158959.03	11630.96	78873.95	7127.17	0.50	-1.01	98502.93	624.78	0.62	-0.69	
Glutathione	2913624.77	284422.67	4434.88	1888.07	0.00	-9.36	1943.84	560.68	0.00	-10.55	
dTMP	122266.81	17971.56	113702.40	12392.08	0.93	-0.10	140362.19	6550.02	1.15	0.20	
СМР	198351.59	20498.77	153477.41	4241.39	0.77	-0.37	158108.20	26419.86	0.80	-0.33	
UMP	540044.92	68759.82	457773.14	60423.46	0.85	-0.24	663810.28	241936.44	1.23	0.30	
N-Glycoloyl-neuraminate	26270.88	2332.18	22510.32	4237.02	0.86	-0.22	38530.19	2020.62	1.47	0.55	
dGMP	1596778.25	247859.17	905869.80	176336.13	0.57	-0.82	1177691.41	30805.29	0.74	-0.44	
Rosmarinate	7163.08	1739.20	5281.57	1641.29	0.74	-0.44	8239.01	583.88	1.15	0.20	
Digalacturonate	33161.05	3828.41	0.00	0.00	0.00	#NUM!	0.00	0.00	0.00	#NUM!	

Metabolito	Cont	role		Ag-fer	ıdiona		Cu-fendiona			
Victabolito	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC
Dopaxanthin	0.00	0.00	6153.27	4673.27	6153.27	12.59	0.00	0.00	0.00	#NUM!
Chitobiose	74665.06	4696.00	111179.35	40124.75	1.49	0.57	68548.88	6391.74	0.92	-0.12
FMN	0.00	0.00	86139.74	9882.29	86139.74	16.39	33616.13	2762.78	33616.13	15.04
UDP-glucose	95300.37	6053.38	88428.28	32006.52	0.93	-0.11	162774.24	78996.03	1.71	0.77
UDP-alpha-D-galactose	95300.37	6053.38	88428.28	32006.52	0.93	-0.11	162774.24	78996.03	1.71	0.77
UDP-N-acetyl-D-galactosamine	67085.33	6656.14	168762.13	44044.02	2.52	1.33	240329.12	58548.25	3.58	1.84
Glutathione disulfide	90863.60	17919.25	323755.56	77906.00	3.56	1.83	719839.33	56259.21	7.92	2.99
Actinorhodin	18623.96	3554.01	70775.55	10526.52	3.80	1.93	136513.71	7487.32	7.33	2.87
L-Glutamate	123076425.35	11528428.8	65389682.94	5226581.97	0.53	-0.91	85781344.57	1558666.03	0.70	-0.52
L-Leucine	126261306.55	18666403.4	112639145.07	5278272.66	0.89	-0.16	173377902.35	8372497.65	1.37	0.46
L-Aspartate	17451828.80	1709566.60	8904458.46	835522.26	0.51	-0.97	19469569.95	705606.31	1.12	0.16
L-Valine	205890331.40	21204242.1	173630700.73	32890488.69	0.84	-0.25	283609751.90	29240169.10	1.38	0.46
Orthophosphate	10797466.89	1681153.16	11357215.69	1278505.39	1.05	0.07	13795330.44	78235.13	1.28	0.35
L-Ornithine	6999513.82	1526995.92	4789530.41	226918.75	0.68	-0.55	6436153.22	358759.29	0.92	-0.12
L-Alanine	9104437.94	1006140.72	5301685.17	151522.78	0.58	-0.78	6966960.91	808341.17	0.77	-0.39
Putrescine	2221110.91	329769.45	1831673.00	132293.51	0.82	-0.28	2216929.70	37308.06	1.00	0.00
L-Lysine	6985843.70	1648885.70	4808105.46	120107.51	0.69	-0.54	5947341.36	1231603.47	0.85	-0.23
АМР	13924920.12	2064256.30	9474811.74	1470849.06	0.68	-0.56	11927816.50	163779.13	0.86	-0.22
Cadaverine	940537.78	14836.82	656470.33	153620.99	0.70	-0.52	1070944.77	109366.55	1.14	0.19
L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate	8246686.95	780526.29	4265550.93	360638.81	0.52	-0.95	5764220.94	155003.06	0.70	-0.52
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	7381504.97	711964.10	3808319.48	286256.83	0.52	-0.95	4982368.46	36729.52	0.67	-0.57
PE(16:0/18:1(9Z))	15886900.74	1213742.33	22259639.47	6761463.02	1.40	0.49	24294712.44	386206.66	1.53	0.61
2.3-Dihydroxyindole	4645965.25	612997.30	4838457.82	153069.65	1.04	0.06	6102165.39	262004.65	1.31	0.39
D-Methionine	4648358.61	611560.58	4822931.88	157853.85	1.04	0.05	6086756.81	262527.12	1.31	0.39
L-Tyrosine	5298362.58	702569.09	2661963.62	316331.39	0.50	-0.99	4080155.82	422907.11	0.77	-0.38
Piperideine	2488108.84	525096.10	1961039.18	33271.51	0.79	-0.34	2522391.22	483667.54	1.01	0.02
Hypoxanthine	2121554.39	220058.34	2294877.11	305128.69	1.08	0.11	3149503.32	141877.99	1.48	0.57

