Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Dissertação

**Caracterização Estrutural e Bioquímica de LsfA,
uma 1-Cys Prx envolvida na virulência de
*Pseudomonas aeruginosa***

**Structural and biochemical characterization of LsfA, a 1-
Cys Prx related with *Pseudomonas aeruginosa* virulence**

Orientador: Dr. Luis Eduardo Soares Netto

Rogério Luis Aleixo Silva

São Paulo

2018

Rogério Luis Aleixo Silva

**Caracterização Estrutural e Bioquímica de
LsfA, uma 1-Cys Prx envolvida na virulência
de *Pseudomonas aeruginosa***

**Structural and biochemical characterization of LsfA, a 1-
Cys Prx related with *Pseudomonas aeruginosa* virulence**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia (Genética) como requisito para a obtenção do título de mestre. Relacionado à ao processo de concessão de bolsas do CNPq (130255/2016-5)

Orientador: Prof.º Dr.º Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

Aleixo Silva, Rogério Luis
Caracterização Estrutural e
Bioquímica de LsfA, uma 1-Cys Prx
envolvida na virulência de
Pseudomonas aeruginosa
95 Páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Peroxirredoxinas 2. 1-Cys 3.
Pseudomonas aeruginosa. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof.º Dr.º Luis Eduardo Soares Netto
Orientador

Epígrafe

Men are not prisoners of fate, but only prisoners of their own minds.

Franklin D. Roosevelt

Agradecimentos

Agradeço a minha namorada Caroline Gonçalves pelo companheirismo diário, pelo apoio em todos os momentos e por estar sempre comigo.

A minha mãe Márcia pelo incentivo constante desde sempre; e também ao meu pai †.

A minha tia Claudia, vô Manoel e Gabriel por me acolherem em sua casa durante um longo tempo no decorrer do mestrado.

Ao Carlos Tairum pelo convívio no Uruguai e ajuda em aguentar a Cristina.

Agradeço ao Prof.º Luis Netto, por me receber em seu laboratório. E durante todo o período do mestrado ter incentivado com ideias, correções construtivas e estímulo constante.

Ao Ms. Gilberto Kaihami e Dr.^a Regina Baldini por terem cedido gentilmente as linhagens expressando LsfA.

Ao Prof.º Dr.º Chuck Farah por nos ceder a sala de cristalização para o crescimento dos cristais.

A Dr.^a Madia Trujillo, por ter me acolhido cordialmente em seu laboratório, destinando especial atenção na ajuda e instrução nos experimentos de cinética em *StoppedFlow*.

Ao Doutorando Renato Domingos, que desempenhou papel fundamental para o andamento da parte estrutural do projeto, realizando a coleta no SSRL e com o auxílio direto nas coletas feitas no CNPEM. Além da prontidão em ajudar nas dúvidas surgidas durante todo o processo; da pipetagem para cristalização ao processamento dos dados e resolução da estrutura.

Ao técnico Ms. Thiago Alegria, pela ajuda constante nas mais variadas dúvidas; das mais básicas as mais complexas.

