



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCIANA BITENCOURT DE SOUZA FERREIRA

**MODULAÇÃO DO *QUORUM SENSING* DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
PELA INTERAÇÃO DO AJOENO COM A PROTEÍNA HFQ — UMA PERSPECTIVA
ESTRUTURAL**

CAMPINAS

2023

LUCIANA BITENCOURT DE SOUZA FERREIRA

**MODULAÇÃO DO *QUORUM SENSING* DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
PELA INTERAÇÃO DO AJOENO COM A PROTEÍNA HFQ — UMA PERSPECTIVA
ESTRUTURAL**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Ciências Farmacêuticas: Insumos Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE/DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LUCIANA BITENCOURT DE SOUZA FERREIRA, ORIENTADA PELO PROF. DR. DANIEL FÁBIO KAWANO.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F413m Ferreira, Luciana Bitencourt de Souza, 1990-
Modulação do quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa* pela interação do ajoeno com a proteína Hfq - uma perspectiva estrutural / Luciana Bitencourt de Souza Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Daniel Fábio Kawano.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Acil-butirolactonas. 2. Pequeno RNA não traduzido. I. Kawano, Daniel Fábio, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by ajoene through direct competition with small RNAs for binding at the proximal site of Hfq - a structure-based perspective

Palavras-chave em inglês:

Acyl-butyrolactones

RNA, Small untranslated

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Daniel Fábio Kawano [Orientador]

Karina Cogo Muller

Mauricio Ferreira Marcondes Machado

Rodrigo Ramos Catharino

Vinicius Barreto da Silva

Data de defesa: 07-08-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1248-6928>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9014222197027073>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Autora Luciana Bitencourt de Souza Ferreira

Orientador Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano

Tese aprovada em 7 de agosto de 2023

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano

Prof^a Dr^a Karina Cogo Müller

Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Prof. Dr. Vinicius Barreto da Silva

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Campinas, 7 de agosto de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais e em especial ao meu marido por me
apoiar sempre.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus por ter conseguido chegar até aqui. Apesar das dificuldades, sei que seu cuidado para comigo me ajudou a seguir em frente.

A meus pais por me apoiarem sempre. O incentivo que sempre depositaram em mim fez com que eu realizasse meu sonho de fazer doutorado.

Ao meu marido, que mesmo nas horas mais difíceis sempre esteve ao meu lado. Sem seu apoio, nada disso seria possível.

Ao meu orientador, que sempre me deu suporte e orientação para que esse trabalho fosse realizado da melhor forma possível. Tudo o que aprendi até aqui foi graças a professores maravilhosos. Vou levar com carinho todo os ensinamentos.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, por me ajudarem sempre quando foi preciso, em especial ao Xisto e à Ana Thereza. Obrigada pelas conversas e por toda a ajuda.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa associada a infecções crônicas e agudas, sendo um patógeno frequente em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com fibrose cística. Como forma de se adaptar ao hospedeiro, estas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência como bombas de efluxo, produção de β -lactamases e um sistema de *quorum sensing*, os quais promovem a resistência a antibióticos. O *quorum sensing* permite a comunicação intra/inter-espécies com base na liberação no meio de moléculas chamadas de autoindutores, cuja produção é dependente da densidade populacional. Assim, o *quorum sensing* é a principal forma dos microrganismos modularem sua expressão gênica, controlando processos celulares como a formação de biofilmes e a expressão de fatores de virulência. Dentre os compostos capazes de modular o *quorum sensing* de *P. aeruginosa* está o ajoeno, um organossulforado extraído do alho capaz de bloquear, de maneira dose-dependente, a expressão de fatores de virulência na bactéria. Embora a ação do ajoeno sobre o *quorum sensing* em *P. aeruginosa* tenha sido associada à interação com a proteína Hfq bacteriana, não existem informações acerca desta interação que possam guiar o desenvolvimento de novos inibidores da Hfq. Neste trabalho, através da correlação entre as afinidades estimadas para a interação de análogos do ajoeno com a proteína Hfq e valores de IC_{50} acerca da redução na transcrição de um fator de virulência após a inibição do *quorum sensing* bacteriano, foi possível propor que o ajoeno atua bloqueando a ligação de *small RNAs* (sRNAs) no sítio proximal da Hfq, evitando assim os processos subsequentes de estabilização destes sRNAs no sítio lateral bem como o seu pareamento com RNAs mensageiros no sítio distal. Além de definir o modo de ligação mais provável de interação do ajoeno com o sítio proximal da Hfq, este trabalho permitiu elucidar os requisitos estruturais mínimos que são as ligações de hidrogênio, π -alquil e π - π para a interação com a proteína, informações estas que guiarão o desenvolvimento de novos inibidores a serem sintetizados em trabalhos futuros.

Palavras-chaves: Sistema RhlR/RhlI de *quorum sensing*, *N*-acil homoserina lactonas, *small RNAs*, compostos organossulfurados.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium that causes chronic and acute infections, mainly in immunocompromised and cystic fibrosis patients. To adapt to the host, these bacteria have developed resistance mechanisms such as efflux pumps, β -lactamases and a *quorum sensing* system, which provide resistance to antibiotics. *Quorum sensing* allows the intra/inter-species communication via the production and release of autoinducers, according to the population density. Therefore, *quorum sensing* represents the main pathway to modulate gene expression in microorganisms, then controlling cellular processes such as the generation of biofilms and the expression of virulence factors. Ajoene is an example of modulator of the *quorum sensing* of *P. aeruginosa*, an organosulfur extracted from garlic that hinders, in a dose-dependent way, the expression of virulence factors in the bacterium. Although its effect over the *quorum sensing* of *P. aeruginosa* has been associated with the interaction with the Hfq protein, there is no information about this interaction that could guide the development of new Hfq inhibitors. Through the correlation between the estimated affinities for the interaction of ajoene analogues with the Hfq protein and the corresponding IC₅₀ values for the reduction in the expression of a virulence factor after the inhibition of bacterial *quorum sensing*, herein we hypothesized that ajoene blocks the binding of small RNAs (sRNAs) at the proximal Hfq site, thus preventing the subsequent stabilization of these sRNAs at the lateral site or their pairing with messenger RNAs at the distal site. Besides of defining the most likely binding mode concerning the interaction of ajoene with the proximal Hfq site, we have elucidated the minimum structural requirements for interaction with this protein, an information that can guide the development of new inhibitors to be synthesized in future works.

Keywords: RhIR/RhII *quorum sensing* system, N-acylated homoserine lactones, small RNAs, organosulfur compounds

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fármacos utilizados no tratamento de infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figura 2. Via de <i>quorum sensing</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dependente de N-butanoil-L-homoserina lactonas (C ₄ -HSL). Os genes rhIR e rhII codificam, respectivamente, o receptor AHL (RhIR) e a enzima AHL sintase (RhII), sendo que esta última catalisa a conversão de S-adenosilmetionina (SAM) em C ₄ -HSL. O auto indutor, C ₄ -HSL, também ativar um <i>loop</i> de amplificação induzindo a síntese de <i>small RNAs</i> (sRNAs) que, após complexação com a proteína Hfq, estimularão a transcrição do gene rhII para aumentar ainda mais a produção de C ₄ -HSL. Adaptado de Sonnleitner <i>et al.</i> , 2006; Utari <i>et al.</i> , 2017; Thomason <i>et al.</i> , 2019 e Shaker <i>et al.</i> , 2020.....	23
Figura 3. Formação de ajoeno a partir de alicina mediante fornecimento de energia ao se esmagar o alho. Adaptado de Naznin <i>et al.</i> (2015).....	26
Figura 4. Síntese de análogos do ajoeno, conforme relatado por Fong <i>et al.</i> (2017).....	27
Figura 5. Vista frontal (A) e posterior (B) da proteína Hfq de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PDB ID 4J6W). O painel A destaca a pose cristalográfica da citidina-5'-trifosfato (CTP, átomos de carbono em amarelo, PDB ID 4J6X) no sítio de ligação proximal/central e da uridina-5'-trifosfato (UTP, átomos de carbono em verde, PDB ID 4J6W) no sítio de ligação lateral, enquanto o sítio de ligação distal (B) é destacado pelo complexo com o CTP (átomos de carbono em roxo, PDB ID 4J6W).....	34
Figura 6. <i>Esquerda:</i> pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para 16-19 ($0,55 < IC_{50_LasB} < 0,80$ uM), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da <i>direita</i> estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia B, verde para a cadeia C, ciano para a cadeia D e roxo para a cadeia F.....	42
Figura 7. <i>Esquerda:</i> pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para 20-24 ($0,80 < IC_{50_LasB} < 1,40$ uM), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da <i>direita</i> estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia B, verde para a cadeia C, ciano para a cadeia D e roxo para a cadeia F.....	43
Figura 8. <i>Esquerda:</i> pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para 25-29 ($1,40 < IC_{50_LasB} < 3,50$ uM), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da <i>direita</i> estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia B, verde para a cadeia C, ciano para a cadeia D e roxo para a cadeia F.....	44
Figura 9. <i>Esquerda:</i> pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para 30-34 ($3,50 < IC_{50_LasB} < 14,50$ uM), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da <i>direita</i> estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia B, verde para a cadeia C, ciano para a cadeia D e roxo para a cadeia F.....	45

Figura 10. *Esquerda:* pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para **35-38** ($14.50 < IC_{50_HfA} < 45.40$ uM), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da *direita* estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**..... 46

Figura 11. A) Pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) junto aos três principais modos de ligação previstos para o *Z*- (**A**) e *E*-ajoeno (**C**) no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Interações intermoleculares realizadas pelo *Z*- (**B**) e *E*-ajoeno (**D**) são mostradas, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espectro de infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no homem. Adaptado de Campa, Bendinelli e Friedman (1993) e Proctor <i>et al.</i> (2021).....	16
Tabela 2. Lista de parâmetros usados para a validação e predição dos modos de ligação do ajoeno e análogos por meio de simulações de docagem molecular.....	30
Tabela 3. Afinidades de ligação estimadas por método de Mecânica Molecular/Área de Superfície Generalizada de Born (MM/GBSA) para 23 análogos relacionados ao ajoeno na interação com três sítios de ligação ao RNA da proteína Hfq e os valores experimentais de IC ₅₀ para a redução na expressão de LasB (Fong <i>et al.</i> , 2017).....	36
Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson ilustrando a força da correlação entre os escores calculados via método MM/GBSA (Tabela 3) e os valores experimentais de IC ₅₀ acerca da redução na expressão de LasB em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D = tridimensional

Acyl-HSL = *N*-acil homoserina lactonas

AHL = acil-homoserina lactona

C₄-HSL = *N*-butanoil-L-homoserina lactona

CTP = citidina-5'-trifosfato

ΔG_{bind} = energia livre Gibbs de ligação

IC₅₀ = concentração inibitória média

MM/GBSA = Mecânica Molecular/Área de Superfície Generalizada de Born

mRNAs = Ácidos ribonucleicos mensageiros

PDB = *Protein Data Bank*

RhII = AHL sintase tipo-rhII

RhIR = Receptor AHL tipo-rhIR

RMSD = Raiz quadrada do desvio quadrático médio

RNA = Ácido ribonucleico

SAM = *S*-adenosilmetionina

sRNAs = Ácido ribonucleico pequenos/curtos

UTP = uridina-5'-trifosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

Å – angstrom

kcal/mol – kilocaloria por mol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	28
3. MÉTODOS	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo ambiental Gram-negativo, de anaerobiose facultativa, com flagelo monotríquio, não formador de esporos e não fermentador (Mahmoudi; Ghafourian; Badakhsh, 2021). Atua nos seres humanos como patógeno oportunista de modo a causar uma série de infecções agudas e crônicas, as quais podem pôr em risco a vida de seus hospedeiros, sobretudo de pacientes com comprometimento do sistema imunológico (Moradali; Ghods; Rehm, 2017). Destaca-se do ponto de vista clínico por ser a bactéria mais comumente encontrada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, com fibrose cística e nos pacientes internados em unidades de terapia intensivas (Laborda; Martínez; Hernando-Amado, 2022).

Estas bactérias são encontradas nos mais diferentes ambientes, que vão da água potável à água de esgoto, podendo sobreviver por vários dias em superfícies secas se estiverem contidas em secreções biológicas como o pus. Assim, elas causam uma série de infecções no homem (**Tabela 1**), sendo que suas características morfológicas e bioquímicas intrínsecas permitem que elas sobrevivam e se multipliquem com facilidade nos diferentes habitats (Campa; Bendinelli; Friedman, 1993 Laborda; Sanz-García *et al.*, 2021).

Muito do conhecimento acerca da capacidade da *P. aeruginosa* de se adaptar a diferentes nichos do hospedeiro nas infecções crônicas vem de estudos sobre a infecção pulmonar crônica causada em pacientes com fibrose cística (Høiby *et al.*, 2001; Rasamiravaka; El Jaziri, 2016). A fibrose cística é uma doença de origem genética, que ocorre devido a mutações no gene regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR), sendo a mutação mais comum a deleção de uma fenilalanina na posição 508 (Gentzsch; Mall, 2018).

Tabela 1. Espectro de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* no homem. Adaptado de Campa, Bendinelli e Friedman (1993) e Proctor *et al.* (2021).

Órgão	Infecção	Aguda/Crônica	Origem	Prevenção
Olho	Ceratite associada a lentes de contato	Aguda	Água	Higiene
Pele	Lesão por foliculite, úlcera decorrente de infecção e infecção associada a queimadura	Aguda	Água	Higiene
Ouvido	Otite externa	Aguda/Crônica	Água (?)	Higiene
Seio nasal	Sinusite	Crônica	Água (?)	(?)
Bexiga urinária	Infecção do trato urinário			
Ossos	Osteomielite em pé diabético	Crônica	Água (?)	Higiene
Pulmão/brônquio	Bronquiolite/pneumonia associada à ventilação mecânica, fibrose cística e bronquiectasia	Aguda/Crônica	Hospital	Higiene, terapia antibiótica agressiva e precoce de erradicação em colonização intermitente
Sangue	Sepses, pacientes neutropênicos	Aguda	(?)	Profilaxia antibiótica

Tais mutações conduzem ao mau funcionamento no transporte de íons cloreto e bicarbonato através da membrana apical das células das vias aéreas, do trato gastrointestinal, das vias sudoríparas e de outros tecidos. Isso resulta na formação de um muco espesso que obstrui os alvéolos e ductos, afetando o funcionamento do intestino e do pâncreas. Nas vias aéreas, a deficiência da proteína CFTR também está relacionada ao aumento de canais epiteliais de sódio (ENaC), que fazem a mediação entre a absorção de sódio e o volume de fluidos, o que resulta na desidratação da superfície das vias aéreas e no comprometimento da depuração mucociliar (Gentzsch; Mall, 2018).

O desequilíbrio iônico e a hiperviscosidade do muco respiratório, com a consequente diminuição da depuração mucociliar, resultam na colonização bacteriana

em ciclos recorrentes de infecção. Tais infecções recorrentes, por sua vez, conduzem a quadros de inflamação crônica que irão promover a degeneração contínua do epitélio pulmonar já que o enfraquecimento no mecanismo de defesa não-inflamatório do trato respiratório (*i.e.*, a depuração mucociliar) tende a ser compensada pelo recrutamento precoce de células de defesa como leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e anticorpos (Armstrong *et al.*, 2005).