Metabolito	Cont	role	Ag-fendiona					Cu-fendiona			
	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC	
(2R)-2-Hydroxy-2-methylbutanenitrile	2569952.97	49064.31	944040.18	140983.02	0.37	-1.44	1557784.88	14974.72	0.61	-0.72	
Stealthin C	48812024.41	5639264.76	138388.57	40958.65	0.00	-8.46	65128.04	2693.48	0.00	-9.55	
L-Proline	1639095.54	349609.61	1168451.27	74990.76	0.71	-0.49	1564369.30	108218.94	0.95	-0.07	
5'-Methylthioadenosine	398212.19	64197.25	288212.03	65748.93	0.72	-0.47	421670.00	30678.90	1.06	0.08	
L-Threonine	2980074.54	223162.27	2107063.00	70697.08	0.71	-0.50	2903894.46	244001.08	0.97	-0.04	
Dehydroalanine	1120679.96	108433.87	579795.52	52066.28	0.52	-0.95	1222002.99	31439.29	1.09	0.12	
L-2-Aminoadipate	1296611.30	161147.47	826476.61	138479.92	0.64	-0.65	1359799.61	60069.81	1.05	0.07	
D-Alanyl-D-alanine	1262760.38	125003.36	2359653.73	607666.05	1.87	0.90	5185835.32	506052.70	4.11	2.04	
Spermidine	207254.24	45503.23	1930752.06	726840.36	9.32	3.22	1165134.12	31020.24	5.62	2.49	
5-Hydroxyectoine	1649288.05	405749.91	1058884.89	166366.76	0.64	-0.64	1916235.90	133900.94	1.16	0.22	
5-(L-Alanin-3-yl)-2-hydroxy-cis.cis-muconate 6-	0.00	0.00	4494005 25	429664 96	_	-	1872120 22	153931.28	1872120 22	20.84	
semialdehyde	0.00	0.00	113 1000.20	12,0001.00			10/2120.22	100701120	10,2120.22	20.01	
L-Histidine	588432.37	126921.78	631106.80	87119.29	1.07	0.10	919469.62	159710.54	1.56	0.64	
Choline sulfate	897.88	897.88	1541065.23	170233.39	1716.33	10.75	0.00	0.00	0.00	#NUM!	
N-Acetyl-L-glutamate	1365691.93	24424.27	2216470.18	434813.85	1.62	0.70	1866976.25	71491.97	1.37	0.45	
L-Asparagine	1924776.01	163868.88	1721362.90	500409.43	0.89	-0.16	3220294.84	683733.85	1.67	0.74	
PG(16:0/18:1(9Z))	7100970.37	809626.57	7709728.27	1063863.33	1.09	0.12	7825410.69	30072.03	1.10	0.14	
Xanthine	1029180.17	119897.40	602320.86	202215.46	0.59	-0.77	803249.17	72602.88	0.78	-0.36	
Emetine	1448743.82	1736.80	1736388.37	218840.43	1.20	0.26	2011944.08	291615.48	1.39	0.47	
Decanoyl-CoA	976210.38	115831.90	10547.42	1407.38	0.01	-6.53	18295.25	7913.61	0.02	-5.74	
Glycine	927314.13	26233.98	1374921.20	452489.21	1.48	0.57	1739846.84	68406.84	1.88	0.91	
L-Pipecolate	737545.74	180352.57	517087.33	9852.97	0.70	-0.51	635984.44	118050.42	0.86	-0.21	
Betalamic acid	77917.00	5268.33	15604255.81	3332829.82	200.27	7.65	8331857.88	1352819.15	106.93	6.74	
gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	895052.53	161149.00	0.00	0.00	0.00	-	0.00	0.00	0.00	-	
L-Serine-phosphoethanolamine	0.00	0.00	32449872.80	2965888.07	32449872.80	24.95	13355513.33	1349744.02	13355513.3	23.67	
2-(3'-Methylthio)propylmalic acid	442350.48	20454.74	606762.68	50907.80	1.37	0.46	655804.87	95946.20	1.48	0.57	
1.3-Diaminopropane	264420.17	47345.58	594004.54	151105.39	2.25	1.17	612481.66	31712.97	2.32	1.21	

Matabalita	Cont	role		Ag-fei	ndiona		Cu-fendiona			
inclabolito	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC
2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7.8- dihydropteridine	2646.58	1017.61	683586.29	168539.32	258.29	8.01	808630.60	33132.65	305.54	8.26
Ethanolamine	1689377.11	213619.84	1215625.61	138515.23	0.72	-0.47	1850358.85	179094.46	1.10	0.13
Actinidine	473591.20	114551.71	335663.60	5036.50	0.71	-0.50	413000.34	82317.28	0.87	-0.20
Deamino-alpha-keto-demethylphosphinothricin	1280887.68	106918.49	2043558.09	1580022.58	1.60	0.67	1607778.65	67082.50	1.26	0.33
beta-Alanyl-L-lysine	317497.51	29224.17	134355.01	37724.55	0.42	-1.24	212503.88	326.54	0.67	-0.58
L-Serine	650296.68	12222.51	869162.15	86839.23	1.34	0.42	985027.69	72861.78	1.51	0.60
N-Acetylornithine	8054209.32	555369.76	7663595.85	3211853.33	0.95	-0.07	13184392.07	5431867.20	1.64	0.71
NAD+	620035.99	81483.56	833878.81	130104.08	1.34	0.43	963930.69	70996.48	1.55	0.64
N2-citryl-N6-acetyl-N6-hydroxy-L-lysine	337160.21	26376.56	633479.10	191611.62	1.88	0.91	394959.24	39446.73	1.17	0.23
Adenosine	318723.60	34959.31	229442.66	35919.29	0.72	-0.47	490151.23	16948.82	1.54	0.62
2'-Deoxyinosine 5'-phosphate	790295.15	118299.08	986034.23	55764.89	1.25	0.32	1300030.03	94298.50	1.64	0.72
Maleamate	553335.13	52618.60	293133.50	22859.65	0.53	-0.92	609754.66	15273.11	1.10	0.14
Inosine	251631.46	42.77	440759.20	56115.64	1.75	0.81	372199.24	27273.52	1.48	0.56
L-Glutamine	254576.79	21609.28	523522.07	126278.60	2.06	1.04	1160154.13	137428.12	4.56	2.19
a-N-Acetylglucosamine	191826.06	52654.75	282360.50	44643.87	1.47	0.56	278530.42	24669.95	1.45	0.54
Pyrimidodiazepine	192457.77	53286.46	283342.05	39961.37	1.47	0.56	276837.22	26363.15	1.44	0.52
epsilon-Caprolactam	1401669.60	568694.72	88495.97	22540.68	0.06	-3.99	231143.81	27118.13	0.16	-2.60
(E)-Phenylacetaldoxime	683256.64	92086.81	373523.97	48801.68	0.55	-0.87	553462.44	40264.72	0.81	-0.30
dAMP	699393.27	62591.58	342421.25	69808.13	0.49	-1.03	373483.45	231.60	0.53	-0.91
Pantothenate	365221.73	36299.64	573835.68	142531.78	1.57	0.65	836868.37	355653.09	2.29	1.20
4-Hydroxy-L-glutamic acid	72200.33	7741.70	380494.81	48132.48	5.27	2.40	816455.64	24122.17	11.31	3.50
CMP-N-acetylneuraminate	3600331.10	435920.92	929.77	98.97	0.00	-11.92	471.35	471.35	0.00	-12.90
4-Nitrocatechol	217093.57	113.55	225133.05	33655.72	1.04	0.05	332720.81	15382.30	1.53	0.62
3-Methylpyrrole-2.4-dicarboxylic acid	324191.32	9743.31	524060.27	94000.32	1.62	0.69	388810.73	4043.39	1.20	0.26
S-Glutathionyl-L-cysteine	108849.72	20514.69	53902.05	12046.03	0.50	-1.01	162535.23	10097.08	1.49	0.58
dCMP	447842.07	86548.59	297610.72	38889.53	0.66	-0.59	325087.90	12791.00	0.73	-0.46