A todos os membros do laboratório, pelo convívio nas mais variadas situações; das arrumações, aos almoços com Fernando Gomes e cafés com Flávio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é uma gamma-proteobacteria ubíqua, sendo a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com pneumonia em UTI. A defesa do hospedeiro se dá por vários mecanismos como a liberação, por fagócitos, de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) para combater o patógeno. LsfA pertence à família das peroxirredoxinas (Prx) e ao subgrupo de Prxs que contém somente uma cisteína catalítica (denominadas 1-Cys Prx). Prxs são enzimas capazes de remover peróxidos (incluindo peroxinitrito) em velocidades muito elevadas. Além disso, LsfA está relacionada a patogenicidade de *P. aeruginosa*. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho é a caracterização bioquímica e estrutural de LsfA; que pode possibilitar a identificação de inibidores dessa enzima antioxidante. Por outro lado, caracterizando cineticamente reações de oxido-redução de LsfA e caracterizando seus mecanismos de ação, podemos identificar seus substratos biológicos. Dessa maneira, utilizando diferentes técnicas, determinamos as constantes de segunda ordem de LsfA com H_2O_2 (na ordem de $10^7 M^{-1}.s^{-1}$); para *tert*-butilhidroperóxido (na ordem de $10^6 M^{-1}.s^{-1}$) e peroxinitrito (na ordem de $10^7 M^{-1}.s^{-1}$). A redução de LsfA por ascorbato foi descrita previamente por nosso grupo (na ordem de $10^3 M^{-1}.s^{-1}$); e aqui apresentamos dados preliminares sobre a redução dessa 1-Cys Prx por GSH. Além disso, fomos capazes de determinar a estrutura cristalográfica de LsfA em sua forma oxidada e superoxidada, com resolução de 2.6 e 2.0 Å respectivamente; que, como esperado, se apresentou no estado dimérico, em ambos os casos. Descrevemos aqui características sobre a estrutura do sítio ativo de LsfA, que apresenta mais eletronegativo, com a cisteína peroxidásica desprotonada, e mais hidrofóbico. Na estrutura de LsfA superoxidada, observamos a co-cristalização dessa enzima com uma molécula de polietileno glicol que pode estar mimetizando um substrato. Portanto, esses estudos levantaram importantes informações estruturais e bioquímicas de uma enzima antioxidante envolvida com a virulência de *P. aeruginosa*.

Palavras-Chave: Peroxirredoxinas. 1-Cys. *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous gamma-proteobacteria that is the main cause of hospitalar infections among all pathogens related with pneumonia. Host defenses against pathogens are mainly by phagocytes, which releases reactive oxygen species, such as superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\text{OH}^{\cdot}$) to fight against pathogen. LsfA belongs to peroxiredoxins (Prx) family; and to the 1-Cys Prx sub-group (Prx6 sub-family) that possess only one catalytic cysteine. Prx are enzymes can remove peroxides with extremely high efficiency. LsfA was already related with *P. aeruginosa* virulence. So, the aim of the present work is the structural and biochemical characterization of LsfA, which may enable the discovery of inhibitors. Furthermore, the investigation of the kinetics and the mechanism of catalysis of LsfA may give insights on the chemical nature of its biological substrates. Therefore, using different techniques; the second order rate constants of LsfA with H_2O_2 ($10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), *tert*-butylhydroperoxide ($10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) and peroxynitrite ($10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) were determined. Our group has already determined the rate constant between ascorbate and LsfA ($10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) and preliminary data on the reduction of this 1-Cys Prx by glutathione is described. Furthermore, two crystallographic structures of LsfA were elucidated in distinct oxidative states (sulfenic and sulfonic acid in the C_p), both in the dimeric state; at 2.6 and 2.0 Å resolution respectively. Features in the LsfA active site are also described here, such as poor exposure to the solvent. In the LsfA crystal structure where C_p is hyperoxidized to sulfinic acid, we observed the presence of an electronic density compatible with a PEG molecule that might be mimicking one of the possible substrates. Therefore, relevant structural and biochemical information were gained with our studies about an antioxidant enzyme involved with *P. aeruginosa* virulence.

Keyword: Peroxiredoxins, 1-Cys, *Pseudomonas aeruginosa*

Lista de Abreviaturas e Siglas

Sigla

AhpC	<i>Alkyl-hidroperoxidase reductase C</i>
AhpF	<i>Alkyl-hidroperoxide reductase F</i>
aiPLA2	atividade lisossomal fosfolipase do tipo 2 independente de cálcio
Cl ⁻	Íon Cloro
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
C _P	Cisteína Peroxidásica
D.O.	Densidade Óptica
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTDPy	<i>(4,4'-Dipyridyl disulfide)</i>
DTNB	<i>(5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i>
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid
DTT	Ditiotreitol
FOX	<i>Ferrous Oxidations of Xylenol-Orange</i>
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutationa
HEPES	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
HOCl	Ácido Hipocloroso
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IL-8	Interleucina 8
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LB	Lúria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
LPCAT	lisofosfatidilcolina acil CoA transferase
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
NOS	NO Síntase
NOX	NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PEG	Polietilenoglicol
Prx	Peroxirredoxinas
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SSRL	<i>Stanford Synchrotron Radiation Lightsource</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
T3SS	Sistema de Secreção do tipo 3