Assim, desde a primeira infância os pacientes com fibrose cística sofrem de infecções recorrentes caracterizadas por quadros de inflamação associada à presença de PMNs. Bronquiectasia é então produzida pela extensa infiltração de neutrófilos que liberam elastase, enzima responsável por desregular a imunidade inata, por aumentar a produção de muco e digerir peptídeos e proteínas pulmonares, o que culmina na destruição tecidual. Também ocorre a infiltração de neutrófilos desgranulantes e a consequente liberação de ácidos nucleicos e proteínas da matriz citoplasmática, responsáveis pelo aumento da viscosidade do muco (Frederiksen; Koch; Høiby, 1999; Fonseca *et al.*, 2020).

Quando os PMNs tentam fagocitar bactérias como *P. aeruginosa*, são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS) que, se não matam, induzem mutações nas bactérias e danificam o tecido circundante (Miller; Britigan, 1997). Algumas cepas de *P. aeruginosa* sintetizam o polissacarídeo alginato em resposta a condições ambientais, o qual capta as ROS produzidas pelos PMNs e protege a bactéria contra fagocitose e a depuração dos pulmões, de modo que este fenótipo mucoide fornece maior proteção contra os mecanismos de defesa inflamatórios do hospedeiro (Song *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2018).

Mesmo a terapia inflamatória contínua e o emprego intensivo antibióticos não impedem que as infecções causadas por *P. aeruginosa* persistam nestes pacientes. Não há cura para a doença e mesmo com o melhor tratamento disponível, a expectativa de vida é de apenas 40 anos. A perda da capacidade pulmonar de forma progressiva é a causa mais comum de morte em indivíduos que não recebem um transplante de pulmão (Elborn, 2016; Chirgwin *et al.*, 2019). Por conta da sua importância na fibrose cística e demais patologias clinicamente relevantes, em 2017 a Organização Mundial da Saúde apontou a *P. aeruginosa* como um dos principais micro-organismos que devem ser priorizados para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Wang *et al.*, 2022).

Com relação aos antibióticos administrados por via parenteral para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa*, as cepas selvagens são sensíveis a aminoglicosídeos (ex: gentamicina) (**Figura 1**), a algumas cefalosporinas de 3^a, 4^a e 5^a geração (e.g., ceftazidima, cefepima e ceftolozana, respectivamente) e ureido-penicilinas como piperacilina (com ou sem inibidores de beta-lactamases como o avibactam), carbapenêmicos (ex: meropenem), monobactâmicos (ex: aztreonam), colistina e algumas fluoroquinolonas (ex: ciprofloxacina), sendo esta última a única classe de antibióticos que se mostram eficientes contra a bactéria quando administrados por via oral (Ciofu, 2003; Obritsch *et al.*, 2004).

A espécie de *P. aeruginosa* é considerada resistente a múltiplos fármacos quando três das quatro classes mais ativas contra esse micro-organismo já não são eficazes (*i.e.*, carbapenêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos), (Marner *et al.*, 2023). A ocorrência de cepas resistentes aos antimicrobianos se deve principalmente aos processos de resistência intrínseca e adquirida, sendo que esta última se caracteriza por mutações ou pela transferência horizontal de genes de resistência (Reygaert, 2018). Já a chamada resistência intrínseca se deve, entre outros fatores, ao fato de bactérias Gram-negativas apresentarem uma barreira adicional à entrada de antibióticos que corresponde à membrana externa, composta por fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos (Pang *et al.*, 2019).

O antibiótico aztreonam, da classe dos monobactâmicos, é mais ativo contra cepas gram-negativas e pode ser uma alternativa medicamentosa, age interferindo na síntese da parede bacteriana, porém algumas espécies de *P. aeruginosa* podem ser resistentes (Luján-Roca DA, 2008).

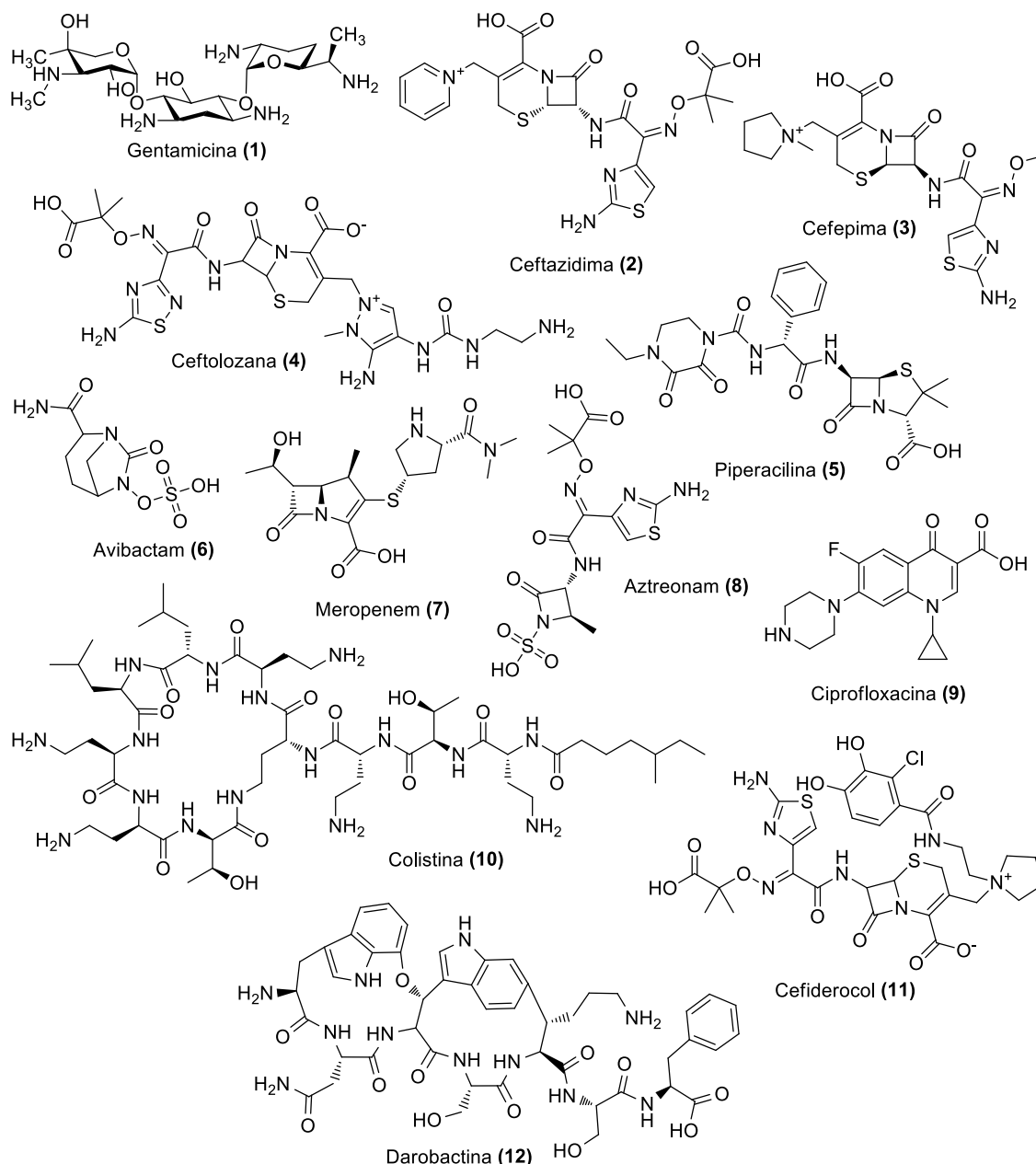


Figura 1. Fármacos utilizados no tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*.

A presença desta membrana, recoberto a camada de peptidoglicanas que estaria diretamente em contato com o meio externo nas Gram-positivas, faz com que a entrada de pequenas moléculas na célula esteja restrita à, basicamente, a passagem por canais proteicos chamados de porinas, o que torna a entrada de antibióticos um processo muito mais restritivo. Adicionalmente, *P. aeruginosa* produz beta-lactamases, capazes de destruir as moléculas de beta-lactâmicos que consigam alcançar o espaço periplasmático, assim como bombas de efluxo para expelir os antibióticos que, eventualmente, cheguem ao interior da célula (Pang *et al.*, 2019). Todas estas características, em conjunto, fazem de *P. aeruginosa* uma espécie altamente

susceptível à resistência a antibióticos, o que se traduz clinicamente pelo desenvolvimento de infecções graves (ex: sepse em neutropênicos), sendo comum o emprego de antibioticoterapia empírica que, ao tentar cobrir diferentes cepas, é normalmente feita pela combinação de dois ou mais antibióticos, como um aminoglicosídeo associado a antibiótico β -lactâmico ou carbapenêmico (Bodey, 2005).

Para pacientes internados em unidades de cuidado intensivo, o alto risco de toxicidade renal faz necessária a substituição do aminoglicosídeo pela ciprofloxacina. Independentemente da combinação, se a antibioticoterapia empírica não funcionar por conta de resistência, o risco de morte aumenta mesmo quando a terapia é posteriormente ajustada para o uso de antibióticos eficazes quando os resultados da cultura e do teste de suscetibilidade estiverem disponíveis (Kang *et al.*, 2005; Russell, 2006; Osih *et al.*, 2007).

Neste contexto, cepas multirresistentes têm sido observadas mesmo para combinações entre cefalosporinas de 5ª geração e inibidores de beta-lactamases (ex: ceftazidima + avibactam) e para a cefalosporina catecólica cefiderocol, como relatado para isolados clínicos de pacientes com fibrose cística, nos quais as taxas de resistência foram de 49% e 30%, respectivamente. Embora os autores destaquem como promissor o uso de antibióticos pré-clínicos como as darobactinas (Losito *et al.*, 2022; Marner *et al.*, 2023), via de regra, cepas resistentes tendem a ser identificadas tão logo estes compostos passem a ser utilizados em larga escala.

A ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes em pacientes com fibrose cística se relaciona à alta frequência de cepas mutantes, as quais apresentam defeitos nas enzimas de reparo do DNA e, portanto, também experimentam uma alta frequência de danos no DNA causados pelas ROS produzidas por PMNs ativados durante a infecção crônica (Oliver; Baquero; Blazquez, 2002). Estas cepas poderão acessar uma série de mecanismos de resistência que, estando associados à formação de biofilmes, permitirão que a bactéria sobreviva por décadas na presença de antibióticos, enquanto o tecido pulmonar é gradativamente destruído (Høiby *et al.*, 2008).

Os biofilmes se caracterizam como um agregado complexo de bactérias envolto em uma matriz autogerada de substâncias poliméricas extracelulares, sendo um dos principais mecanismos para a sobrevivência das espécies durante mudanças

inesperadas nas condições de vida, como flutuação de temperatura e disponibilidade de nutrientes (Thi; Wibowo; Rehm, 2020).

Neste sentido, a formação de biofilmes é um aspecto central das infecções pulmonares por *P. aeruginosa*, os quais representam comunidades de bactérias aderidas à superfície celular e que se encontram inseridas em uma matriz extracelular de substâncias biopoliméricas. As bactérias do biofilme são fisiologicamente distintas das da mesma espécie que vivem fora dele, podendo ser até mil vezes mais resistentes a antibióticos. A matriz extrapolimérica produzida pelas bactérias do biofilme inibe a fagocitose pelas células do sistema imunológico, sendo que biofilmes formados por cepas de *P. aeruginosa* que produzem alginato exibem uma arquitetura altamente estruturada e são significativamente mais resistentes a antibióticos do que os biofilmes formados por cepas isogênicas não mucoides (Hentze *et al.*, 2001; Alhede *et al.*, 2020).

Ademais, por conta da formação de biofilmes, *P. aeruginosa* consegue colonizar uma variedade de superfícies, incluindo materiais médicos (cateteres urinários, implantes, lentes de contato, etc.) e equipamentos da indústria de alimentos (tanques de mistura, cubas e tubulações). Além de polissacarídeos, os biofilmes são compostos por DNA extracelular, proteínas e lipídios, sendo esta matriz responsável por 90% da biomassa do biofilme, fornecendo nutrientes essenciais, enzimas e proteínas citosólicas para a comunidade de bactéria que nela habita (Alhede *et al.*, 2020; Thi; Wibowo; Rehm, 2020).

A manutenção destes biofilmes, que permite o crescimento bacteriano longe de estresses ambientais (como desidratação, ataques do sistema imunológico e antimicrobianos) é dependente do controle pós-transcricional de genes relacionados à expressão de fatores de virulência, papel este exercido pelos chamados *small RNAs* (sRNAs). Alguns dos sRNAs *antisense*, conhecidos como *cis*-sRNAs, são codificados a partir do mesmo *locus* cromossômico que o RNA-alvo e, dada à perfeita complementaridade que estes apresentam entre si, o pareamento das bases entre o sRNA e o RNA mensageiro (mRNA) poderá ocorrer na ausência de fatores proteicos adicionais (Nielsen *et al.*, 2010).

Já os *trans*-sRNAs são codificados a partir de genes em *loci* distintos daqueles que codificam as proteínas-alvos e, por conta do pareamento descontínuo/imperfeito das bases com seus mRNAs-alvo, a montagem de complexos

trans-sRNAs/mRNA não pode ocorrer diretamente (Nielsen *et al.*, 2010). Consequentemente, as bactérias Gram-negativas dependerão de chaperonas como a proteína Hfq para promover o pareamento adequado entre as bases do sRNA e do mRNA, enquanto as interações entre sRNAs e mRNAs poderão ocorrer independentemente das chaperonas em algumas cepas de Gram-positivas (Mai *et al.*, 2019).

Além disso sabe-se que as chaperonas estão envolvidas nos processos de secreção de efetores, através dos sistemas T3SS, T4SS e T6SS (Manera *et al.*, 2021). As chaperonas mantêm a homeostase e interfere na agregação, desagregação e dobramento das proteínas (Kim *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a proteína Hfq está ausente em Gram-positivos como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Enterococcus faecium*, e mesmo a deleção do gene da Hfq em *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* não afeta a estabilidade das transcrições. Em conjunto, esses dados sugerem que, embora a Hfq seja amplamente expressa em Gram-positivas, ela pode não ter o mesmo papel/impacto essencial na expressão gênica como observado para as Gram-negativas (Christopoulou e Granneman, 2021; Mediati *et al.*, 2021).

As bactérias utilizam um sistema de regulação gênica dependente da densidade celular, o *quorum sensing*, para se comunicarem umas com as outras por meio da troca de moléculas sinalizadoras difusíveis, os autoindutores. Estas permitem que as bactérias compartilhem informações sobre a densidade celular e que ajustem sua expressão gênica para atuarem de maneira síncrona, como um único indivíduo coletivo (Striednig & Hilbi, 2022). À medida que a densidade populacional na comunidade aumenta, os autoindutores são continuamente produzidos e secretados pelas bactérias para se ligarem aos receptores cognatos nas células vizinhas. Isso permite a ativação da expressão gênica de fatores de virulência, a formação de biofilmes, a produção de toxinas ou de fatores de resistência a antibióticos. Na maioria das espécies, esses autoindutores se propagam por apenas alguns microns de distância a partir das células sinalizadoras já que são rapidamente captados pelas bactérias receptoras, formando uma via de comunicação bastante localizada (van Gestel *et al.*, 2021).