Metabolito	Controle			Ag-fei	ndiona		Cu-fendiona			
	Média	SD	Média	SD	Ag-fen/CT	Log ₂ FC	Média	SD	Cu-fen/CT	Log ₂ FC
Cys-Gly	1095137.12	119823.87	365.52	633.10	0.00	-11.55	0.00	0.00	0.00	#NUM!
5-Pyridoxolactone	159200.04	34025.54	212714.47	18118.61	1.34	0.42	208683.54	1623.16	1.31	0.39
Nicotinamide	599161.71	16.09	681148.54	269505.39	1.14	0.19	721073.02	64753.63	1.20	0.27
2-Amino-2-deoxy-D-gluconate	3307.37	1678.40	678477.79	166227.16	205.14	7.68	803182.62	30405.62	242.85	7.92
Indolepyruvate	182477.94	8445.53	134107.93	2595.20	0.73	-0.44	219660.57	13553.44	1.20	0.27
Protoporphyrin	199484.18	73270.37	13637.81	1407.41	0.07	-3.87	17433.84	2085.16	0.09	-3.52
N-Acetylmuramate	170371.16	38947.85	132616.88	51567.85	0.78	-0.36	204809.50	11700.68	1.20	0.27
Nicotinamide-riboside	182898.77	18069.14	0.00	0.00	0.00	-	0.00	0.00	0.00	-
5-Amino-6(5P'D-ribitylamino)uracil	276619.70	35226.05	218480.46	27426.48	0.79	-0.34	343261.79	30453.94	1.24	0.31
4-Aminobenzoate	187687.88	24702.59	95468.61	16681.62	0.51	-0.98	152279.60	14925.66	0.81	-0.30
L-Metanephrine	87597.79	3291.60	38660.57	8379.19	0.44	-1.18	62395.47	6168.57	0.71	-0.49
Indolylmethylthiohydroximoyl-L-cys	237176.67	36695.18	36475.79	12953.10	0.15	-2.70	132292.12	14125.23	0.56	-0.84
5'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide	29712.54	1890.25	69851.85	3459.44	2.35	1.23	61167.28	1351.58	2.06	1.04
D-Glucosamine 6-phosphate	236067.69	42413.62	99865.10	20560.32	0.42	-1.24	109549.55	5277.22	0.46	-1.11
Coproporphyrin III	483467.96	286016.85	45373.51	30522.91	0.09	-3.41	70896.59	48509.62	0.15	-2.77
L-Methionine (S)-S-oxide	160271.67	32953.91	214457.89	17975.39	1.34	0.42	212479.07	5418.69	1.33	0.41
Palmitoylglycerone phosphate	98692.31	128.96	96643.00	18336.13	0.98	-0.03	88317.93	58.46	0.89	-0.16

SD- Desvio padrão; Ag-fen – Ag-fendiona; Cu-fendiona – Cu-fendiona; CT- controle.

 $Log_2 FC = Log_2$ (Sistemas tratados /Controle) (**Equação 13**)

ANEXO 2

Produção Bibliográfica (2015 - 2019)

1- Publicações relacionadas à tese

- Silva LV, Galdino ACM, Nunes APF, Santos KR, Branquinha MH, Devereux M, Kellett A, Mccann M, Santos ALS. (2016). Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthrolinebased drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71: 51-58.
- Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, Viganor-Silva L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host. In Pathophysiological aspects of proteases, In: S. Chakraborti and N.S. Dhalla. (Org.). Pathophysiological Aspects of Proteases. 1ed.: Springer Nature Singapore Pte Ltd. 1: 381-397.
- Galdino ACM, Viganor L, Ziccardi M, Nunes AP, Santos KRN, Branquinha MH, Santos ALS. (2017). Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica 35: 630-637.
- Santos ALS, **Galdino ACM**, Branquinha M. (2018). Pseudolysin (elastase B): a protagonist in the *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Microbiology: Current Research 2: 16.
- Galdino ACM, de Oliveira MP, Ramalho TC, de Castro AA, Branquinha MH, Santos ALS. (2019). Anti-virulence strategy against the multidrug-resistant bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: pseudolysin (elastase b) as a potential druggable target. Current Protein and Peptide Sciences 20: 471-487.
- Galdino ACM, Viganor L, Castro A, Mello TP, Mattos LM, Pereira MD, Hunt M, O'Shaughnessy M, Howe O, Devereux M, McCann M, Ramalho T, Branquinha MH, Santos ALS. (2019). Disarming the *Pseudomonas aeruginosa* virulence by the inhibitory action of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based compounds: elastase B (lasB) as chemotherapeutic target. Frontiers in Microbiology, *in press*.

2- Publicações não relacionadas à tese

- Zaccardi M, Souza L, Gandra RM, Galdino ACM, Batista ARS, Nunes APF, Ribeiro MA, Branquinha MH, Santos ALS. (2015). *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. International Journal of Medical Microbiology 305: 848-859.
- Santos ALS, Carvalho IS, Prata JM, Martins MB, Souza LOP, Galdino ACM, Braga-Silva LA, Branquinha MH, Rodrigues SM, Souza LVNF. (2016). *Candida albicans* involvement in denturerelated stomatitis: a serious and real clinical concern. Journal of Infectious Diseases and Diagnosis 1: 104.
- Santos ALS, Galdino ACM, Mello TP, Ramos LS, Branquinha MH, Bolognese AM, Columbano Neto J, Roudbary M. (2018). What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 113: e180212.
- Ahmed M, Rooney D, McCann M, Devereux M, Twamley B, Galdino ACM, Sangenito LS, Souza LOP, Lourenço MC, Gomes K, Santos ALS. (2019). Synthesis and antimicrobial activity of a phenanthroline-isoniazid hybrid ligand and its Ag⁺ and Mn²⁺ complexes. BioMetals, *in press*.
- Guerrieri CG, Pereira MF, Galdino ACM, Santos ALS, Elias WP, Schuenck RP, Spano LC. (2019).
 Typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* are both virulent in the *Galleria mellonella* model. Frontiers in Microbiology, *in press*.
- Ventura R, Peregrino IV, Galdino ACM, Schuenck RP, Devereux M, Mccann M, Santos ALS, Nunes APF. (2019). Antimicrobial action of 1,10-phenanthroline-based compounds on carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains: efficacy against planktonicand biofilm-growing cells. Submetido à Frontiers in Microbiology.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published September 27, 2015 Journal of Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkv292

Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells

Livia Viganor^{1,2}†, Anna Clara M. Galdino^{1,3}†, Ana Paula F. Nunes⁴, Kátia R. N. Santos⁵, Marta H. Branquinha¹, Michael Devereux², Andrew Kellett⁶, Malachy McCann⁷ and André L. S. Santos^{1,2}*

¹General Microbiology Department, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
²The Inorganic Pharmaceutical and Biomimetic Research Centre, Focas Research Institute, Dublin Institute of Technology, Dublin, Ireland;
³Biochemistry Post-Graduation Programme, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Pathology Department and Infection Diseases Post-Graduation Programme, Federal University of Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil; ⁵Medical Microbiology Department, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ⁵Medical Microbiology Department, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ⁶School of Chemical Sciences and the National Institute for Cellular Biotechnology, Dublin City University, Dublin, Ireland; ⁷Chemistry Department, Maynooth University, National University of Ireland, Maynooth, Ireland

*Corresponding author. Laboratório de Investigação de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E-subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. Tel: +55-21-3938-6740; Fax: +55-21-3938-8344; E-mail: andre@micro.ufrj.br †These authors contributed equally to this work.

Received 8 July 2015; returned 6 August 2015; revised 11 August 2015; accepted 21 August 2015

Objectives: The beneficial antimicrobial properties of 1,10-phenanthroline (phen)-based drugs, together with the imperative need to develop new chemotherapeutic options for prevention/treatment of infections caused by MDR Gram-negative bacteria, led us to evaluate the effects of phen, 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Ag(phendione)₂]ClO₄ and [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂.4H₂O on planktonic- and biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: Thirty-two non-duplicated Brazilian clinical isolates of *P. aeruginosa* with distinct genetic backgrounds were used in all experiments. The effect of test compounds on planktonic bacterial proliferation was determined as recommended by CLSI protocol. The effect on biofilm formation was evaluated by crystal violet incorporation (biomass determination) and XTT (viability assay). Mature biofilm disorganization was evidenced by staining with crystal violet.