THP	Hidroperóxido de <i>Terc</i> -Butila
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase
TSA	<i>Thiol Specific antioxidante</i>
UNIPROT	<i>Universal Protein Resource</i>
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

Sumário

1. Introdução	10
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.1.1 Visão Geral.....	10
1.1.2 Infecção bacteriana e combate pelo hospedeiro	11
1.1.3 Importância de Pesquisa e Desenvolvimento de novas maneiras de combate	15
1.2 <i>A Superfamília das Peroxirredoxinas</i>	15
1.2.1 Visão Geral.....	15
1.2.2 Aspectos Bioquímicos	20
1.2.3 Aspectos Estruturais	23
1.2.4 Papel Biológico	25
1.2.5 Subfamília das Prx6.....	27
1.2.6 LsfA	29
2. Objetivos	31
2.1 <i>Gerais</i>	31
2.2 <i>Específicos</i>	31
3 Conclusões	31
4 Bibliografia	32

1. Introdução

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Visão Geral

O gênero *Pseudomonas* compreende mais de cem espécies (ÖZEN; USSERY, 2012). *Pseudomonas aeruginosa* é uma gamma-proteobacteria ubíqua, que age principalmente como patógeno oportunista sobre pessoas que sofreram queimaduras, com infecções nos pulmões e até mesmo infecção nos olhos. Sua ubiquidade é atribuída principalmente a sua habilidade de ocupar diversos nichos ambientais, além de obter energia das mais variadas formas; podendo inclusive, infectar diversos tipos de organismos como: plantas, amebas, nematódeos e vertebrados. São inclusive capazes de viver como comensais em plantas, e possuem a capacidade de crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (Fig. 1) (LOPER et al., 2012; LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010). Outro fator determinante para sua enorme adaptabilidade a diversas situações é a sua resistência intrínseca aos mais variados antibióticos, que apresenta múltiplos mecanismos (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Dentre eles, podemos citar: a presença de uma membrana externa com baixa permeabilidade, bombas de efluxo e moléculas capazes de degradar antibióticos. Já sua capacidade de adquirir novas resistências está muito atrelada tanto ao grande tamanho e versatilidade do seu genoma, quanto ao seu trânsito pelos mais variados tipos de habitats (MESAROS et al., 2007; MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2013).

Fig. 1: Alcance funcional e ambiental de *P. aeruginosa*; esquematizando os mais diferentes nichos que essa bactéria pode ocupar, além de seus papéis na patogênese e de suas possíveis utilizações biotecnológicas (Adaptado de SILBY et al. 2011).

1.1.2 Infecção bacteriana e combate pelo hospedeiro

Uma das complicações existentes nas infecções por *P. aeruginosa* é a possibilidade de a mesma formar biofilme, onde ocorre um acúmulo de células bacterianas de maneira organizada, dificultando sua eliminação e o combate pelo hospedeiro. Portanto, muitos isolados desenvolveram uma ampla resistência a fármacos, o que pode estar relacionado a dificuldades no combate a esse patógeno, conferida pelo seu estado como biofilme (DRENKARD, 2003). Essas resistências podem ser geradas de maneira espontânea ou adquiridas, sendo a troca de material genético entre bacilos gram-negativos, intra ou inter espécies, um dos principais motivos da aquisição de resistência (NEVES et al., 2011). A atual preocupação com bactérias que possuem múltiplas resistências resultou em um acordo entre a ONU (Organização das Nações Unidas) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) para criar um grupo coordenado de combate às resistências a antibióticos

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>). No Brasil, foram encontradas altas quantidades de *P. aeruginosa* apresentando multi-resistência, em especial aos fármacos utilizados tradicionalmente no combate à infecção, que apresentaram baixa sensibilidade, em torno de 58%. Sendo que contra determinados antibióticos, como para ceftazidima e ciprofloxacino, essa resistência pode ser maior que 90% (FIGUEIREDO et al., 2007; NEVES et al., 2011; PELLEGRINO et al., 2002).