Na maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*, os autoindutores são representados por *N*-acil homoserina lactonas (*N*-acil-HSLs), que são sintetizadas por proteínas do tipo LuxI e se ligam aos receptores do tipo LuxR, os ativadores da expressão gênica (Ampomah-Wireko *et al.*, 2021).

Existem dois tipos de pares de receptores/sintases do subtipo LuxR/LuxI, o LasR/LasI e o RhIR/RhII, sendo o primeiro o mais estudado. Contudo, o sistema Rhl vem se mostrando uma via central para o *design* de fármacos que possam interromper os mecanismos de virulência de *P. aeruginosa* e de bactérias Gram-negativas em geral (Taylor *et al.*, 2021; Simanek *et al.*, 2022). Conforme ilustrado na **Figura 2**, quando a acil-HSL *N*-butanoil-L-homoserina lactona (C₄-HSL) previamente secretada no meio atinge o receptor citoplasmático cognato (RhIR), o receptor ativado irá desencadear a transcrição de vários fatores de virulência, que no sistema RhIR/RhII de *P. aeruginosa* são representados por genes que controlam a produção da elastase LasB, piocianina, cianeto de hidrogênio (HCN) e ramnolipídios (Liao *et al.*, 2022).

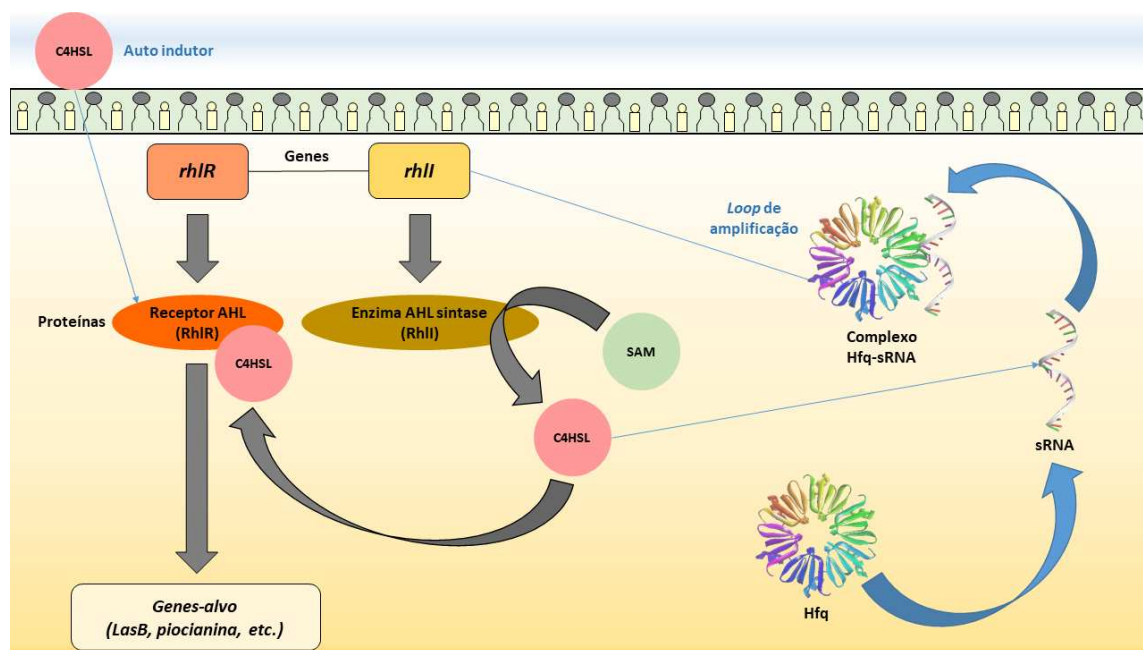


Figura 2. Via de *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* dependente de *N*-butanoil-L-homoserina lactonas (C₄-HSL). Os genes *rhIR* e *rhII* codificam, respectivamente, o receptor AHL (RhIR) e a enzima AHL sintase (RhII), sendo que esta última catalisa a conversão de S-adenosilmetionina (SAM) em C₄-HSL. O auto indutor, C₄-HSL, também ativar um *loop* de amplificação induzindo a síntese de *small RNAs* (sRNAs) que, após complexação com a proteína Hfq, estimularão a transcrição do gene *rhII* para aumentar ainda mais a produção de C₄-HSL. Adaptado de Sonnleitner *et al.*, 2006; Utari *et al.*, 2017; Thomason *et al.*, 2019 e Shaker *et al.*, 2020.

Enquanto a elastase LasB irá degradar a flagelina bacteriana para prevenir uma resposta de reconhecimento imune mediada por flagelina (Casilag *et al.*, 2016), a piocianina, embora prejudicial para as células hospedeiras, permite que a bactéria sobreviva nas áreas de baixo oxigênio do biofilme (Meirelles; Newman, 2018). Isso será vantajoso para *P. aeruginosa* na competição com outras espécies como *Staphylococcus aureus* em regiões microaeróbicas de biofilmes nos pulmões de pacientes com fibrose cística. Por meio da descarboxilação oxidativa da glicina, a *P. aeruginosa* produzirá cianeto de hidrogênio (HCN) para envenenar o metabolismo aeróbico e o crescimento do *S. aureus* e, embora o *S. aureus* seja o primeiro a colonizar as vias aéreas nos estágios iniciais da fibrose cística, ele será então posteriormente superado/ substituído pela *P. aeruginosa* (Létoffé *et al.*, 2022). Por outro lado, a produção de ramnolipídios garantirá a arquitetura adequada dos biofilmes, degradando o surfactante pulmonar e diminuindo a tensão superficial que dificulta a movimentação bacteriana (Tuon *et al.*, 2022).

O C₄-HSL também induzirá a síntese de sRNAs que modulam a fisiologia bacteriana ao se emparelhar com os mRNAs bacterianos para regular a sua tradução. Esse processo é dependente da proteína Hfq que forma um complexo proteína-sRNA estável, facilitando a subsequente interação sRNA-mRNA (Sonnleitner; Romeo; Bläsi, 2012; Malgaonkar; Nair, 2019). Assim, a expressão do gene *rhII* é ativada, codificando a enzima AHL sintase que converte S-adenosilmetionina (SAM) em C₄-HSL, funcionando como um *loop* de amplificação para a ativação do receptor RhIR (Thomason *et al.*, 2019).

Portanto, considerando que seja possível impedir a interação Hfq-sRNA, a maior parte da expressão dos fatores de virulência de *P. aeruginosa* seria afetada, reduzindo assim a prevalência e a gravidade das infecções causadas por esta bactéria. De fato, cepas de *P. aeruginosa* com *knockout* para o gene *hfq* demonstraram uma redução substancial na sua taxa de crescimento já que estas perdem a capacidade de utilizar glicose como fonte de carbono. Além disso, a produção de elastase foi reduzida em 80% e a virulência, em geral, foi significativamente atenuada quando administrou-se a cepa por via intraperitoneal em camundongos (Sonnleitner *et al.*, 2003).

Conforme já abordado, as infecções multirresistentes causadas por *P. aeruginosa* e por bactérias Gram-negativas em geral vêm aumentando nos últimos 20

anos, incluindo meningites, pneumonias, septicemias e infecções de sítio cirúrgico (Sader *et al.*, 2022). Neste sentido, cientistas nas indústrias e na academia têm voltado esforços para a identificação e validação de novos alvos terapêuticos, buscando contornar seus mecanismos de resistência a antibióticos para, assim, combater este crescimento quase que contínuo observado nas infecções bacterianas hospitalares (Tondi *et al.*, 2021).

Considerando a perspectiva de se identificar moléculas que possam dificultar a interação Hfq-sRNA em concentrações subnanomolares, de modo que a virulência bacteriana possa ser atenuada de modo a se alcançar infecções clinicamente mais brandas, a proposta deste trabalho foi a de avaliar a proposição de Jakobsen *et al.* (2012) que um produto natural presente em alguns vegetais do gênero *Allium* como alhos e cebolas (Vuković *et al.*, 2023), o ajoeno, teria como alvo ligado à sua ação antibacteriana a proteína Hfq e que este afetaria a interação com o RNA de modo a reduzir a concentração de C₄-HSL.

O alho integra as 71 plantas nativas/exóticas listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS - RENISUS (Brasil, 2009), sendo sabido que o ajoeno contribui para as propriedades antimicrobianas (Keita; Darkoh; Okafor, 2022), anticoagulantes (Hareera; Wijesekara; Bandara, 2022) e antitumorais (Patiño-Morales *et al.*, 2021) associadas à planta.

Ao se esmagar o alho, tem-se o calor necessário para a formação do ajoeno a partir da alicina (**Figura 3**), sendo este formado na forma dos isômeros *E*- (*trans*) e *Z*- (*cis*) (Naznin *et al.*, 2015), mistura também observada para os processos de síntese química (Bjarnsholt *et al.*, 2012). O isômero *Z*- se mostra o mais potente entre Gram-positivas e -negativas sendo, contudo, ambos pouco ativos contra *P. aeruginosa* (MIC > 500 ug/mL) (Yoshida *et al.*, 1998).

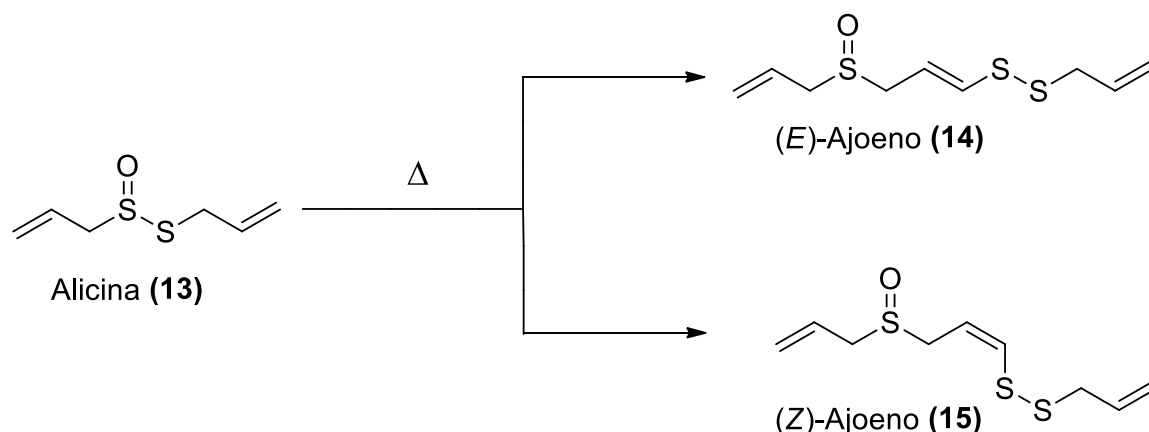


Figura 3. Formação de ajoeno a partir de alicina mediante fornecimento de energia ao se esmagar o alho. Adaptado de Naznin *et al.* (2015).

Em conjunto, estas observações ressaltam a utilidade do ajoeno muito mais como uma ferramenta farmacológica para se estudar o *quorum sensing* da bactéria do que como um possível antibacteriano de uso clínico, não sendo surpreendente a constatação de que o uso de cápsulas de alho em um estudo clínico controlado com pacientes com fibrose cística não se mostrou superior ao uso de placebo (Smyth *et al.*, 2010). Contudo, o fármaco mostra potencial como adjuvante na associação a outros antibióticos, sendo constatada a morte de mais de 90% das células nos biofilmes quando estes foram cultivados na presença de ajoeno e posteriormente tratados com tobramicina (Jakobsen *et al.* 2012).

Observa-se que o uso de agentes de dispersão de biofilme (inibidores de quórum sensing, óxido nítrico/nitroxidos, peptídeos antimicrobianos/aminoácidos) é uma estratégia eficaz para controlar ou até mesmo inibir a formação de biofilme bacteriano (Hawas *et al.*, 2022).

Embora o ajoeno possa ser considerado um inibidor potencialmente fraco da proteína Hfq, com um IC₅₀ de 15 µM com relação à redução na expressão de LasB após a inibição do *quorum sensing* (Fong *et al.*, 2017), ao se elucidar o seu modo de ligação, seria possível definir as bases necessárias para o desenvolvimento futuro de inibidores de Hfq mais potentes. Neste sentido, Fong *et al.* (2017) sintetizaram 23 compostos estruturalmente relacionados ao ajoeno e avaliaram sua ação sobre a inibição do *quorum sensing* de *P. aeruginosa*. A ideia dos autores foi a de incorporar a dupla ligação vizinha à ligação na forma de um benzo[d]tiazól, sendo algumas outras

variações estruturais propostas para se avaliar o efeito sobre a redução na expressão de LasB.

Na primeira subsérie de análogos (**Figura 4**), os autores utilizaram ácido *meta*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) para oxidar o dissulfeto de dialila à alicina e, assim, utilizá-la como fonte de alila na síntese dos dissulfetos com tióis heterocíclicos. Já na segunda subsérie, a alila é abolida das estruturas, sendo os dissulfetos sintetizados diretamente pela reação entre os tióis de interesse na presença de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (Fong *et al.*, 2017).

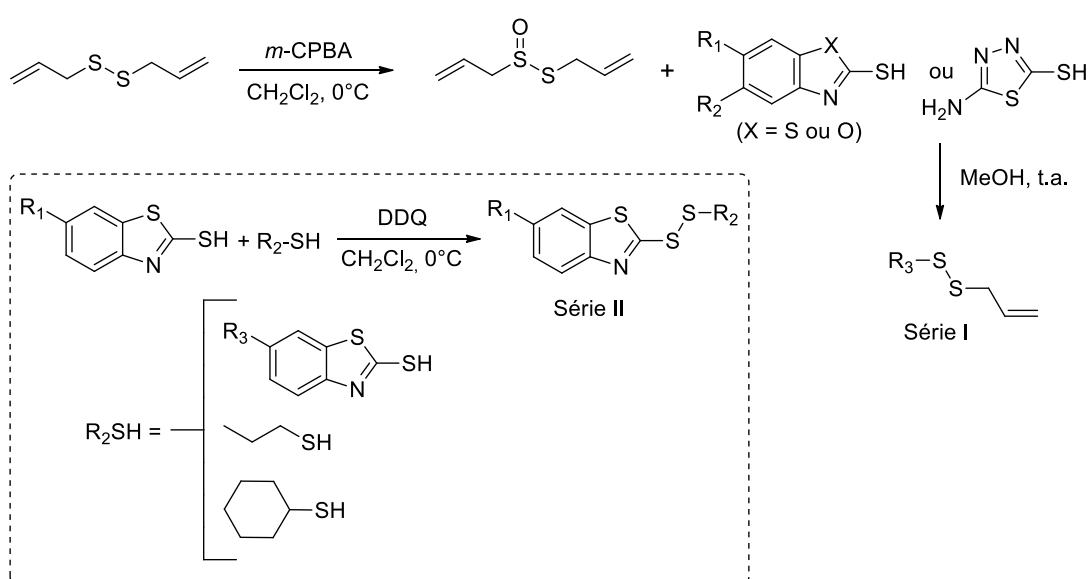


Figura 4. Síntese de análogos do ajoeno, conforme relatado por Fong *et al.* (2017).