Results: Phen-based compounds presented anti-*P. aeruginosa* activity, but with different potencies concerning the geometric mean MIC: $[Cu(phendione)_3]^{2+}$ (7.76 μ M) > [Ag(phendione)_2]⁺ (14.05 μ M) > phendione (31.15 μ M) > phen (579.28 μ M). MICs of each compound were similar irrespective of whether the *P. aeruginosa* isolates were susceptible or resistant to classical antimicrobials (ceftazidime, meropenem and imipenem). The pretreatment of bacteria with phen, phendione and phendione's metal derivatives at 0.5 × MIC value inhibited biofilm formation, particularly the use of [Cu(phendione)_3]²⁺ and [Ag(phendione)_2]⁺, which significantly reduced both biomass (48% and 44%, respectively) and viability (78% and 77%, respectively). The compounds studied also disrupted mature biofilm in a dose-dependent manner, especially [Ag(phendione)_2]⁺ and [Cu(phendione)_3]²⁺ (IC₅₀, 9.39 and 10.16 μ M, respectively).

Conclusions: Coordination of phendione to Ag^+ and Cu^{2+} represents a new promising group of anti-infective agents, which revealed a potent anti-*P. aeruginosa* action against both planktonic- and biofilm-growing cells.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a widespread Gram-negative bacterium that inhabits the surfaces of natural and artificial aqueous environments. Moreover, *P. aeruginosa* is a relevant pathogen able to cause a variety of severe opportunistic infections in immunocompromised individuals, causing significant levels of morbidity and mortality.¹ Aggravating this scenario, *P. aeruginosa* is a pathogen typically isolated from nosocomial infections, and the emergence of MDR *P. aeruginosa* isolates limits the number of effective antimicrobial agents that are available to treat infected patients, leading to a calamitous situation in the medical arena worldwide.^{1–3} The biofilm-forming capability of *P. aeruginosa* isolates is a crucial virulence attribute that decisively contributes to

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

1 of 7

Pseudomonas aeruginosa and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host

Anna Clara M. Galdino, Marta H. Branquinha, André L.S. Santos and Lívia Viganor

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous and opportunistic human pathogen that represents a critical problem to the clinician due to the increased number of resistant strains isolated from hospital settings. In addition, there is a great variety of pathologies associated with this versatile Gram-negative bacterium. *P. aeruginosa* cells are able to produce an incredible arsenal of virulence factors, especially secreted molecules that act singly or together to ensure the establishment, maintenance, and persistence of a successful infection in susceptible hosts. In this context, pseudomonal proteases' roles are highlighted due to their ability to cleave key host proteinaceous substrates as well as to modulate several biological processes, for example, escaping and modulating the host immune responses in the bacterial own favor. Proteases secreted by *P. aeruginosa* include elastase A (LasA), elastase B (LasB), alkaline protease (AP), protease IV (PIV), *Pseudomonas* small protease (PASP), large protease A (LepA), MucD, and *P. aeruginosa* aminopeptidase (PAAP). In the present review, we discuss the role of each of these relevant proteases produced by

381

A.C.M. Galdino · A.L.S. Santos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq), Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

A.C.M. Galdino · M.H. Branquinha · A.L.S. Santos (⊠) · L. Viganor Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil e-mail: andre@micro.ufrj.br

L. Viganor (🖂)

The Centre for Biomimetic & Therapeutic Research, Focas Research Institute, Dublin Institute of Technology, Camden Row, Dublin 8, Dublin, Ireland e-mail: liviaviganor@gmail.com

[©] Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017

S. Chakraborti and N.S. Dhalla (eds.), *Pathophysiological Aspects of Proteases*, DOI 10.1007/978-981-10-6141-7_16

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 05/12/2017. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017;35(10):630-637



Original article

Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*



Anna Clara M. Galdino^{a,b,1}, Lívia Viganor^{b,c,1}, Mariangela Ziccardi^d, Ana Paula F. Nunes^e, Kátia R.N. dos Santos^f, Marta H. Branquinha^b, André L.S. Santos^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil ^c The Inorganic Pharmaceutical and Biomimetic Research Centre, Focas Research Institute, Dublin Institute of Technology, Dublin, Ireland

^d Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

e Departamento de Patologia e Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil

^f Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 13 April 2016 Accepted 26 June 2016

Keywords: Pseudomonas aeruginoso

Brazilian clinical isolates Virulence factors Proteases Gelatinases Elastase

ABSTRACT

Background: Pseudomonas aeruginosa is an important human pathogen that causes severe infections in a wide range of immunosuppressed patients. Herein, we evaluated the proteolytic profiles of 96 Brazilian clinical isolates of *P. aeruginosa* recovered from diverse anatomical sites.

Methods: Cell-associated and extracellular proteases were evidenced by gelatin–SDS–PAGE and by the cleavage of soluble gelatin. Elastase was measured by using the peptide substrate *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*P*-nitroanilide. The prevalence of elastase genes (*lasA* and *lasB*) was evaluated by PCR.

Results: Bacterial extracts were initially applied on gelatin–SDS–PAGE and the results revealed four distinct zymographic profiles as follows: profile I (composed by bands of 145, 118 and 50 kDa), profile II (118 and 50 kDa), profile III (145 kDa) and profile IV (118 kDa). All the proteolytic enzymes were inhibited by EDTA, identifying them as metalloproteases. The profile I was the most detected in both cellular (79.2%) and extracellular (84.4%) extracts. Overall, gelatinase and elastase activities measured in the spent culture media were significantly higher (around 2-fold) compared to the cellular extracts and the production level varied according to the site of bacterial isolation. For instance, tracheal secretion isolates produced elevated amount of gelatinase and elastase measured in both cellular extracts. The prevalence of elastase genes revealed that 100% isolates were *lasB*-positive and 85.42% *lasA*-positive. Some positive/negative correlations were showed concerning the production of gelatinase, isolation site and antimicrobial susceptibility.

Conclusion: The protease production was highly heterogeneous in Brazilian clinical isolates of *P. aerugin*osa, which corroborates the genomic/metabolic versatility of this pathogen.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

La producción heterogénea de las proteasas a partir de aislamientos clínicos brasileños de *Pseudomonas aeruginosa*

RESUMEN

Antecedentes: Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) es un importante patógeno humano que causa graves infecciones en diversos tipos de pacientes inmunodeprimidos. En este trabajo evaluamos los perfiles proteolíticos de 96 aislamientos clínicos brasileños de P. aeruginosa aislados de diferentes localizaciones anatómicas.

Métodos: Las proteasas extracelulares y de extractos celulares fueron analizadas por SDS-PAGE copolimerizada con gelatina y a través de clivaje de gelatina en solución. La elastasa fue medida usando

* Corresponding author.

Palabras clave:

Proteasas

Elastasa

Gelatinasas

Pseudomonas aeruginosa

Factores virulentos

Aislamientos clínicos brasileños

- E-mail address: andre@micro.ufrj.br (A.L.S. Santos)
- ¹ These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.015

0213-005X/© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Editorial

Pseudolysin (elastase B): a protagonist in the pseudomonas aeruginosa pathogenesis.