P. aeruginosa é o principal patógeno envolvido com casos de fibrose cística, com uma prevalência para pacientes adultos, que apresentam dificuldades no seu tratamento. O primeiro painel de referência, utilizado para conduzir os esforços de pesquisa e desenvolvimento que envolve esse patógeno, foi desenvolvido apenas recentemente (DE SOYZA et al., 2013). Essa bactéria está entre as principais causas de infecção hospitalar (PELLEGRINO et al., 2002), principalmente devido a sua grande capacidade de aderir a diversos materiais, como cateteres, próteses e lentes de contato; somado a enorme gama de fatores de virulência que ela apresenta. Além de ser o patógeno mais comum em infecções respiratórias e em pneumonia associada à ventilação mecânica, *P. aeruginosa* também é capaz de causar infecções sanguíneas, sendo que em todos os casos existe uma alta taxa de morbidade e mortalidade de até 61% (GELLATLY; HANCOCK, 2013; VITKAUSKIENĖ et al., 2010).

Entre os fatores de virulência dessa bactéria podemos incluir exotoxinas variadas que podem ser injetadas diretamente nas células; proteases que poderão degradar até mesmo as junções celulares, facilitando a disseminação da bactéria. Além disso, fosfolipases e lipases são capazes de destruir tanto lipídeos presentes no surfactante do pulmão, quanto os próprios lipídeos de membrana do hospedeiro. Diversas bombas de efluxo também estão presentes em *P. aeruginosa*, usadas para ejetar fármacos, assim como diversos mecanismos que lhe conferem a habilidade de aderir ao tecido. Há ainda o pigmento verde azulado, piocianina, que interfere no transporte de elétrons e ciclo redox; a pioverdina que é capaz de sequestrar Fe^{3+} (Fig. 2)(GELLATLY; HANCOCK, 2013; GEORGESCU et al., 2016) e até mesmo peroxirredoxinas, como LsfA; capaz de proteger a bactéria do *burst* oxidativo causado pelos macrófagos (KAIHAMI et al., 2014).

O NNIS/EUA (*National Nosocomial Infections Surveillance*) classifica a *P. aeruginosa* como a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com pneumonia em UTI. Além disso, esse microrganismo é o 4º agente de infecção mais abundante em ambiente cirúrgico, o 5º de infecções hospitalares em geral e o 6º de infecções da corrente

sanguínea (FAVERO et al., 1996). Entre os anos de 2012 e 2013, *P. aeruginosa* foi a bactéria gram-negativa mais encontrada nos hospitais dos Estados Unidos da América em pacientes internados na UTI ou não, e até mesmo aqueles com pneumonia associada à ventilação mecânica (SADER et al., 2015). Na América Latina, essa bactéria foi a mais encontrada entre os patógenos bacterianos de pacientes com pneumonia, a quinta em casos de infecção sanguínea e a terceira com maior prevalência em casos de infecções em feridas, segundo o sistema SENTRY (Programa de Vigilância de Resistência) (GALES et al., 2012). No Brasil, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) *P. aeruginosa* foi o quinto agente etiológico (terceiro gram negativo) mais encontrado em pacientes adultos com infecções primárias de corrente sanguínea associada a cateter venoso central na UTI (ANVISA, 2016).