Neste trabalho explorou-se as interações do ajoeno e de 23 análogos descritos por Fong *et al.* (2017) com três sítios de ligação de RNA da proteína Hfq, de modo a se definir os modos de ligação mais prováveis para esses compostos com a proteína alvo. Dessa forma, vislumbrou-se entender os processos que possam guiar o desenvolvimento da próxima geração de fármacos antibacterianos, ou seja, compostos capazes de interromper a comunicação célula-célula de forma reduzir sua patogenicidade e facilitar assim o tratamento de infecções multirresistentes (Tonkin *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

Sugerir a localização do sítio de ligação do ajoeno e de alguns de seus análogos estruturais junto à proteína Hfq de *Pseudomonas aeruginosa* através de simulações de docagem molecular.

3. MÉTODOS

As estruturas cristalográficas de raios X da proteína Hfq de *Pseudomonas aeruginosa* foram baixadas do Protein Data Bank em complexos com citidina-5'-trifosfato – CTP (PDB ID 4J6W, resolução de 1,80 Å) e uridina-5'-trifosfato – UTP (PDB ID 4J6X, resolução de 2,22 Å). Por conta da sua resolução, este último complexo está propenso a exibir coordenadas ausentes para as cadeias laterais de alguns de seus aminoácidos (Blow, 2002), de modo que ambos os complexos foram submetidos ao módulo DockPrep do *software* Chimera da Universidade de São Francisco - California (Pettersen *et al.*, 2004) para completar as potenciais cadeias laterais ausentes usando a biblioteca de rotâmeros de Dunbrack (Shapovalov e Dunbrack, 2011) e para adicionar as cargas corretas aos resíduos de acordo com o pH fisiológico.

As simulações de docagem molecular foram realizadas usando o *software* GOLD, utilizando parâmetros semelhantes aos descritos em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. Basicamente, iniciou-se pela construção das estruturas 3D dos compostos utilizando a versão *on-line* do *software* Corina¹, o qual atribui aos modelos 3D comprimentos e ângulos de ligação pré-definidos de acordo com seu tipo de ligação, tipo de átomo e estado de hibridação. Assim, usando as conformações padronizadas, não bioativas, dos ligantes geradas pelo Corina como *input* para o Gold garante-se simulações reprodutíveis já que o *software* de docagem as usará para gerar um novo conjunto de posições, orientações e conformações, *i.e.*, novas poses para cada ligante, as quais são testadas sistematicamente no sítio de docagem (Oliveira Neto *et al.*, 2020).

A geração das poses de docagem é realizada com base nas regras definidas pelo algoritmo de amostragem, chamado de algoritmo genético no caso do Gold por ter sido inspirado na teoria da evolução de Darwin. Ao se traçar um paralelo entre o processo de criação das novas poses a serem ensaiadas no sítio de docagem a partir da(s) pose(s) original(is) e o processo de geração de novos indivíduos com base nas características genéticas de seus pais, os graus de liberdade de cada ligante são codificados como cadeias binárias chamadas de “genes”, os quais, em conjunto, compõem um “cromossomo” (*i.e.*, a pose do ligante). Assim, os algoritmos genéticos permitem que os indivíduos (poses) melhor adaptados (ou seja, que realizam

¹ <https://demos.mn-am.com/corina.html>

interações importantes com o alvo) tenham suas características transmitidas para a próxima geração enquanto mutações aleatórias ou dirigidas (nas conformações) aplicadas pelo algoritmo são utilizadas para ampliar a diversidade genética (conformacional) (Rodrigues *et al.*, 2015).

Os algoritmos de amostragem foram aplicados com 100% de eficiência e de flexibilidade, o que significa que nenhuma *constraint* foi aplicada para tendenciar a geração das poses. O sítio (ou esfera) de docagem foi definido a partir do centro geométrico (centróide) de cada ligante cristalográfico, cujo o raio foi visualmente definido de modo a se incluir todos os resíduos que realizavam interações com tais ligantes em cada subsítio (**Tabela 2**). A validação dos métodos de docagem foi feita com base no procedimento de *redocking* ou redocagem, no qual a pose de docagem gerada a partir da conformação de entrada do Corina é comparada com a pose cristalográfica, que se assume representar a conformação bioativa. Para tanto, realiza-se o cálculo dos valores de raiz quadrada do desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation*, RMSD), uma medida da divergência entre a posição de cada átomo correspondente nas poses de docagem e cristalográfica. Assim, se o valor de RMSD for igual a zero, significa que as duas poses são idênticas mas, na prática, assume-se que o método de docagem consegue prever a pose bioativa se o valor de RMSD observado for inferior a 2Å (Yusuf *et al.*, 2008).

Tabela 2. Lista de parâmetros usados para a validação e predição dos modos de ligação do ajoeno e análogos por meio de simulações de docagem molecular.

Sítio de interação do RNA na proteína Hfq	Resíduos que interagem com o ligante cristalográfico	Raio de docagem (Å)*	RMSD calculado entre a pose de docagem e a cristalográfica (Å)**
Sítio CTP proximal	Phe ^{42D} , His ^{57D} , Phe ^{42F} , Gln ^{41F} , His ^{5F} e Gln ^{8F} .	9	0,88
Sítio UTP lateral	Asn ^{13B} , Arg ^{16B} , Lys ^{17B} e Phe ^{39B} .	9	1,69
Sítio CTP distal	Gln ^{52D} , Thr ^{61F} , Ser ^{60F} , Leu ^{26F} , Tyr ^{25F} e Asn ^{28D} .	11	1,03

*O raio da esfera de docagem foi definido a partir do centróide do ligante cristalográfico de modo a incluir todos os resíduos que compunham um determinado sítio de ligação do RNA. **RMSD = *Root-Mean-Square Deviation*, uma medida da distância média entre os átomos na pose de referência (cristalográfica) e a de docagem.

As poses de docagem geradas no Gold para cada composto são então automaticamente ranqueadas de acordo com a função de escore, que neste caso foi a *ChemScore*. Assim, a medida que as poses de docagem são ensaiadas no sítio ativo, a *ChemScore* permite estimar a afinidade da interação entre a proteína e o ligante ao se considerar a realização de ligações de hidrogênio, interações com metais e lipofílicas, assim como a perda na entropia conformacional do ligante após a ligação com a proteína-alvo (Verdonk *et al.*, 2003). Por padrão, o Gold ranqueia as dez poses de maior escore para cada composto, mas, neste trabalho, optou-se por trabalhar apenas com as três poses principais. Isso porque em trabalhos anteriores com o mesmo programa, Yan e Wang (2016) demonstraram que as três poses mais bem ranqueadas pela *ChemScore* continham a pose bioativa em 85% dos casos.

Assim, foram geradas as três principais poses para cada um dos 23 análogos do ajoeno descritos por Fong *et al.* (2017) e, considerando que a pose bioativa poderia, em teoria, estar igualmente distribuída entre qualquer uma das três poses de cada ligante, utilizou-se um *plug-in* do *Excel*, o *Kutools* (Haikou, Hainan, China), para se calcular cada uma das combinações possíveis entre as 3 poses dos 23 compostos para cada um dos três subsítios de ligação do RNA na proteína Hfq. Desse modo, assume-se que ao reduzir o número de poses de análise de 10 para 3, tem-se uma melhor relação custo-benefício ao se diminuir o número de combinações possíveis de poses para os 23 compostos.

Funções de escore como a *ChemScore* foram projetadas com o intuito principal de se ranquear as diferentes poses de um mesmo composto e ou de diferentes compostos no processo de interação com um dado alvo biológico. Contudo, quando se tenta utilizar os valores de escore de docagem por elas gerados como uma estimativa direta de valores de afinidade do ligante com a proteína (*i.e.*, valores de energia livre de Gibbs), tende-se a observar uma correlação pobre com os valores experimentalmente determinados já que estas ignoram, entre outras coisas, o impacto de processos como os de solvatação/dessolvatação do ligante e da proteína quando estes interagem diretamente entre si (Verdonk *et al.*, 2003).

Neste sentido, Pu *et al.* (2017) observaram uma melhora significativa (*i.e.*, coeficiente de correlação passou de 0,22 para 0,77) quando os valores de afinidade entre ligante-proteína originalmente estimados por uma função de escore derivada da *ChemScore* foram recalculados através do método Mecânica Molecular/Área de

Superfície Generalizada de Born (*Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Areas*, MM/GBSA). Conforme ilustrado na **Equação 1**, a variação na energia livre de Gibbs (ΔG_{bind}) resultante da ligação entre um dado ligante (L) a uma proteína (P) pode ser calculada a partir da energia do complexo proteína ligante (G_{PL}) descontando-se os valores de energia da proteína (G_{P}) e do ligante (G_{L}) isoladamente.

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{PL}} - (G_{\text{P}} + G_{\text{L}}) \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} \approx (\Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}}) - T \cdot \Delta S \quad (3), \text{ sendo que:}$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{int}} + \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdW}} \quad (4), \text{ e que:}$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad (5)$$

Outra forma de expressar ΔG_{bind} , à temperatura e pressão constantes, é em termos das variações que ocorrem na entalpia (ΔH) e na entropia (ΔS) do sistema durante o processo de ligação (**Equação 2**). A vantagem nesse caso é que é possível utilizar métodos computacionais para se estimar as variações na entalpia (ΔH) durante o processo de formação do complexo PL a partir de P e L. Para tanto, ΔS é desmembrado em termos das variações de dois componentes principais (**Equação 3**) sendo que no primeiro são utilizados campo de força clássicos de mecânica molecular para estimar as variações na energia de uma dada molécula (P ou L) em função das variações na sua conformação, *i.e.*, ΔE_{MM} . Assim, ΔE_{MM} pode ser calculada a partir da soma das variações na energia interna da molécula, ΔE_{int} (energia de ligação, ângulos e diedros), energia eletrostática (ΔE_{ele}) e energias de van der Waals (ΔE_{vdW} , **Equação 4**). Já o segundo componente de ΔS é expresso em termos das variações na soma das energias de solvatação eletrostáticas (ΔG_{sol}), a qual também é subdividida em termos das contribuições polares (ΔG_{GB}) e apolares (ΔG_{SA}) da interação entre o soluto (P e L) e o solvente (**Equação 5**) (Wang *et al.*, 2019).

Desse modo, o método MM/GBSA foi utilizado para se calcular os valores de ΔG_{bind} para as três principais poses para cada um dos 23 análogos do ajoeno (ver seção de resultados e discussão), totalizando 69 valores de ΔG_{bind} e que foram dispostos em todas as combinações possíveis de poses, conforme já citado. A relação

entre os valores de escore de MM/GBSA com os valores experimentais de IC_{50} referentes à redução na expressão de LasB para cada composto foi então avaliada por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r), o qual representa a força e a natureza (positiva ou negativa) de uma associação linear entre duas variáveis. Este coeficiente é adimensional e varia entre -1 e $+1$, sendo que o valor de $+1$ representaria um gráfico do tipo de dispersão onde todos os pontos cairiam dentro de uma reta com inclinação positiva (*i.e.*, uma associação positiva perfeita) e o valor -1 numa reta similar, mas com inclinação negativa (LeBlanc, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A forma hexamérica da Hfq de *P. aeruginosa* apresenta um formato 3D de *doughnut* (i.e., um toróide), para a qual três sítios de ligação de RNA diferentes foram identificados: um proximal (ou central), um sítio de ligação lateral e um distal (Murina *et al.*, 2013). Portanto, essas bactérias exibirão três sítios de ligação de RNA para cada monômero de Hfq, onde o sítio proximal/central tem afinidade por pirimidinas (**Figura 5A**), o sítio lateral por uridinas (**Figura 5A**) e o sítio distal é um domínio universal de ligação ao RNA (**Figura 5B**) (Link *et al.*, 2009; Murina *et al.*, 2013; Sauer e Weichenrieder, 2011).

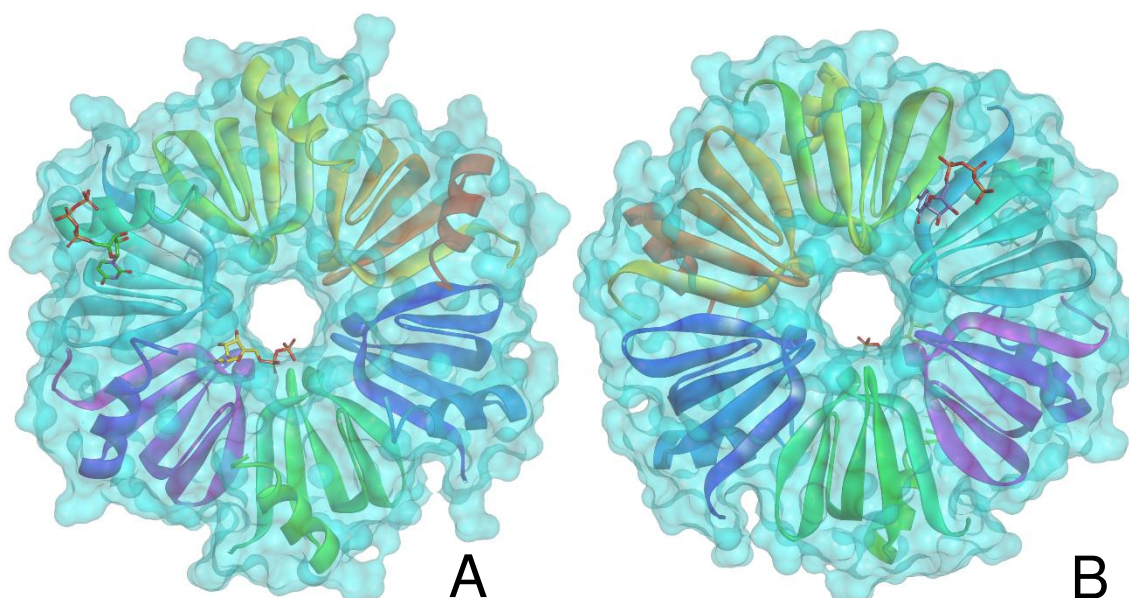


Figura 5. Vista frontal (**A**) e posterior (**B**) da proteína Hfq de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID 4J6W). O painel **A** destaca a pose cristalográfica da citidina-5'-trifosfato (CTP, átomos de carbono em amarelo, PDB ID 4J6X) no sítio de ligação proximal/central e da uridina-5'-trifosfato (UTP, átomos de carbono em verde, PDB ID 4J6W) no sítio de ligação lateral, enquanto o sítio de ligação distal (**B**) é destacado pelo complexo com o CTP (átomos de carbono em roxo, PDB ID 4J6W).