André L S Santos^{1,2*}, Anna Clara M Galdino^{1,2}, Marta H Branquinha¹

¹Department of General Microbiology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Postgraduate Program in Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Editorial

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen with huge medical relevance worldwide, since it is associated to both acute and chronic infections with impressive morbidity and mortality rates [1]. This Gram negative bacterium has ubiquitous distribution, being able to colonize a vast diversity of habitats with distinct physicochemical characteristics, such as soil, water, plants, animals and humans [1]. This versatility can be assigned, at least in part, to *P. aeruginosa* genome plasticity, which reflects in its ability to quickly modulate the metabolic repertoire in order to adapt to the changes in environmental conditions [2]. For all these reasons, *P. aeruginosa* might cause a wide variety of human infections, with special clinic emphasis in immunocompromised patients [1,3].

Pseudomonas aeruginosa cells are able to produce a myriad of virulence attributes, including both cell-associated (e.g., pili, flagellum, non-pilus adhesins, lipopolysaccharide) and secreted factors (e.g., alginate, exotoxins, hemolysins, siderophores, pigments, proteases), which act synergistically towards to the establishment of the infectious process (Figure 1) [4]. Among the pseudomonal virulence arsenal, pseudolysin is, with no doubt, one of the main protagonists involved in many phases of the P. aeruginosa pathogenesis. Pseudolysin, also known as elastase B, is a classical zinc-dependent metalloprotease that belongs to the M4 thermolysin-like family according to MEROPS database (merops.sanger.ac.uk) [4]. This enzyme is encoded by lasB gene, and its transcription is orchestrated by las and rhl quorum sensing systems [5]. Pseudolysin is synthetized in the bacterial cytoplasm as a pre-proenzyme of 498 amino acids (roughly 53 kDa). After the cleavage of the signal peptide, during its translocation throughout the inner membrane, the proenzyme has its structure stabilized by the formation of a disulfide bond between Cys270 and Cys297 residues. Then, the proenzyme is secreted into the extracellular environment, where the proenzyme becomes in its mature and active form by the dissociation of the pro-peptide [6].



Accepted on December 11, 2017

Figure 1. *Pseudomonas aeruginosa* showing the typical green colonies due to the production of pyocyanin pigment when grown on centrimide agar medium (A) and the production of extracellular protease when cultivated in skin milk agar (B).

Pseudolysin was firstly described as an elastinolytic enzyme. However, it is currently well-recognized that pseudolysin could degrade a huge variety of proteinaceous substrates, including key host components. The pseudolysin mechanism of protein cleavage is based on the hydrolysis of non-terminal peptide bonds of aromatic and/or large aliphatic amino acids at the P1' position [7]. Due to the pseudolysin broad cleaving action, this enzyme could perform a multivalent role during *P. aeruginosa* infections, and hence its enzymatic activity is correlated with the aggravation of lung infection, development of chronic ulcers, muscle damage, corneal liquefaction and hemorrhagic events.

Pseudolysin is the major factor that promotes tissue invasion and damage during P. aeruginosa infections due to the cleavage of extracellular matrix components (e.g., elastin, fibronectin, fibrin and collagen type III and type IV) as well as the disruption of the membrane basement by attacking the intercellular tight junctions and by destroying cell-to-cell and cell-to-matrix adhesion receptors [8]. In addition, the direct proteolysis of host constituents also provides nutrients for bacterial growth and proliferation [9]. Furthermore, pseudolysin helps the bacterial cells to evade the host immune system attack by cleaving humoral components that are essential to the bacterial clearance, such as tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interferon gamma (IFN-γ), interleukin 2 (IL-2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), complement proteins, epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78) and surfactants proteins as well as by inducing the immunomodulation of host inflammatory mediators [4,10].

Microbiol Curr Res. 2018 Volume 2 Issue 1



Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Protein and Peptide Science, 2019, 20, 1-17

REVIEW ARTICLE

Anti-Virulence Strategy against the Multidrug-Resistant Bacterial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Pseudolysin (Elastase B) as a Potential Druggable Target

Anna Clara M. Galdino^{a,b}, Matheus P. de Oliveira^c, Teodorico C. Ramalho^d, Alexandre A. de Castro^d, Marta H. Branquinha^{a,*} and André L.S. Santos^{a,b,*}

^aDepartamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ^cDepartment of Integrative Biology and Physiology, University of California, Los Angeles, USA; ^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: September 24, 2018 Revised: January 26, 2019 Accepted: January 31, 2019

10.2174/1389203720666190207100415

Abstract: Pseudomonas aeruginosa is a non-fermentative, gram-negative bacterium that is one of the most common pathogens responsible for hospital-acquired infections worldwide. The management of the infections caused by P. aeruginosa represents a huge challenge in the healthcare settings due to the increased emergence of resistant isolates, some of them resistant to all the currently available antimicrobials, which results in elevated morbimortality rates. Consequently, the development of new therapeutic strategies against multidrug-resistant P. aeruginosa is urgent and needful. P. aeruginosa is wellrecognized for its extreme genetic versatility and its ability to produce a lush variety of virulence factors. In this context, pseudolysin (or elastase B) outstands as a pivotal virulence attribute during the infectious process, playing multifunctional roles in different aspects of the pathogen-host interaction. This protein is a 33-kDa neutral zinc-dependent metallopeptidase that is the most abundant peptidase found in pseudomonal secretions, which contributes to the invasiveness of P. aeruginosa due to its ability to cleave several extracellular matrix proteins and to disrupt the basolateral intercellular junctions present in the host tissues. Moreover, pseudolysin makes P. aeruginosa able to overcome host defenses by the hydrolysis of many immunologically relevant molecules, including antibodies and complement components. The attenuation of this striking peptidase therefore emerges as an alternative and promising antivirulence strategy to combat antibiotic-refractory infections caused by P. aeruginosa. The anti-virulence approach aims to disarm the P. aeruginosa infective arsenal by inhibiting the expression/activity of bacterial virulence factors in order to reduce the invasiveness of P. aeruginosa, avoiding the emergence of resistance since the proliferation is not affected. This review summarizes the most relevant features of pseudolysin and highlights this enzyme as a promising target for the development of new anti-virulence compounds.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, virulence, resistance, bacterial pathogen, pseudolysin, anti-virulence strategy.

1. INTRODUCTION

1.1. Pseudomonas aeruginosa - An Overview

Pseudomonas aeruginosa is a resourceful bacterium able to grow in a myriad of carbon and nitrogen sources due to its robust and versatile metabolic machinery. Given its great adaptability, this gram-negative bacterium can thrive in a

1389-2037/19 \$58.00+.00

wide range of environmental niches, including soil, plant rhizosphere and phyllosphere, as well as animal tissues presenting distinct physicochemical features [1, 2]. The *P. aeruginosa* metabolic versatility might be related to its large genome (6.3 million of base pairs) and its sophisticated regulatory gene expression system (approximately 8.4% of genes are involved in the regulatory processes) [3].