Fig. 2: Diversos fatores relacionados à virulência de *P. aeruginosa* responsáveis tanto pela sua locomoção, adesão, penetração e defesa contra o hospedeiro (adaptado de GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Para que haja a infecção do indivíduo, é necessária primeiramente a colonização do epitélio respiratório do paciente com alguma debilidade, como a fibrose cística, imunodeficiência, ventilação mecânica (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Com a doença instalada, diversos sintomas podem acometer o hospedeiro, como o declínio das funções respiratórias e aumento de morbidade e mortalidade quando relacionado com fibrose cística. (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A linha de defesa primária dos organismos infectados é o influxo de células fagocitárias. Inicialmente há o recrutamento de neutrófilos dependente de IL-8. Os neutrófilos possuem diversas armas utilizadas no combate a bactéria invasora, dos quais podemos citar espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio; assim como outras moléculas não oxidativas (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Além da defesa proporcionada pelos neutrófilos, os macrófagos também possuem um papel importante na defesa do hospedeiro, promovendo um *burst* oxidativo pela ação de NADPH oxidase (NOX), no qual é liberado o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, o óxido nítrico (NO^*) pode ser produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase, o qual é capaz de gerar peroxinitrito pela reação com $O_2^{\cdot-}$ (DETTMAN et al., 2013; SUNTRES; OMRI; SHEK, 2002). Portanto, as células fagocitárias geram o estresse oxidativo para combater o patógeno por meio de enzimas como NOX e óxido nítrico sintases (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000).

O H_2O_2 presente nas células é produzido principalmente pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ gerado pela NOX. A geração de H_2O_2 pode acarretar na formação de outras moléculas capazes de causar dano à célula. Dentre essas moléculas podemos citar o radical hidroxila (OH^*), formado pela reação de Fenton, e o HOCl (ácido hipocloroso), gerado pela reação catalisada por mieloperoxidases entre H_2O_2 e Cl^- (íon cloro) (HOPKINS, 2017).

Mais recentemente, o H_2O_2 também tem sido relacionado com a sinalização celular, em especial em células eucarióticas, assim como o óxido nítrico (DRÖGE, 2002). A sinalização intermediada pelo H_2O_2 se dá, de maneira geral, por meio da oxidação do tiól da cisteína das mais variadas proteínas, como kinases/fosfatases, receptores, fatores de transcrição ou peroxidases (HOPKINS, 2017; SIES, 2017). Em termos químicos, a oxidação dessas proteínas sinalizadoras em sistemas celulares provavelmente deve ser mediada por Prxs ou Glutathione Peroxidase que são muito mais reativas com H_2O_2 (NETTO; ANTUNES, 2016).

Assim como o H_2O_2 , o óxido nítrico além de ser um precursor de outros oxidantes, também é capaz de atuar como molécula sinalizadora, relacionado com homeostase vascular,

neurotransmissão, hemóstase, além de ser utilizado na defesa do hospedeiro, função à qual iremos nos ater (CALCERRADA; PELUFFO; RADI, 2011). Os oxidantes derivados do óxido nítrico possuem a capacidade de modificar moléculas biológicas, como proteínas, DNA, ácidos graxos insaturados e até mesmo outros pequenos tóxicos de duas maneiras principais: a oxidação ou a nitração. Uma das vias de redução da quantidade de óxido nítrico, e consequente inativação dos seus efeitos, é a reação com o $O_2^{\cdot-}$, cuja velocidade é limitada somente pela difusão das moléculas, o que acarreta na geração de peroxinitrito, um potente oxidante (PELUFFO; RADI, 2007). Peroxinitrito é um importante oxidante derivado do óxido nítrico utilizado pelos macrófagos no combate ao patógeno, gerado pela produção simultânea do $O_2^{\cdot-}$ e de óxido nítrico (RADI, 2013). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, os patógenos possuem diversos mecanismos para burlar as defesas do hospedeiro e defender-se de seus ataques.

1.1.3 Importância de Pesquisa e Desenvolvimento de novas maneiras de combate

P. aeruginosa, em especial, apresenta um agravante em casos de infecção, pois, além das altas taxas de ocorrência, a mortalidade e morbidade causada; há ainda o problema da sua vasta resistência à antibiótico, seja ela inerente da própria bactéria, ou adquirida (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2005). Tal resistência, por muitas vezes, não se dá à apenas um tipo de composto, mas a diversos; o que confere o “título” de multirresistentes a diversos isolados de *P. aeruginosa* (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2008; FALAGAS; KOLETISI; BLIZIOTIS, 2006; MAGIORAKOS et al., 2012).