Para identificar o sítio de interação do ajoeno entre esses três sítios de ligação do RNA em cada monômero da Hfq, partiu-se da premissa básica que norteia a maioria dos estudos de relações estrutura-atividade, onde pequenas alterações na estrutura central de um composto de referência impactarão no modo de ligação com a proteína-alvo, o que pode ser quantitativamente expresso em termos de mudanças em suas respostas biológicas (Hulzebos *et al.*, 2001). Anteriormente, Fong *et al.*, (2017) descreveram a síntese de 23 análogos estruturalmente relacionados ao ajoeno

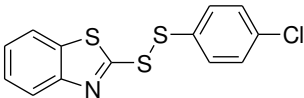
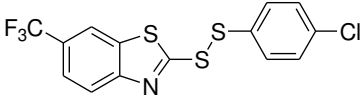
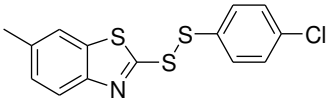
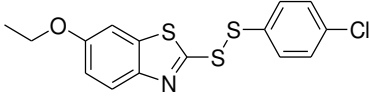
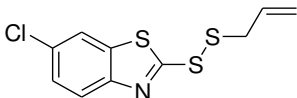
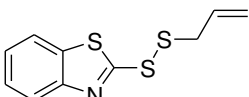
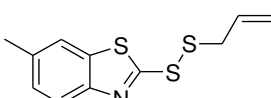
(Tabela 3) junto com os valores de IC_{50} correspondentes à inibição na expressão da proteína LasB, um dos gene-alvo do quorum sensing de *P. aeruginosa*.

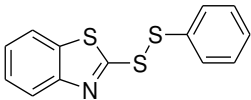
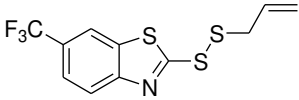
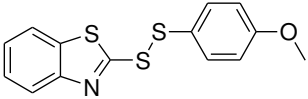
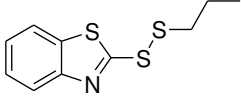
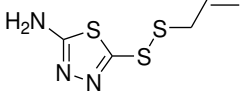
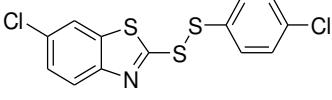
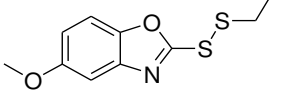
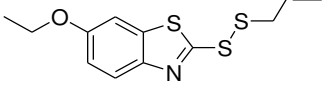
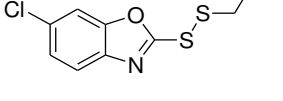
Como em estudos anteriores com cepas *knock-out* de Hfq da bactéria houve uma redução de seis vezes na expressão de LasB (Sonnleitner *et al.*, 2006), trabalhou-se com a hipótese de que os diferentes potenciais desses análogos na redução da expressão do gene LasB estariam diretamente correlacionados com suas afinidades de ligação à proteína Hfq.

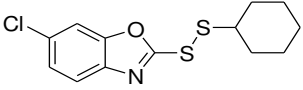
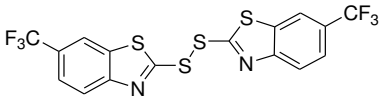
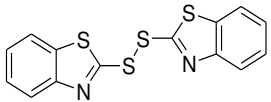
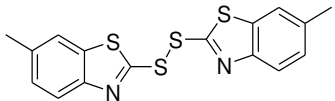
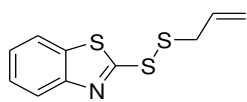
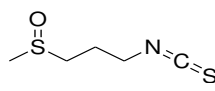
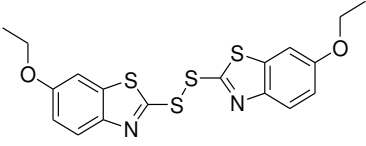
Consequentemente, utilizou-se simulações de docagem molecular para estimar as afinidades entre ligante-alvo para esses 23 compostos em cada um dos três sítios de ligação de RNA da Hfq. Usando o mesmo algoritmo de amostragem e funções de escore do método aqui empregado, Yan e Wang (2016) alcançaram mais de 85% de taxas de sucesso na predição dos modos de ligação bioativos para os compostos docados quando as três principais poses de docagem eram consideradas.

Portanto, incluiu-se nas análises todas as combinações possíveis entre as três poses de docagem mais bem ranqueadas para cada composto, em cada um dos três sítios distintos de ligação ao RNA (ou seja, sítios proximal, lateral e distal). Para tornar o método ainda mais preciso, os escores de docagem originais foram substituídos pelas energias livres de ligação (ΔG_{bind}) calculados através do método MM/GBSA (Wang *et al.*, 2019).

Tabela 3. Afinidades de ligação estimadas por método de Mecânica Molecular/Área de Superfície Generalizada de Born (MM/GBSA) para 23 análogos relacionados ao ajoeno na interação com três sítios de ligação ao RNA da proteína Hfq e os valores experimentais de IC₅₀ para a redução na expressão de LasB (Fong *et al.*, 2017).

Estrutura	Massa molecular	Redução de LasB (IC ₅₀ , µM)	Afinidades de ligação estimadas (MM/GBSA ΔG em kcal/mol)		
			Sítio proximal	Sítio lateral	Sítio distal
 16	309,86	0,56	-54,27	-39,92	-58,50
 17	377,86	0,58	-60,75	-40,65	-61,44
 18	323,88	0,68	-59,49	-45,25	-62,20
 19	353,91	0,72	-61,26	-39,99	-62,01
 20	273,83	0,78	-55,05	-41,40	-65,10
 21	239,38	0,98	-38,68	-33,07	-44,79
 22	253,41	1,12	-53,30	-37,99	-57,35

	275,41	1,34	-45,51	-37,73	-46,96
23					
	307,38	1,35	-56,45	-42,81	-60,51
24					
	305,44	1,66	-41,85	-35,20	-55,86
25					
	241,40	2,20	-47,92	-36,56	-52,09
26					
	205,32	2,28	-44,02	-29,45	-46,48
27					
	344,30	3,25	-56,86	-34,39	-64,08
28					
	253,34	3,45	-47,23	-33,31	-56,24
29					
	283,43	3,58	-60,54	-39,57	-61,24
30					
	257,76	4,08	-53,95	-35,96	-58,69
31					

	299,84	6,00	-53,86	-22,06	-50,09
32					
	468,48	12,13	-58,56	-33,91	-48,83
33					
	332,49	14,48	-44,96	-33,71	-51,37
34					
	360,54	16,90	-49,29	-35,94	-52,33
35					
	239,38	20,92	-25,47	-27,78	-41,93
36					
	163,26	31,00	-28,19	-14,46	-19,42
37					
	420,59	45,38	5,84	-34,59	-48,69
38					

Em um estudo anterior comparando valores experimentais de atividades enzimáticas com diferentes métodos teóricos de estimativa de afinidades de ligação entre ligante-proteína, Pu *et al.* observaram um aumento no coeficiente de correlação de 0,22 usando uma função de escore derivada da *ChemScore* para 0,77 quando os valores de ΔG_{bind} foram calculados para as mesmas poses de docagem com o método MM/GBSA. Desse modo, na **Tabela 3** são descritos os valores de MM/GBSA ΔG_{bind} para as combinações de poses onde o coeficiente de correlação máximo foi alcançado para cada sítio de ligação de RNA na Hfq.

Como se pode observar na **Tabela 4**, embora uma correlação positiva tenha sido obtida todos os três sítios de ligação do RNA, uma correlação forte foi observada apenas para o sítio CTP proximal. Portanto, estas análises sugerem que o ajoeno e seus análogos modulam o sistema de quorum sensing de *P. aeruginosa* ao impedir a ligação de sRNAs no sítio de ligação proximal da proteína Hfq. Em última análise, isso diminuiria a expressão da enzima AHL sintase RhII em resposta às altas densidades celulares (ou seja, quando o quorum sensing estaria completamente ativado), reduzindo assim a concentração total de C₄-HSL, como hipotetizado por Jakobsen *et al.* (2012).

Sabe-se que as bactérias têm quatro fases de crescimento sendo a fase exponencial e a estacionária as principais para ativação do quorum sensing (JoVE, 2023).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson ilustrando a força da correlação entre os escores calculados via método MM/GBSA (**Tabela 3**) e os valores experimentais de IC₅₀ acreca da redução na expressão de LasB em *Pseudomonas aeruginosa*.

Sítio de ligação RNA	Coeficiente de correlação de Pearson	Interpretação
Proximal	0,84	Correlação positiva forte
Lateral	0,51	Correlação positiva moderada
Distal	0,60	Correlação positiva moderada

Neste contexto, os sRNAs de Gram-negativas podem ser categorizados como de Classe I ou II, onde os sRNAs de Classe I usam um terminador rico em uracilas independente do fator acessório Rho para se ligarem ao sítio proximal, sendo posteriormente estabilizados por uma segunda interação no sítio lateral. Em seguida, a Hfq irá desempenhar seu papel como *matchmaker* na regulação pós-transcricional por meio da ligação do mRNA ao sítio distal. Nos sRNAs de Classe II, no entanto, após a mesma interação do terminador rico em uracilas independente do fator acessório Rho com o sítio proximal, os sRNAs formarão uma segunda interação com o sítio distal, para então se emparelharem com o mRNA que se liga ao sítio lateral da Hfq (Schu *et al.*, 2015).

Em ambos os casos, a interação inicial dos sRNAs com a Hfq dependerá da interação com o sítio proximal de um único resíduo de uridina por monômero (ou seja, até seis interações por hexâmero) (Schu *et al.*, 2015), um fato consistente com a hipótese de que o ajoeno poderia impedir a interação com os sRNAs ao se ligar aos sítios proximais da Hfq em Gram-negativas. No entanto, esse quadro pode ser ainda mais complexo considerando que pelo menos três sRNAs distintos modulam o sistema RhIR/RhII em *P. aeruginosa*. Malgaonkar e Nair (2019) demonstraram que um sRNA dependente de Hfq chamado PhrD aumentou os níveis de transcrição de RhIR e a produção de ramnolipídios e de piocianina.

Ao mesmo tempo, Thomason *et al.* (2019) identificaram um sRNA denominado RhIS, também dependente de Hfq, que controlaria a expressão da enzima RhII. Os autores construíram uma cepa de *P. aeruginosa* onde o terminador independente de Rho foi deletado e, apesar das quantidades semelhantes de mRNA observadas em comparação com cepas selvagens, uma redução de 10x nos níveis de C₄-HSL foi produzida, sugerindo que esses efeitos resultariam de uma deficiência na interação com a Hfq e seus efeitos resultantes na regulação pós-transcricional mediada por RhIS em *rhII*.

Por outro lado, o sRNA P27 descrito por Chen *et al.* (2019) reprimiu a tradução de mRNAs ligados ao *rhII* de maneira Hfq-dependente e, dessa forma, mutações que abolissem o pareamento entre sRNA-mRNA conseguiram restaurar a expressão de *rhII* e a produção de ramnolipídeos. Nesse caso, a supressão da ligação do P27 ao Hfq pelo ajoeno favoreceria, de fato, a produção de ramnolipídeos, o que contraria as observações de que o ajoeno reduzia, de forma dose-dependente, a concentração de C₄-HSL e a produção de ramnolipídios (Jakobsen *et al.*, 2012). Portanto, sem avaliar quantitativamente o impacto geral de PhrD, RhIS e P27 sobre a sinalização de C₄-HSL e, em última análise, sobre todo o sistema de *quorum sensing*, uma hipótese mais precisa não pode ser formulada.

Os modos de ligação para os 23 compostos na **Tabela 3** são ilustrados nas **Figuras 6-10**, sempre utilizando a estrutura do ligante cristalográfico CTP como referência. Embora o CTP dependa de interações de empilhamento π - π envolvendo sua citidina e de múltiplas ligações de hidrogênio realizadas com sua ribose e grupos fosfato para a interação com o sítio proximal da Hfq, os análogos de ajoeno, em geral, tendem a realizar uma única ligação de hidrogênio via nitrogênio do núcleo

benzo[*d*]tiazól. Isso é observado para 15 dos 23 análogos, excluindo os compostos **22**, **23**, **27**, **29**, **33**, **36** e **37** que, ou não tem esse núcleo em sua estrutura (**27** e **37**), ou realizam ligações de hidrogênio através de outros grupos (**23** e **29**) ou simplesmente não apresentam nenhuma ligação de hidrogênio (**22** e **36**). As interações mais frequentemente observadas foram interações por empilhamento π -alquil/ π - π com os anéis benzo[*d*]tiazól ou fenílicos, observados para todos os 23 compostos, e também interações π -enxofre, as quais estariam ausentes apenas em **17** e **24**.

Para compostos que apresentam grupos vinílicos (ou seja, **20**, **21**, **22**, **24**, **27**, **29**, **30**, **31** e **36**), estes grupos estariam envolvidos em interações diretas em apenas dois casos: **27** e **29**. Portanto, esses provavelmente não são grupos essenciais para a interação com a proteína Hfq e poderiam ser substituídos dissulfetos contendo grupos arílicos/heteroarílicos/heterocíclicos pequenos de maneira a explorar melhor as interações de empilhamento π -alquil/ π - π com resíduos do sítio proximal. O aspecto não essencial dos grupos vinílicos também é aparece quando se realiza a comparação dos valores de IC₅₀ para **21** e **26**, por exemplo (**Tabela 3**), já que a sua omissão não torna o composto inativo.

Embora o ajoeno não seja o composto mais potente da série, certamente é o mais amplamente estudado e o mais relevante do ponto de vista de estudos para o tratamento de infecções bacterianas. Portanto, também foram inspecionadas as três principais poses para o *Z*- e *E*-ajoeno ajoeno no sítio proximal de ligação de RNA, que estão representadas, respectivamente na **Figuras 11A** e **11C**. Em ambos os casos, todas as poses apresetaram orientações bastante semelhantes e com os valores de RMSD que variaram de 0,85 a 1,02 Å para o *Z*-ajoeno e de 0,33 a 1,34 Å para *E*-ajoeno o que as tornam, para fins práticos, equivalentes e intercambiáveis (Caroli *et al.*, 2014).

As interações mais relevantes previstas para *Z*- e *E*-ajoeno são ligações de hidrogênio, realizadas entre seus oxigênios tiocetônicos com, respectivamente, Gln⁸/Lys⁵⁶ ou His⁵⁷ (**Figura 11B** e **11D**). Assume-se que essas ligações de H possam impedir interações semelhantes entre o oxigênio carboxílico de CDP com a Gln⁸ ou as hidroxilas da ribose com His⁵⁷ (**Figura 6**).