Pseudomonas aeruginosa also carries an outstanding genetic machinery of intrinsic antibiotic resistance. Thereby, the acquirement of genetic resistance determinants followed by the remarkable selection of mutant strains, which could resist to an antimicrobial stress, makes the treatment of *P. aeruginosa* infections a special challenging issue [4-6]. For this reason, *P. aeruginosa* has been a concern for health care settings as the frequent cause of acute/chronic nosocomial

© 2019 Bentham Science Publishers

^{*}Address correspondence to these authors at the Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E - subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil; Tel: +55 21 3938 0366; Fax: +55 21 3938 8344; E-mails: mbranquinha@micro.ufrj.br (M.H. Branquinha), andre@micro.ufrj.br (A.L.S. Santos)

14/07/2019

E-mail de Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Frontiers: Congratulations! Your manuscript is accepted - 455359



André Luis Souza dos Santos <andre@micro.ufrj.br>

Frontiers: Congratulations! Your manuscript is accepted - 455359 10 mensagens

Frontiers Microbiology Editorial Office <microbiology.editorial.office@frontiersin.org> 10 de julho de 2019 09:08 Responder a: Frontiers Microbiology Editorial Office <microbiology.editorial.office@frontiersin.org> Para: andre@micro.ufri.br

Dear Dr Santos,

Frontiers Microbiology Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

I am pleased to inform you that your manuscript Disarming Pseudomonas aeruginosa Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-dione-Based Compounds: Elastase B (lasB) as a Chemotherapeutic Target has been approved for production and accepted for publication in Frontiers in Microbiology, section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.

Manuscript title: Disarming Pseudomonas aeruginosa Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6dione-Based Compounds: Elastase B (lasB) as a Chemotherapeutic Target Journal: Frontiers in Microbiology, section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy Article type: Original Research Authors: Anna Clara Galdino, Livia Viganor, Alexandre de Castro, Elaine da Cunha, Mary Hunt, Megan O'Shaughnessy, Orla Howe, Michael Devereux, Malachy McCann, Teodorico Ramalho, Marta Branquinha, André Santos Manuscript ID: 455359 Edited by: Zhiyong Zong

Your manuscript is currently being prepared for production, and the abstract or introductory section is available online in provisional form. Please click here to access the final review reports and your manuscript directly: http://www.frontiersin.org/Review/EnterReviewForum.aspx?activationno=c32c43b3-2e94-47c1-893e-2f5c860e2b2f

You will be contacted as soon as the author proofs are ready for your revisions. Please do not communicate any changes until then.

As an author, it is important that you maintain your Frontiers research network (Loop) profile up to date, as your publication will be linked to your profile allowing you and your other publications to become more discoverable. You can update profile pages (profile pictures, short bio, list of publications) by clicking on this link: http://loop.frontiersin.org/people/

Tell us what you think!

At Frontiers we are constantly trying to improve our Collaborative Review process and would like to get your feedback on how we did. Please complete our short 3-minute survey and we will donate \$1 to Enfants du Monde, a Swiss non-profit organization:

https://frontiers.qualtrics.com/jfe/form/SV_8q8kYmXRvxBH5at?survey=author&aid=455359&uid=362298

Thank you very much for taking the time to share your thoughts.

Best regards,

Your Frontiers in Microbiology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team www.frontiersin.org Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005 Lausanne, Switzerland Office T 41 21 510 17 25

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

André Luis Souza dos Santos <andre@micro.ufrj.br>

10 de julho de 2019 10:15

https://mail.google.com/mail/u/0?ik=4136b4cc29&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1638673145890338995&simpl=msg-f%3A1638673... 1/4

G Model IIMM-50965: No. of Pages 12

ARTICLE IN PRESS

International Journal of Medical Microbiology xxx (2015) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect



International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijmm



Candida parapsilosis (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes

Mariangela Ziccardi^{a,b,1}, Lucieri O.P. Souza^{a,1}, Rafael M. Gandra^{a,c}, Anna Clara M. Galdino^{a,c}, Andréa R.S. Baptista^d, Ana Paula F. Nunes^e, Mariceli A. Ribeiro^e, Marta H. Branquinha^a, André L.S. Santos^{a,c,*}

^a Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

^e Departamento de Patologia, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 29 April 2015 Received in revised form 28 July 2015 Accepted 10 August 2015

Keywords:

Candida parapsilosis complex Antifungal susceptibility Virulence factors Pseudohyphae Hydrolytic enzymes Biofilm

ABSTRACT

Candida parapsilosis (sensu lato), which represents a fungal complex composed of three genetically related species - Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis, has emerged as an important yeast causing fungemia worldwide. The goal of the present work was to assess the prevalence, antifungal susceptibility and production of virulence traits in 53 clinical isolates previously identified as C. parapsilosis (sensu lato) obtained from hospitals located in the Southeast of Brazil. Species forming this fungal complex are physiologically/morphologically indistinguishable; however, polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism of FKS1 gene has solved the identification inaccuracy, revealing that 43 (81.1%) isolates were identified as C. parapsilosis sensu stricto and 10 (18.9%) as C. orthopsilosis. No C. metapsilosis was found. The geographic distribution of these Candida species was uniform among the studied Brazilian States (São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo). All C. orthopsilosis and almost all C. parapsilosis sensu stricto (95.3%) isolates were susceptible to amphotericin B. fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin. Nevertheless, one C. parapsilosis sensu stricto isolate was resistant to fluconazole and another one was resistant to caspofungin. C. parapsilosis sensu stricto isolates exhibited higher MIC mean values to amphotericin B, fluconazole and caspofungin than those of C. orthopsilosis, while C. orthopsilosis isolates displayed higher MIC mean to itraconazole compared to C. parapsilosis sensu stricto. Identical MIC mean values to voriconazole were measured for these Candida species. All the isolates of both species were able to form biofilm on polystyrene surface. Impressively, biofilm-growing cells of C. parapsilosis sensu stricto and C. orthopsilosis exhibited a considerable resistance to all antifungal agents tested. Pseudohyphae were observed in 67.4% and 80% of C. parapsilosis sensu stricto and C. orthopsilosis isolates, respectively. The secretion of phytase (93% versus 100%), aspartic protease (88.4% versus 90%), esterase (20.9% versus 50%) and hemolytic factors (25.6% versus 40%) was detected in C. parapsilosis sensu stricto and C. orthopsilosis isolates, respectively; however, no phospholipase activity was identified. An interesting fact was observed concerning the caseinolytic activity, for which all the producers (53.5%) belonged to C. parapsilosis sensu stricto. Collectively, our results add new data on the epidemiology, antifungal susceptibility and production of potential virulence attributes in clinical isolates of C. parapsilosis complex.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratório de Investigação de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E-subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

E-mail address: andre@micro.ufrj.br (A.L.S. Santos).

¹ These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.003 1438-4221/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Ziccardi, M., et al., *Candida parapsilosis (sensu lato)* isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. Int. J. Med. Microbiol. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.003



Journal of Infectious Diseases and Diagnosis

Santos et al., J Infect Dis Diagn 2016, 1:1 http://dx.doi.org/10.4172/jidd.1000104

Open Access

Candida albicans Involvement in Denture-Related Stomatitis: A Serious and Real Clinical Concern

André LS Santos^{1,2*}, Isadora S Carvalho³, Juliano M Prata³, Matheus B Martins³, Lucieri OP Souza¹, Anna Clara M Galdino^{1,2}, Lys A Braga-Silva¹, Marta H Branquinha¹, Suely Maria Rodrigues⁴ and Lourimar VNF Sousa³

¹Laboratório de Investigação de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq), Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

³Laboratório de Microbiologia, Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil

⁴Núcleo de Pesquisa Saúde, Individuo e Sociedade (SAIS), Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: André L.S. Santos, Laboratório de Investigação de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E - subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil, Tel: +55 21 3938 6740; E-mail: andre@micro.ufrj.br

Received date: January 25, 2016; Accepted date: February 12, 2016; Published date: February 18, 2016

Copyright: © 2016 André LS Santos, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Denture stomatitis, also known as atrophic candidiasis, remains the most frequent form of oral candidiasis, being detected in approximately 25%-65% of denture-wearing patients. Denture stomatitis is characterized by an erythematous inflammation of mucosal areas covered by prosthesis with preferential localization in the patalal mucosa. Although the clinical entity of this infectious disease is multifactorial, *Candida albicans* is the major etiological agent. The treatment of this oral infection is difficult because failures and recurrences are extremely common. In the present opinion article, we have presented a brief review on this oral pathology, summarizing the main predisposing factors, clinical diagnosis and current effective options to prevent and treat the affected population.