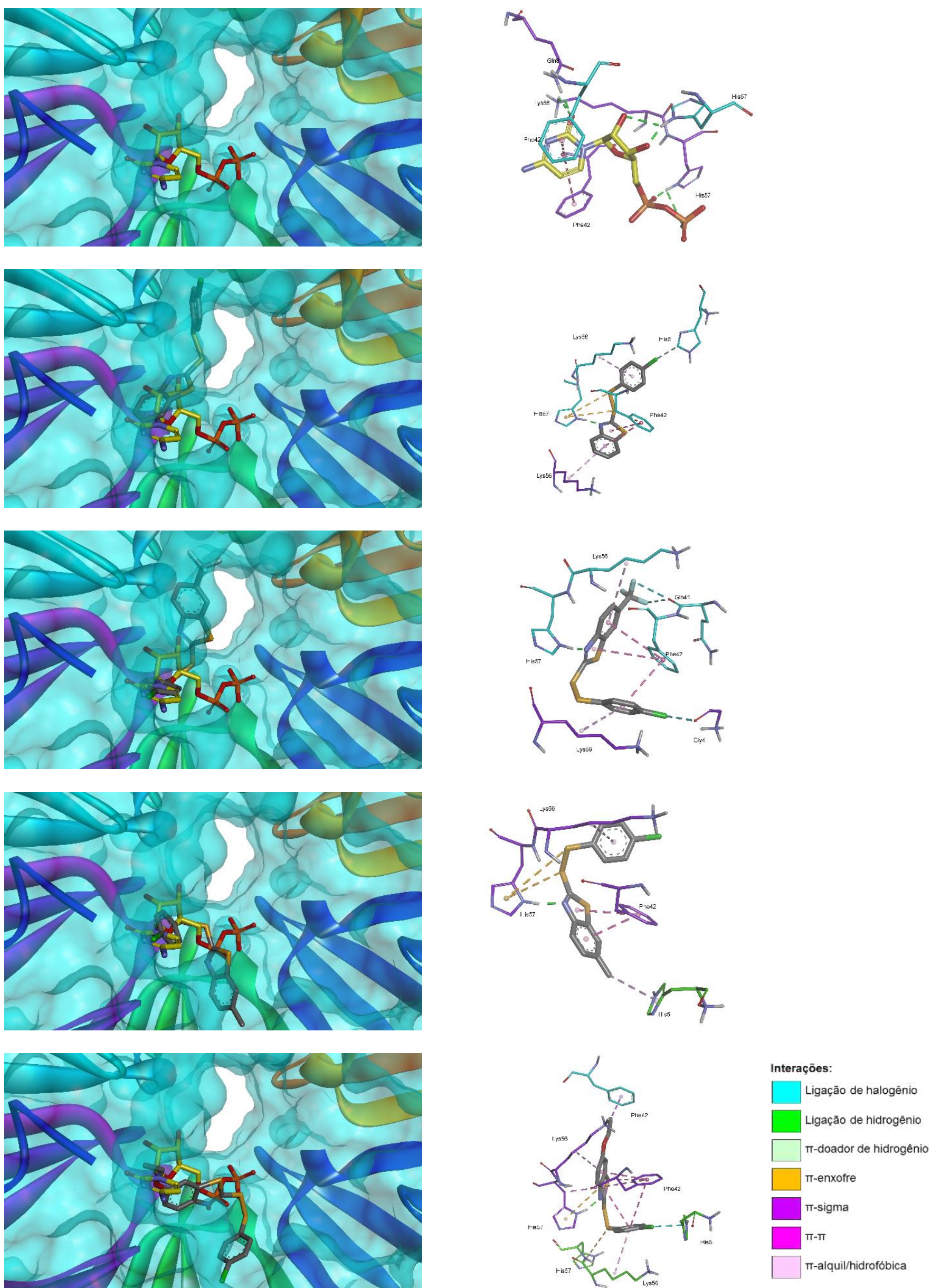


Figura 6. Esquerda: pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para **16-19** ($0,55 < IC_{50_LasB} < 0,80 \mu M$), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da direita estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**.

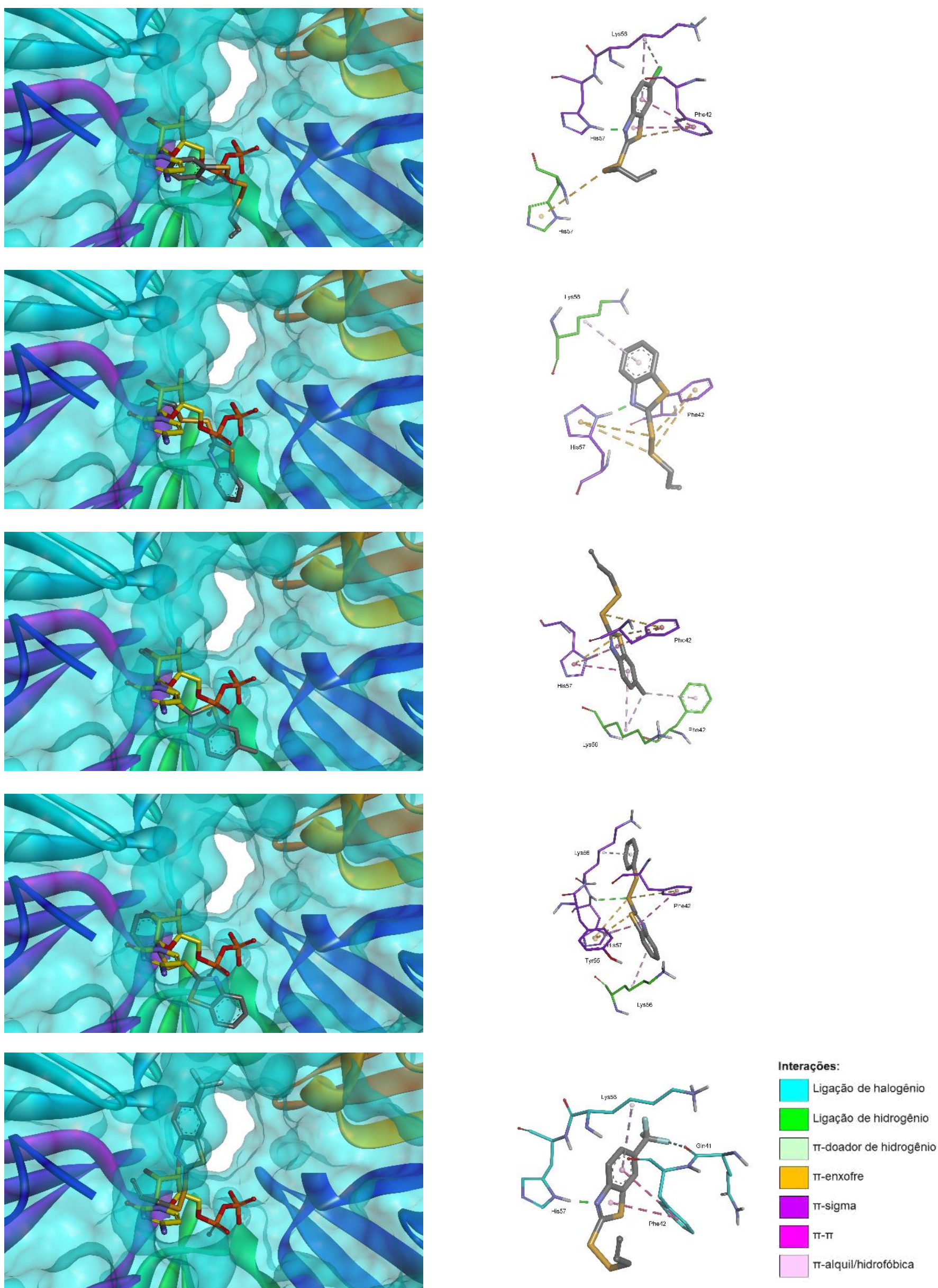


Figura 7. *Esquerda:* pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para **20-24** ($0,80 < IC_{50_Hfq} < 1,40$ μ M), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da *direita* estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**.

Figura 8. *Esquerda:* pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para **25-29** ($1,40 < IC_{50_LAsB} < 3,50 \mu M$), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da *direita* estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**.

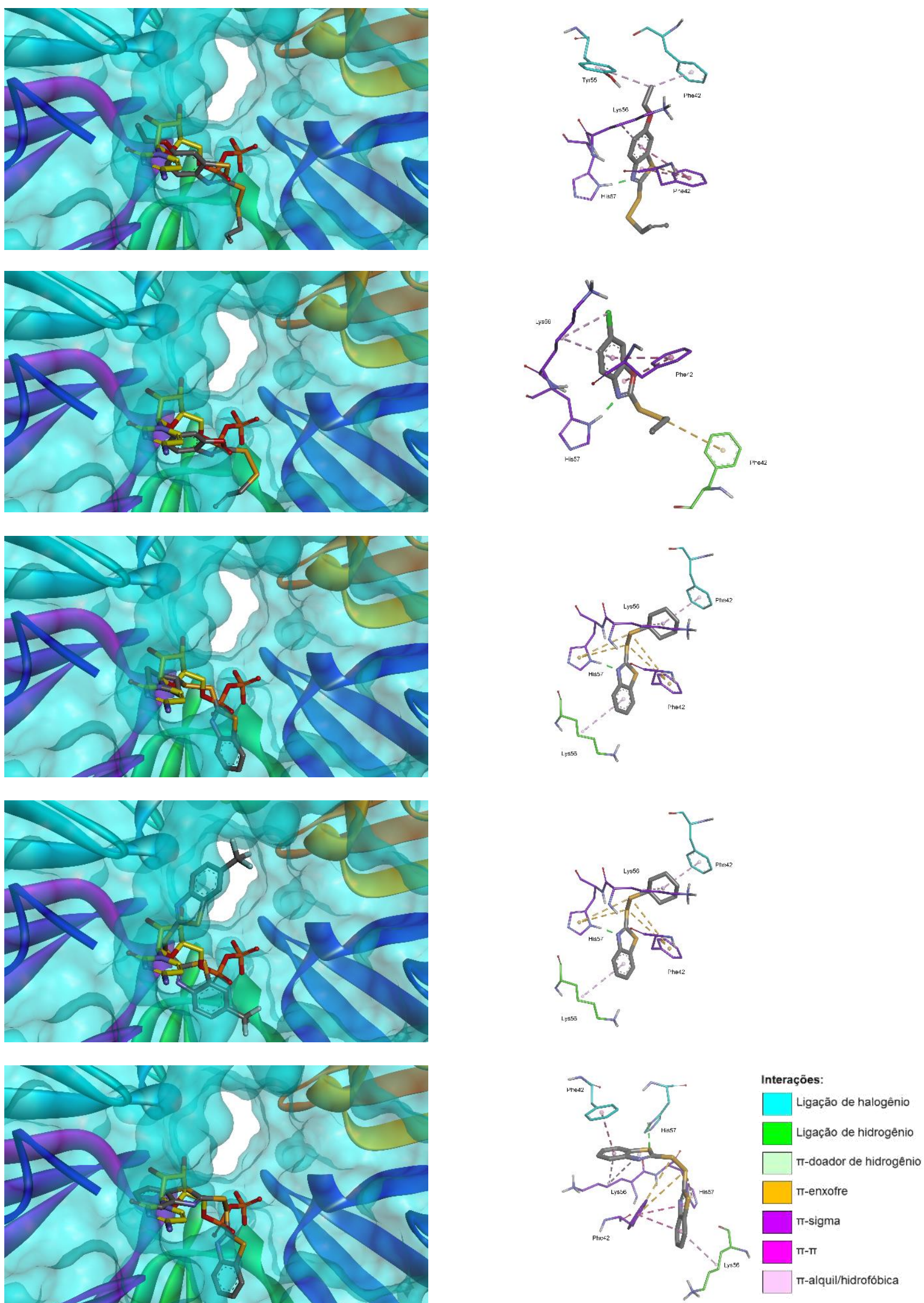


Figura 9. *Esquerda:* pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para **30-34** ($3,50 < IC_{50_LasB} < 14,50 \mu M$), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da *direita* estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**.

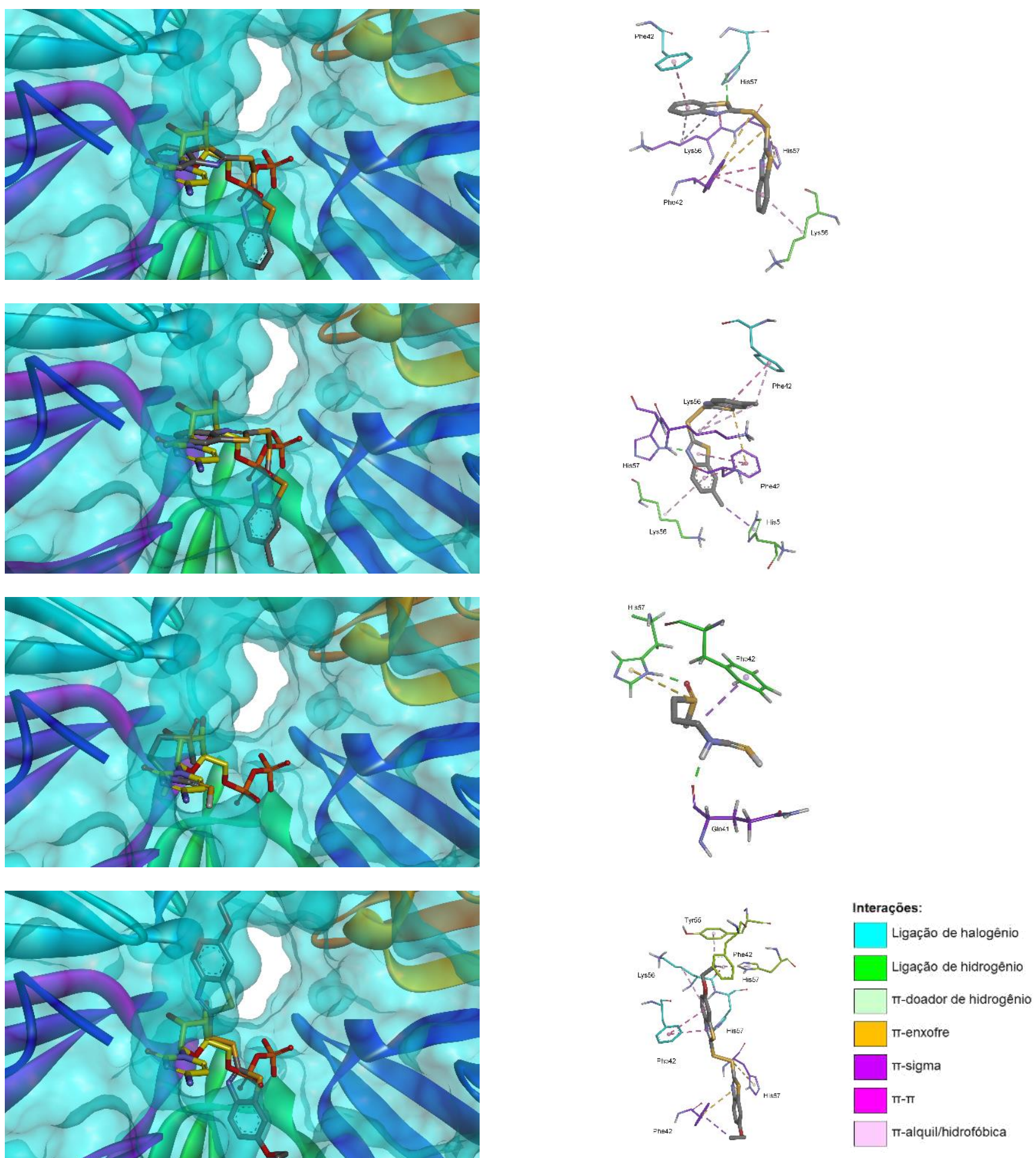


Figura 10. *Esquerda:* pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) e os modos de ligação previstos para **35-38** ($14.50 < IC_{50_LasB} < 45.40 \mu M$), respectivamente, no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Nos painéis da *direita* estão representadas as interações intermoleculares realizadas pelos ligantes, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**.

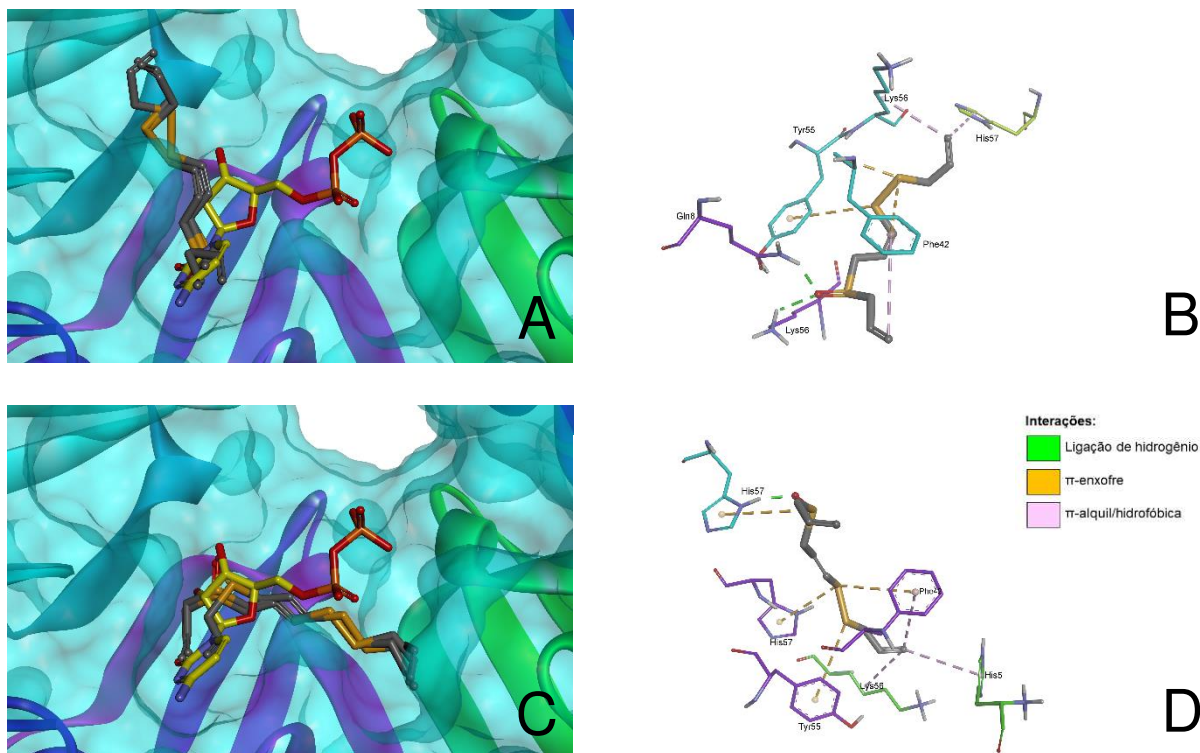


Figura 11. **A)** Pose cristalográfica do CTP (átomos de carbono em amarelo) junto aos três principais modos de ligação previstos para o *Z*-ajoeno (**A**) e *E*-ajoeno (**C**) no sítio Hfq proximal (PDB ID 4J6W). Interações intermoleculares realizadas pelo *Z*- (**B**) e *E*-ajoeno (**D**) são mostradas, juntamente com os principais resíduos de aminoácidos, destacados em amarelo esverdeado para a cadeia **B**, verde para a cadeia **C**, ciano para a cadeia **D** e roxo para a cadeia **F**.

Enquanto o *Z*-ajoeno apresentaria duas ligações de hidrogênio convencionais, a ligação de hidrogênio no *E*-ajoeno seria reforçada por uma interação π -enxofre entre a tocetona e o mesmo resíduo de aminoácido (His⁵⁷), aumentando, assim, a força total da interação. Ambos os isômeros exibiriam interações π -enxofre envolvendo os átomos da ligação de dissulfeto central, bem como interações π -alquil/hidrofóbicas em seus grupos vinílicos terminais, o que permitiria manter a esta parte da molécula interagir com uma porção hidrofóbica do sítio proximal. Devido às interações realizadas pelo *Z*- e *E*-ajoeno, ambos os isômeros apresentariam uma maior interação com a Hfq do que o próprio CDP, conforme ilustrado pelos valores de MM/GBSA ΔG_{bind} de $-54,31$ e $-48,66$, respectivamente, contra $-39,21$ Kcal/mol para o CDP.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Ajoeno possui atividades antibacterianas contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo espécies de *Mycobacterium*. Tais ações antibacterianas, quando detalhadamente estudadas para bactérias Gram-negativas, se mostraram dependente do tempo e da concentração de exposição, sendo fortes o suficiente para eliminar infecções de *P. aeruginosa* em camundongos (Bhatwalkar *et al.*, 2021). Como um dos principais constituintes do alho, o ajoeno também é um dos poucos inibidores de quorum sensing serem ensaiados em estudos clínicos. Contudo, embora as cápsulas de alho tenham sido bem toleradas pelos pacientes, estas não se mostraram superiores ao placebo no tratamento de pacientes com fibrose cística (Smyth *et al.*, 2010).

Embora Jakobsen *et al.*, (2012) tenham levantado a hipótese de que o ajoeno poderia ter como alvo a proteína Hfq e que seria capaz de modular sua interação com o RNA, este foi o primeiro trabalho a sugerir o sítio exato onde tal interação ocorreria, juntamente com os modos de ligação correspondentes adotado pelo *Z*- e *E*-ajoeno durante o processo de reconhecimento alvo-ligante.

Nesse contexto, este trabalho sugeriu que a ligação destes isômeros do ajoeno poderiam impedir a interação inicial dos sRNAs com o sítio de ligação proximal da Hfq. Isso subsequentemente bloquearia a estabilização desses sRNAs por meio de interações adicionais com resíduos do subsítio lateral (Classe I) ou distal (Classe II), bem como o pareamento com os RNAs mensageiros parcialmente complementares a estes sRNAs. Assim, o aumento na expressão da enzima AHL sintase RhII via *quorum sensing* seria bloqueado, impedindo assim o estabelecimento do *loop* de amplificação necessário para a ativação de receptores RhIR e o aumento final na expressão de fatores de virulência (*i.e.*, a elastase LasB, piocianina, HCN e ramnolipídios).

Estudos de docagem molecular prévios com foco no *quorum sensing* de Gram-negativas geralmente focam na interação de um único ou um pequeno número de compostos num sítio de ligação predeterminado da proteína alvo, como na avaliação da interação de 2,5-piperazinodiona com o receptor LasR por Musthafa *et al.* (2012) ou nas simulações sobre a ligação de AHLs a LuxR descritos por Li *et al.* (2022).

Neste sentido o presente trabalho se destaca por definir o sítio de ligação mais provável para ajoeno e seus análogos na proteína Hfq ao correlacionar as informações experimentais existentes com valores calculados de MM/GBSA ΔG_{bind} , em vez de simplesmente assumir um sítio de docagem arbitrário para esses compostos. Vale ressaltar também que o grupo de treinamento utilizado (*i.e.*, os 23 análogos do ajoeno), cujas análises visaram pré-validar as análises para o *Z*- e *E*-ajoeno, os compostos mais relevantes na clínica, continham mais de 20 análogos que variavam de inibidores fracos a fortes, uma prática recomendada quando se tenta derivar relações quantitativas de estrutura-atividade (Tropsha, 2010).

Ao expandir as análises originais realizadas por Fong *et al.* (2017) sobre os 23 análogos do ajoeno, foi possível identificar o conjunto mínimo de grupos necessários para uma boa interação com o sítio proximal da proteína Hfq, ou seja, um grupo aceitor de ligações de hidrogênio cercado por outros que interagiriam por meio de interações de empilhamento π -enxofre e/ou π -alquil/ π - π . Desse modo, acredita-se que tais informações possam ser muito úteis para orientar o desenvolvimento futuro de inibidores de Hfq mais potentes, visando bloquear os mecanismos de virulência relacionados ao quorum sensing de *P. aeruginosa* e de bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas em geral.

6. REFERÊNCIAS

- ALHEDE, M.; QVORTRUP, K.; KRAGH, K. N.; JENSEN, P. Ø.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections *in vivo*. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 2, artigo n. ftaa018, 2020. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa018>
- AMPOMAH-WIREKO, M.; LUO, C.; CAO, Y.; WANG, H.; NININHAZWE, L.; WU, C. Chemical probe of AHL modulators on quorum sensing in Gram-negative bacteria and as antiproliferative agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 226, artigo 113864, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113864>
- ARMSTRONG, D. S.; HOOK, S. M.; JAMSEN, K. M.; NIXON, G. M.; CARZINO, R.; CARLIN, J. B.; ROBERTSON, C. F.; GROMWOOD, K. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. **Pediatric Pulmonology**, v. 40, p. 500-510, 2005. <https://doi.org/10.1002/ppul.20294>
- BHATWALKAR, S. B.; MONDAL, R.; KRISHNA, S. B. N.; ADAM, J. K.; GOVENDER, P.; ANUPAM, R. Antibacterial properties of organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 613077, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.613077>
- BJARNSHOLT, T.; HØIBY, N.; JENSEN, P. Ø.; PHIPPS, R.; SHANMUGHAM, M. S.; VAN GENNIP, M.; CHRISTENSEN, L. D.; JAKOBSEN, T. H.; TANNER, D.; OSTENFELD LARSEN, T. O.; GIVSKOV, M. **Process for the manufacture of ajoene derivatives**. WO2012076016A1, 14 de junho de 2012. <https://patentimages.storage.googleapis.com/01/7a/13/f1bae5daf63c9a/WO2012076016A1.pdf>
- BLOW, D. **Outline of crystallography for biologists**. Nova Iorque: Oxford University Press, 2001. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198510512.001.0001>
- BODEY, G. P. Management of febrile neutropenia: current strategies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 4, p. s237-s358, 2005. <https://doi.org/10.1086/427333>
- BRASIL. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennis)**, 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/ppnpmf/arquivos/2014/rennisus.pdf> Acesso em: 10 de maio 2023.
- CAMPA, M.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. **Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen**. Nova Iorque: Plenum Press, 1993. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3036-7>
- CAROLI, A.; BALLANTE, F.; WICKERSHAM, R. B.; CORELLI, F.; RAGNO, R. Hsp90 Inhibitors, part 2: Combining ligand-based and structure-based approaches for virtual screening application. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, p. 970-977, 2014. <https://doi.org/10.1021/ci400760a>
- CASILAG, F.; LORENZ, A.; KRUEGER, J.; KLAWONN, F.; WEISS, S.; HÄUSSLER, S. The LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 162-171, 2016. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15>
- CHEN, R.; WEI, X.; LI, Z.; WENG, Y.; XIA, Y.; REN, W.; WANG, X.; JIN, Y.; BAI, F.; CHENG, Z.; JIN, S.; WU, W. Identification of a small RNA that directly controls the translation of the

quorum sensing signal synthase gene *rhII* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 21, p. 2933-2947, 2019. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14686>

CHIRGWIN, M. E.; DEDLOFF, M. R.; HOLBAN, A. M.; GESTAL, M. C. Novel therapeutic strategies applied to *Pseudomonas aeruginosa* Infections in cystic fibrosis. **Materials**, v. 12, n. 24, artigo n. 4093, 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12244093>

CHRISTOPOULOU, N.; GRANNEMAN, S. The role of RNA-binding proteins in mediating adaptive responses in Gram-positive bacteria. **FEBS Journal**, v. 289, 1746-1764, 2021. <https://doi.org/10.1111/febs.15810>

CIOFU, O. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal β -lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection – mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. **APMIS**, v. 111, p. 4-47, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14692154/>

ELBORN, J. S. Cystic fibrosis. **Lancet**, v. 388, n. 10059, p. 2519-2531, 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)

FONG, J.; YUAN, M.; JAKOBSEN, T. H.; MORTENSEN, K. T.; DELOS SANTOS, M. M. S.; CHUA, S. L.; YANG, L.; TAN, C. H.; NIELSEN, T. E.; GIVSKOV, M. Disulfide bond-containing ajoene analogues as novel Quorum Sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 215-227, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01025>

FONSECA, C.; BICKER, J.; ALVES, G.; FALCÃO, A.; FORTUNA, A. Cystic fibrosis: physiopathology and the latest pharmacological treatments. **Pharmacological Research**, v. 162, artigo n. 105267, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105267>

FREDERIKSEN, B.; KOCH, C.; HØIBY, N. Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients: 1974-1995. **Pediatric Pulmonology**, v. 28, p. 159-166, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0496\(199909\)28:3%3C159::aid-ppul1%3E3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0496(199909)28:3%3C159::aid-ppul1%3E3.0.co;2-1)

GENTZSCH, M.; MALL, M. A. Ion channel modulators in cystic fibrosis. **Chest**, v. 154, n. 2, p. 383-393, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.04.036>

HAREERA, M. N. F. Z.; WIJESEKARA, G. U. S.; BANDARA, E. M. S. Evidence based scientific narrative review on the anticoagulant mechanisms of *Allium sativum* (Garlic). **Journal of Health Sciences and Innovative Research**, v. 3, n. 2, 2022. <https://doi.org/10.31357/jhsir.v3i02.6188>

HAWAS, S; VERDEROSA, A. D; TOTSIKA, M. Combination Therapies for Biofilm Inhibition and Eradication: A Comparative Review of Laboratory and Preclinical Studies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12: 850030, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.850030>

HENTZER, M.; TEITZEL, G. M.; BALZER, G. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5395-5401, 2001. <https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5395-5401.2001>

HØIBY, N.; JOHANSEN, H. K.; MOSER, C.; SONG, Z. J.; CIOFU, O.; KHARAZMI, A. *Pseudomonas aeruginosa* and the biofilm mode of growth. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2001. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01349-6)

HØIBY, N.; JOHANSEN, H. K.; MOSER, C.; CIOFU, O. Clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa*: a master of adaptation and survival strategies. In: REHM, B. H. A. (Ed) **Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. p. 25-44. <https://doi.org/10.1002/9783527622009>

HULZEBOS, E.; PAH, J.; MAŚLANKIEWICZ, L.; MCM, M.; JJA, M.; SMG., P.; VERDAM, L.; VERMEIRE, T. G. **The application of structure-activity relationships in human hazard assessment: a first approach**, 2001. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/601516008.html>

JAKOBSEN, T. H.; VAN GENNIP, M.; PHIPPS, R. K.; SHANMUGHAM, M. S.; CHRISTENSEN, L. D.; ALHEDE, M.; SKINDERSOE, M. E.; RASMUSSEN, T. B.; FRIEDRICH, K.; UTHE, F.; JENSEN, P. Ø.; MOSER, C.; NIELSEN, K. F.; EBERL, L.; LARSEN, T. O.; TANNER, D.; HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by Quorum Sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2314-2325, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.05919-11>

JoVE Science Education Database. Microbiology. Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements. JoVE, Cambridge, MA, (2023). <https://app.jove.com/v/10511/growth-curves-cfu-and-optical-density-measurements>

KANG, C. -I.; KIM, S. -H.; PARK, W. B.; LEE, K. -D.; KIM, H. -B.; KIM, E. -C.; OH, M.; CHOE, K. -W. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant Gram negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 760-766, 2005. <https://doi.org/10.1128/aac.49.2.760-766.2005>

KAWANO, D.; COSTA, B.; ROMERO-OREJÓN, K.; LOUREIRO, H.; DE JESUS, D.; MARSAIOLI, A. The enantiomeric discrimination of 5-Hexyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole by sulfobutyl ether- β -cyclodextrin: a case study. **Molecules**, v. 26, artigo 2611, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26092611>

KEITA, K.; DARKOH, C.; OKAFOR, F. Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. **SN Applied Sciences**, v. 4, n. 209, 2022. <https://doi.org/10.1007/s42452-022-05084-y>

KIM, H.; WU, K.; LEE, C. Stress-Responsive Periplasmic Chaperones in Bacteria. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 8: 678697, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.678697>

LABORDA, P.; MARTÍNEZ, J. L.; HERNANDO-AMADO, S. Evolution of habitat-dependent antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, artigo n. e0024722, 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00247-22>.