Keywords: Oral candidiasis; Denture stomatitis; Atrophic candidiasis; Predisposing factors; Diagnosis; Prevention; Treatment

Opinion

In the last decades, the prevalence of *Candida* spp. infections has been rising in direct proportion to the increasingly aging population and the larger population of immunocompromised and critically ill patients, being the commonest human fungal infection reported in clinical settings around the globe [1-9]. Yeast-like microorganisms belonging to the *Candida* genus are the etiological agents of candidasis, which are common dwellers of the oral cavity, gastrointestinal tract and vagina of normal people. However, when the conditions become appropriate, the nonpathogenic yeast forms are transformed into pathogenic invasive forms [1-9] (Figure 1).



Figure 1: Candida albicans cells visualized under distinct methods. (A) Colonial morphology of C. albicans grown in CHROMagar Candida medium, showing the typical green color that corresponds to the presumptive identification of this fungal species. (B) Spherical chlamydospores (arrows), mostly terminal, often on a slightly swollen subtending cell are formed near the edge of the cover slip. (C-F) Different morphological growth forms of C. albicans. (C) yeasts, (D) pseudohyphae, (E) germ-tube and (F) hyphae.

Colonization of oral surfaces by *Candida* spp. is considered a risk factor for invasive fungal infections. Oropharyngeal candidiasis manifests clinically as acute pseudomembranous, acute atrophic, chronic atrophic, chronic hypertrophic/hyperplastic and angular cheilitis [5-9]. Denture-related stomatitis (or chronic atrophic

candidiasis) is characterized by an inflammation of the mucous membrane located beneath the prosthesis, particularly under the upper denture, sometimes accompanied by hemorrhagic petechiae [10-13] (Figure 2). Denture stomatitis is the commonest form of oral candidiasis and its reported prevalence varies widely reaching up to

J Infect Dis Diagn ISSN: JIDD, Open Access

Volume 1 • Issue 1 • 1000104

What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!

André Luis Souza dos Santos^{1,2/+}, Anna Clara Milesi Galdino^{1,2}, Thaís Pereira de Mello¹, Lívia de Souza Ramos¹, Marta Helena Branquinha¹, Ana Maria Bolognese³, José Columbano Neto⁴, Maryam Roudbary⁵

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral, Laboratório de Estudos Avançados em Microrganismos Emergentes e Resistentes, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontojaja, Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁴Faculdades São José, Faculdade de Odontologia, Disciplina de Ortodontia e Clínica Integrada Infantil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁵Iran University of Medical Sciences, School of Medicine, Department of Medical Mycology and Parasitology, Tehran, Iran

Biofilm formation is the preferred mode of growth lifestyle for many microorganisms, including bacterial and fungal human pathogens. Biofilm is a strong and dynamic structure that confers a broad range of advantages to its members, such as adhesion/ cohesion capabilities, mechanical properties, nutritional sources, metabolite exchange platform, cellular communication, protection and resistance to drugs (e.g., antimicrobials, antiseptics, and disinfectants), environmental stresses (e.g., dehydration and ultraviolet light), host immune attacks (e.g., antibodies, complement system, antimicrobial peptides, and phagocytes), and shear forces. Microbial biofilms cause problems in the hospital environment, generating high healthcare costs and prolonged patient stay, which can result in further secondary microbial infections and various health complications. Consequently, both public and private investments must be made to ensure better patient management, as well as to find novel therapeutic strategies to circumvent the resistance and resilience profiles arising from biofilm-associated microbial infections. In this work, we present a general overview of microbial biofilm formation and its relevance within the biomedical context.

Kev words: biofilm - microbial lifestyle - virulence - resistance - tolerance - anti-biofilm strategies

The social life of microorganisms - Microorganisms can colonise virtually every environment on Earth, including soils, water, and air-liquid interfaces - each of which present distinct physicochemical conditions. The ability to quickly adapt to different habitats can be explained, at least in part, by the fact that microbial cells are the most ancient representative lineage of living organisms and they have experienced many changes in environment over their billions of years of existence. This evolution has permitted the development of plastic genomes and, consequently, plastic metabolisms in many microorganisms, which allows for rapid mutation (plastic response) when faced with adversity.⁽¹⁾ With this perception in mind, curiously, microorganisms have been developing an amazing ability to resist diverse, and sometimes drastic, environmental insults and stresses. They have learned to live together in an "organised and well-orchestrated community" - the so-called "biofilm"

The word "community" is derived from the Old French "comuneté", which comes from the Latin "communis", meaning "shared in common". Community can be defined as a social group (an assemblage of interacting

doi: 10.1590/0074-02760180212 Financial support: FAPERJ, CNPg, CAPES + Corresponding author: andre@micro.ufrj.br Received 23 April 2018 Accepted 2 July 2018

0 00

populations) of any size, whose members occupy a given area or a specific locality, share common characteristics or interests, establish communication platforms, and often have a common heritage. In the microbial world, the concept of living together can be applied to all of these avenues, contemplating the integration and fulfilment of all of the needs of a group. Furthermore, living together stimulates and promotes several beneficial features for microorganisms compared to living a solitary life. Undoubtedly, protection and tolerance/resistance are the most beneficial aspects of being an active participant within a well-established microbial community.(2

Biofilm: the preferred microbial lifestyle - The idea that microorganisms are able to live together and form biofilms is indeed an old one, dating back to the classical and primordial studies by Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), who first reported the concept of "microbial aggregation" on the surface of teeth, and Louis Pasteur (1822-1895), who described the microbial community to be the cause of wine becoming acetic.⁽³⁾ Generally, biofilms are defined as communities of properly organised microorganisms (as a typical social cooperation system) attached to an inert or living substrate (Fig. 1) and embedded in a self-produced extracellular matrix (also called extracellular polymeric substance) composed of (glyco) proteins, (glyco)lipids, (mono)/(poly)saccharides, extracellular DNA, minerals, and water, which works like an adhesive favouring cell-cell and cell-substrate interactions. Additionally, the biofilm extracellular matrix can contain host-derived components, such as human serum, saliva glycoproteins, and vaginal excretions.(4-8)

online | memorias.ioc.fiocruz.br

REV/IEW



Synthesis and antimicrobial activity of a phenanthrolineisoniazid hybrid ligand and its Ag⁺ and Mn²⁺ complexes

Muhib Ahmed · Denise Rooney : Malachy McCann · Michael Devereux · Brendan Twamley · Anna Clara Milesi Galdino · Leandro Stefano Sangenito · Lucieri Olegario Pereira Souza · Maria Cristina Lourenço · Karen Gomes · André Luis Souza dos Santos