LEBLANC, D. Tests of association between two quantitative variables. In:____ (Ed.) **Statistics – concepts and applications for science**. Boston, Massachusetts: Jones & Bartlett Publishers, 2003. p. 292-334. <https://books.google.com.br/books?id=qtawVU0oZFMc>

LÉTOFFÉ, S.; WU, Y.; DARCH, S. E.; BELOIN, C.; WHITELEY, M.; TOUQUI, L.; GHIGO, J. M. *Pseudomonas aeruginosa* production of hydrogen cyanide leads to airborne control of *Staphylococcus aureus* growth in biofilm and *in vivo* lung environments. **mBio**, v. 13, e0215422, 2022. <https://doi.org/10.1128/mbio.02154-22>

LI, S.; WU, S.; REN, Y.; MENG, Q.; YIN, J.; YU, Z. Characterization of differentiated autoregulation of LuxI/LuxR-type quorum sensing system in *Pseudoalteromonas*.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 590, p. 177-183, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.107>

LOSITO, A. R.; RAFFAELLI, F.; DEL GIACOMO, P.; TUMBARELLO, M. New drugs for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections with limited treatment options: a narrative review. **Antibiotics**, v. 11, n. 5), artigo n. 579, 2022.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11050579>

LUJÁN-ROCA, D. A, IBARRA-TRUJILLO, J. O; MAMANI-HUAMÁN, E. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. **Rev Biomed**. V.19, n. 3, p. 156-160, 2008.

MAHMOUDI, M.; GHAFOURIAN, S.; BADA KHSH, B. **Toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas aeruginosa***. Sharjah, EAU: Bentham Science Publishers, 2021.
<http://dx.doi.org/10.2174/97816810879311210101>

MALGAONKAR, A.; NAIR, M. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. **Science Reports**, v. 9, artigo 432, 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36488-9>

MANERA K, KAMAL F, BURKINSHAW B, DONG, T. G. Essential functions of chaperones and adaptors of protein secretion systems in Gram-negative bacteria. **The FEBS journal**, v 16, p. 4704–4717, 2022. <https://doi.org/10.1111/febs.16056>

MARNER, M.; KOLBERG, L.; HORST, J.; BÖHRINGER, N.; HÜBNER, J.; KRESNA, I. D. M.; LIU, Y.; METTAL, U.; WANG, L.; MEYER-BÜHN, M.; MIHAJLOVIC, S.; KAPPLER, M.; SCHÄBERLE, T. F.; VON BOTH, U. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, cefiderocol, and novel darobactin analogs against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from pediatric and adolescent cystic fibrosis patients. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 1, artigo n. e0443722.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.04437-22>.

MEDIATI, D. G.; LALAOUNA, D.; TREE, J. J. Burning the candle at both ends: have exoribonucleases driven divergence of regulatory RNA mechanisms in bacteria? **mBio**, 12, e0104121, 2021. <https://doi.org/10.1128/mbio.01041-21>

MEIRELLES, L. A.; NEWMAN, D. K. Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the lifecycle of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 110, 995-1010, 2018. <https://doi.org/10.1111/mmi.14132>

MILLER, R. A.; BRITIGAN, B. E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 1-18, 1997. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172912/>

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, artigo 39, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>

MURINA, V.; LEKONTSEVA, N.; NIKULIN, A. Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites. **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, p. 1504–1513, 2013.
<https://doi.org/10.1107/S090744491301010X>

MUSTHAFA, K. S., BALAMURUGAN, K., PANDIAN, S. K., RAVI, A. V. 2,5-Piperazinedione inhibits quorum sensing-dependent factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Journal of Basic Microbiology, v. 52, p. 679-686, 2012.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201100292>

NAZNIN, M. T., KITAYA, Y., SHIBUYA, T.; HIRAI, H. Light intensity effects on medicinal compound ajoene accumulation in hydroponically grown garlic plants. **Advances in Applied Agricultural Science**, v. 3, n. 4, p. 16-25, 2015.
https://www.researchgate.net/publication/315770396_ARTICLE_INFO_ABSTRACT_Light_in_tensity_affects_on_medicinal_compound_ajoene_accumulation_in_hydroponically_grown_g_arlic_plants#read

NIELSEN, J. S., LEI, L. K., EBERSBACH, T., OLSEN, A. S., KLITGAARD, J. K., VALENTIN-HANSEN, P., KALLIPOLITIS, B. H. Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 907-919, 2010. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkp1081>

OBRITSCH, M.; FISH, D. N.; MACLAREN, R.; JUNG, R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993-2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4606-4610, 2004.
<https://doi.org/10.1128/aac.48.12.4606-4610.2004>

OLIVEIRA NETO, X. A., ALVES, A. C. S., JUNIOR, R. A. D., RODRIGUES, R. P., LANCELLOTTI, M., ALMEIDA, W. P., KAWANO, D. F. Molecular docking reveals the binding modes of anticancer alkylphospholipids and lysophosphatidylcholine within the catalytic domain of Cytidine Triphosphate: Phosphocholine Cytidyltransferase. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, artigo 1900422, 2020.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201900422>

OLIVER, A.; BAQUERO, F.; BLAZQUEZ, J. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1641-1650, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02855.x>

OSIH, R. B.; MCGREGOR, J. C.; RICH, S. E.; MOORE, A. C.; FURONO, J. P., PERENCEVICH, E. N.; HARRIS, A. D. Impact of empiric antibiotic therapy outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 839-844, 2007. <https://doi.org/10.1128%2FAAC.00901-06>

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 177-192, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

PATIÑO-MORALES, C. C.; JAIME-CRUZ, R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, C.; CORONA, J.C.; HERNÁNDEZ-CRUZ, E. Y.; KALINOVA-JELEZOVA, I.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MALDONADO, P. D.; SILVA-ISLAS, C. A.; SALAZAR-GARCÍA, M. Antitumor effects of natural compounds derived from *Allium sativum* on neuroblastoma: an overview. **Antioxidants**, v.11, n. 48, 2021. <https://dx.doi.org/10.3390/antiox11010048>

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

PROCTOR, L. L.; WARD, W. L.; ROGGY, C. S.; KOONTZ, A. G.; CLARK, K. M.; QUINN, A. P.; SCHROEDER, M.; BROOKS, A. E.; SMALL, J. M.; TOWNE, F. D.; BROOKS, B. D.

Potential therapeutic targets for combination antibody therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, artigo n. 1530, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121530>

PU, C.; YAN, G.; SHI, J.; LI, R. Assessing the performance of docking scoring function, FEP, MM-GBSA, and QM/MM-GBSA approaches on a series of PLK1 inhibitors. **MedChemComm**, v. 8, p. 1452-1458, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7MD00184C>

RASAMIRAVAKA, T.; EL JAZIRI, M. Quorum-sensing mechanisms and bacterial response to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 747-53, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1101-1>

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482-501, 2018. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

RODRIGUES, R. P.; ANDRADE, S. F.; MANTOANI, S. P.; EIFLER-LIMA, V. L.; SILVA, V. B.; KAWANO, D. F. Using free computational resources to illustrate the drug design process in an undergraduate Medicinal Chemistry course. **Journal of Chemical Education**, v. 92, p. 827-835, 2015. <https://doi.org/10.1021/ed500195d>

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 1699-1713, 2006. <https://doi.org/10.1056/nejmra043632>

SADER, H. S.; MENDES, R. E.; STREIT, J. M.; CARVALHAES, C. G.; CASTANHEIRA, M. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria from intensive care unit and non-intensive care unit patients from United States hospitals (2018–2020). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 102, artigo 115557, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115557>

SANZ-GARCÍA, F.; GIL-GIL, T.; LABORDA, P.; OCHOA-SÁNCHEZ, L. E.; MARTÍNEZ, J. L.; HERNANDO-AMADO, S. Coming from the wild: multidrug resistant opportunistic pathogens presenting a primary, not human-linked, environmental habitat. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 15, artigo n. 8080, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22158080>

SAUER, E.; SCHMIDT, S.; WEICHENRIEDER, O. Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, p. 9396-9401, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202521109>

SAUER, E.; WEICHENRIEDER, O. Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, p. 13065-13070, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103420108>

SCHU, D. J.; ZHANG, A.; GOTTESMAN, S.; STORZ, G. Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. **EMBO Journal**, v. 34, p. 2557-2573, 2015. <https://doi.org/10.15252/embj.201591569>

SHAKER, B.; AHMAD, S.; THAI, T. D.; EYUN, S.; NA, D. Rational drug design for *Pseudomonas aeruginosa* PqsA enzyme: an in silico guided study to block biofilm formation. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, artigo 577316, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.577316>

SHAPOVALOV, M. V.; DUNBRACK, R. L. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. **Structure**, v. 19, p. 844-858, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>

- SIMANEK, K. A.; TAYLOR, I. R.; RICHAEAL, E. K.; LASEK-NESELQUIST, E.; BASSLER, B. L.; PACZKOWSKI, J. E. The PqsE-RhlR interaction regulates RhlR DNA binding to control virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, artigo e02108-21, 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02108-21>
- SMYTH, A. R.; CIFELLI, P. M.; ORTORI, C. A.; RIGHETTI, K.; LEWIS, S.; ERSKINE, P.; HOLLAND, E. D.; GIVSKOV, M.; WILLIAMS, P.; CÁMARA, M.; BARRETT, D. A.; KNOX, A. Garlic as an inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in cystic fibrosis — a pilot randomized controlled trial. **Pediatric Pulmonology**, v. 45, 356-362, 2010. <https://doi.org/10.1002/ppul.21193>
- SONG, Z. J.; WU, H.; CIOFU, O.; KONG, K. F.; HØIBY, N.; RYGAARD, J.; KHARAZMI, A.; MATHEE, K. *Pseudomonas aeruginosa* alginate is refractory to Th1 immune response and impedes host immune clearance in a mouse model of acute lung infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 731-740, 2003. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05122-0>
- SONNLEITNER, E.; HAGENS, S.; ROSENAU, F.; WILHELM, S.; HABEL, A.; JÄGER, K.-E.; BLÄSI, U. Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, p. 217–228, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00149-9](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00149-9)
- SONNLEITNER, E.; ROMEO, A.; BLÄSI, U. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. **RNA Biology**, v. 9, 364-371, 2012. <https://doi.org/10.4161/rna.19231>
- SONNLEITNER, E.; SCHUSTER, M.; SORGER-DOMENIGG, T.; GREENBERG, E. P.; BLÄSI, U. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: Hfq-dependent stimulation of Rhl synthesis. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 1542-1558, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05032.x>
- STRIEDNIG, B.; HILBI, H. Bacterial quorum sensing and phenotypic heterogeneity: how the collective shapes the individual. **Trends in Microbiology**, v. 30, p. 379-389, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.09.001>
- TAN, Q.; AI, Q.; XU, Q.; LI, F.; YU, J. Polymorphonuclear leukocytes or hydrogen peroxide enhance biofilm development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Mediators of Inflammation**, artigo n. 8151362, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8151362>
- TAYLOR, I. R.; PACZKOWSKI, J. E.; JEFFREY, P. D.; HENKE, B. R.; SMITH, C. D.; BASSLER, B. L. Inhibitor mimetic mutations in the *Pseudomonas aeruginosa* PqsE enzyme reveal a protein–protein interaction with the Quorum-Sensing receptor RhlR that is vital for virulence factor production. **ACS Chemical Biology**, v. 16, p. 740-752, 2021. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00049>
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, artigo 8671, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- THOMASON, M. K.; VOICHEK, M.; DAR, D.; ADDIS, V.; FITZGERALD, D.; GOTTESMAN, S.; SOREK, R.; GREENBERG, E. P. A rhlI 5' UTR-derived sRNA regulates RhlR-dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, v. 10, artigo e02253-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/mBio.02253-19>
- TONDI, D. Novel targets and mechanisms in antimicrobial drug discovery. **Antibiotics**, v. 10, artigo 141, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020141>

TONKIN, M.; KHAN, S.; WANI, M. Y.; AHMAD, A. Quorum Sensing - a stratagem for conquering multi-drug resistant pathogens. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 25, p. 2835-2847, 2021. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201210105638>

TROPSHA, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, p. 476-488, 2010. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>

TUON, F. F., DANTAS, L. R., SUSS, P. H., TASCA RIBEIRO, V. S. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. **Pathogens**, v. 11, artigo n. 300, 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>

UTARI, P. D., VOGEL, J., QUAX, W. J. Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, artigo 1123, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01123>

VAN GESTEL, J.; BAREIA, T.; TENENBAUM, B.; DAL CO, A.; GULER, P.; AFRAMIAN, N.; PUYESKY, S.; GRINBERG, I.; D'SOUZA, G. G.; EREZ, Z.; ACKERMANN, M.; ELDAR, A. Short-range quorum sensing controls horizontal gene transfer at micron scale in bacterial communities. **Nature Communications**, v. 12, artigo 2324, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22649-4>

VERDONK, M. L., COLE, J. C., HARTSHORN, M. J., MURRAY, C. W., TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p. 609-623, 2003. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>

VUKOVIĆ, S.; POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, J. B.; KOSTIĆ, A. Ž.; PANTELIĆ, N. D.; SREČKOVIĆ, N.; AKRAM, M.; LAILA, U.; KATANIĆ STANKOVIĆ, J. S. *Allium* species in the Balkan region - major metabolites, antioxidant and antimicrobial properties. **Horticulturae**, v. 9, n. 3, artigo n. 408, 2023 <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030408>

WANG, C.; YANG, D.; WANG, Y.; NI, W. Cefiderocol for the treatment of multidrug-resistant gram-negative bacteria: a systematic review of currently available evidence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, artigo n. 896971, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.896971>

WANG, E.; SUN, H.; WANG, J.; WANG, Z.; LIU, H.; ZHANG, J. Z. H.; HOU, T. End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: strategies and applications in drug design. **Chemical Reviews**, v. 119, p. 9478-9508, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>

YAN, Z.; WANG, J. Scoring Functions of Protein-Ligand Interactions. In:____ (Eds.) **Methods and algorithms for molecular docking-based drug design and discovery**: advances in medical technologies and clinical practice. Hershey: IGI Global, 2016, p. 220-245. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-0115-2>

YOSHIDA, H.; IWATA, N.; KATSUZAKI, H.; NAGANAWA, R.; ISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; FUJINO, T.; A SUZUKI, A. Antimicrobial activity of a compound isolated from an oil-macerated garlic extract. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 1014-1017, 1998. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1014>

YOUNG, D. C. **Computational drug design**: a guide for computational and medicinal chemists. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470451854>

YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, p. 1411-1422, 2008. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>