Received: 24 April 2019/Accepted: 14 June 2019 © Springer Nature B.V. 2019

Abstract Hydrazide ligand, (*Z*)-*N*'-(6-oxo-1,10phenanthrolin-5(6H)-ylidene)isonicotinohydrazide, **1** forms from a 1:1 Schiff base condensation reaction between isoniazid (INH) and 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione). Ag⁺ and Mn²⁺ complexes with 1:2 metal:ligand stoichiometry are prepared: [Ag(1)₂]NO₃, [Ag(1)₂]BF₄ and [Mn(1)₂](NO₃)₂. Polymeric {[Ag(1)(NO₃)]}_n has 1:1 stoichiometry and forms upon infusion of CH₂Cl₂ into a DMSO solution of [Ag(1)₂]NO₃. {[Ag(1)(NO₃)]}_n was structurally characterized using X-ray crystallography. Metal-free **1** and its 1:2 complexes exhibit very good, broadspectrum antimicrobial activity and are not excessively toxic to mammalian cells (A549 lineage).

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s10534-019-00204-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Ahmed · D. Rooney (⊠) · M. McCann Department of Chemistry, Maynooth University, Maynooth, County Kildare, Ireland e-mail: denise.roonev@mu.ie

M. Devereux The Inorganic Pharmaceutical and Biomimetic Research Centre, Focas Research Institute, TU Dublin - City

Campus, Kevin Street, Dublin 8, Ireland

B. Twamley

School of Chemistry Trinity College Dublin, University of Dublin, Dublin 2, Ireland

Published online: 22 June 2019

Keywords 1,10-Phenanthroline · Metal complexes · Antibacterial activity · Antibiotic resistance · Anti-tuberculosis activity

Introduction

Pathogenic bacteria, fungi, parasites and viruses can trigger sepsis, a condition whereby the body's response to infection induces tissue and organ dysfunction, leading to excessive morbidity and mortality. In both community and clinic settings septicaemia is estimated to affect over 30 million people annually and causes up to 6 million fatalities (WHO factsheet 2018). The World Health Assembly (WHA) (Seventh WHA 2018) and the World Health Organization (WHO) (WHO factsheet 2018) both acknowledge that more investment is required for research into finding

A. C. M. Galdino · L. S. Sangenito · L. O. P. Souza · A. L. S. dos Santos Department of General Microbiology, Microbiology Institute Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

M. C. Lourenço · K. Gomes Bacteriology Laboratory, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

🖄 Springer

 Frontiers: Your manuscript submission - 466655
 Image: Comparison - 466655

 Frontiers: Microbiology Editorial Office - microbiology.editorial.office@frontiersin.org>
 quarta, 17/04, 16:58
 Image: Comparison - 466655

 Para eu = *
 Image: Comparison - 466655
 Image: Comparison - 466655
 Image: Comparison - 466655

 Para eu = *
 Image: Comparison - 466655
 Image: Comparison - 466655
 Image: Comparison - 466655
 Image: Comparison - 466655

 Para eu = *
 Image: Comparison - 466655
 Image: Comparison - 4666555
 Image: Compariso

Best regards,

Your Frontiers in Microbiology team

ABSTRACT

Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) is an emerging pathotype responsible for acute and persistent diarrhea. It can be classified as typical and atypical strains, respectively, based on the presence or absence of the AggR regulon, suggesting a higher virulence for typical EAEC. This study aimed to evaluate in the Galleria mellonella model if there are differences in the virulence profiles among clinical strains of typical and atypical EAEC, prototype strains EAEC C1096, 042 and its aggR mutant. The clinical EAEC strains (n=20) were analyzed for the presence of 22 putative virulence factors of EAEC or extraintestinal E. coli by PCR, as well as phenotypic characteristics of virulence (enzymes, siderophore and biofilm). The survival of the larvae was analyzed after inoculation of 10⁴ to 10⁷ CFU/larva; the monitoring of bacterial growth *in vivo* and hemocyte quantification was determined after inoculation of the prototype strains (105 CFU/larva) at different periods after infection. The strains of typical and atypical EAEC presented the same virulence profile for the larva, regardless of the amount or type of genes and phenotypic aspects of virulence analyzed. In addition, the EAEC 042 aggR mutant strain showed a significant reduction in the mortality of the inoculated larvae compared to the wild-type strain. In conclusion, the results obtained herein demonstrate that the virulence of EAEC seems to be related to the AggR regulon, but not exclusively, and atypical EAEC strains may be as virulent as typical ones in vivo in the G. mellonella model.

	Frontiers: Your manuscript submission - 478431 Caixa de entrada x	ø	Ø		
?	Frontiers Microbiology Editorial Office <microbiology.editorial.office@frontiersin.org> quinta, 13/06, 21:38 📩</microbiology.editorial.office@frontiersin.org>	*	:		
	XA inglês → português → Traduzir mensagem Desativar para mensagensem:	Desativar para mensagens em: inglês 🗙			
	Dear Dr Galdino,				
	Frontiers Microbiology Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response				

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Antimicrobial action of 1,10-phenanthroline-based compounds on carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii clinical strains efficacy against planktonic- and biofilm-growing cells" to be considered for publication in Frontiers in Microbiology, section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.

ABSTRACT

Considering the necessity to find new compounds with antimicrobial activity to combat multidrugresistant (MDR) bacteria and the beneficial pharmacological properties of metal-based drugs, the present study aimed to evaluate the effects of 1,10-phenanthroline (phen), 1,10-phenanthroline-5,6dione (phendione), [Ag(phendione)₂]ClO₄ (Ag-phendione) and [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂.4H₂O (Cuphendione) on 26 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii clinical strains. The susceptibility to carbapenems was performed by detection of metalo-beta-lactamase (MBL) genes by PCR, meropenem (MPM)/EDTA combination disk test and calculation of minimal inhibitory concentration (MIC), whereas the disk diffusion method was applied to evaluate the susceptibility to other antimicrobial classes. The effect of test compounds on planktonic- and biofilm-growing cells was also determined. All the strains had the intrinsic bla_{OXA-51} gene, while 24 (92.3%) and 2 (7.7%) strains were respectively positive for bla_{0XA-23} and bla_{0XA-24} genes. The MPM/EDTA test revealed that 25 (96.15%) strains produced MBL and 21 (80.7%) were classified as MDR strains. Regarding the test compounds, the geometric mean MIC and minimal bactericidal concentration values, respectively, were as follows: Cu-phendione (1.56 and 2.30 μ M), Ag-phendione (2.48 and 3.63 μ M), phendione (9.44 and 9.70 µM) and phen (70.46 and 184.28 µM). The pre-treatment of bacteria with the test compounds (0.5×MIC) inhibited the biofilm formation, reducing both biomass and viability. Additionally, the test compounds disrupted the mature biofilm in a typically dose-dependent manner, with Cu-phendione (IC₅₀ = 13.54 μ M) and Ag-phendione (IC₅₀ = 22.05 μ M) having the best inhibitory actions. Collectively, phenanthroline-based compounds, particularly Ag-phendione and Cu-phendione, presented potent antimicrobial action against both planktonic- and biofilm-forming cells of carbapenemases-producing A. baumannii.