A soma de todos esses fatores levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a classificar *P. aeruginosa* como pertencente ao grupo de maior urgência na pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (HARBARTH et al., 2017). Nessa perspectiva, e sabendo que grande parte dos antibióticos utilizados na medicina para o combate a bactérias realiza a promoção de um *burst* oxidativo (LUSHCHAK, 2001); o desenvolvimento de fármacos capazes de atuar na inibição da atividade antioxidante da bactéria, seriam promissores.

1.2 *A Superfamília das Peroxirredoxinas*

1.2.1 Visão Geral

As Peroxirredoxinas (Prx) estão entre as enzimas antioxidantes mais reativas e abundantes, sendo capazes de reduzir diversos tipos de peróxidos, dentre eles o H_2O_2 , peróxidos orgânicos e peroxinitrito (HALL et al., 2011). As Prxs fazem parte de uma grande família de proteínas, difundidas por vários grupos filogenéticos, com papel nas mais variadas funções, como por exemplo: proliferação, diferenciação e em vias apoptóticas (NELSON et al., 2008; WEN et al., 2007). Elas podem compreender até cerca de 1% da proteína solúvel de uma célula de mamífero; enquanto que em *Escherichia coli* estão entre as dez proteínas mais abundantes (HANSCHMANN et al., 2013). E, apesar de normalmente estarem presentes no citoplasma das células, há também aquelas encontradas na mitocôndria, cloroplastos, peroxissomos, associadas à membrana e núcleo, e até mesmo aquelas que são exportadas (WOOD et al., 2003).

Aliado às Prx, a catalase e glutathione peroxidase desempenham papel principal na defesa antioxidante das células, contudo, as Prx foram as últimas a serem descobertas. A descoberta das Prx se deu em 1994, com a descrição da *Thiol-specific antioxidant* (TSA) e *Alkyl-hydroperoxide reductase C* (AhpC), processo que havia tido início em 1988 com a descrição de uma enzima antioxidante que: “não era catalase, glutathione peroxidase, nem possuía atividade de quelar ferro” (CHAE et al., 1994; KIM et al., 1988). Sua atividade, diferentemente da catalase e glutathione peroxidase, não é dependente de nenhum cofator, utilizando apenas resíduos de cisteína para a catálise do peróxido (KARPLUS, 2015).

As Prx, além de serem necessárias às células no desempenho dos processos fisiológicos mencionados anteriormente, algumas delas já foram correlacionadas com a virulência de diversas bactérias, em especial a AhpC, uma 2-Cys Prx (CHAROENLAP et al., 2012; COSGROVE et al., 2007). Em infecções por alguns protozoários, essas enzimas antioxidantes estão relacionadas com a patogênese, e podem ser consideradas um possível alvo terapêutico (DONNELLY et al., 2005). Em *Cryptococcus neoformans*, Prxs foram igualmente relacionadas com a virulência (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004). Contudo, tratamentos que lançam mão da ação sobre as Prxs ainda são escassos, apesar de existirem estudos iniciais (GRETES; POOLE; KARPLUS, 2012).

Todas as Prx possuem um sítio ativo centrado em uma cisteína (Cys) extremamente conservada, denominada como cisteína peroxidásica (C_p). A oxidação de C_p (que se encontra na forma desprotonada $C-S^-$) origina o ácido sulfênico ($C-SOH$), enquanto que o H_2O_2 , peroxinitrito e outros hidroperóxidos são reduzidos à água, nitrito ou ao seu álcool correspondente, respectivamente. A alta reatividade da C_p nas Prxs está relacionada ao

ambiente do seu sítio ativo, que além de direcionar e conduzir o substrato à C_p é capaz de manter o seu pK_a baixo, normalmente < 7 , potencializando sua reatividade (HALL et al., 2011). A C_p é totalmente conservada, sendo cercada por resíduos igualmente conservados de prolina (Pro) e arginina (Arg), além de uma treonina (Thr) (pode ser substituída por uma serina [Ser]). Esses resíduos fazem parte do motivo $Pxxx(T/S)xxC$, somado à Arg conservada que está distante da C_p na sequência primária, mas espacialmente está próximo do tiolato desse amino ácido. Esse arranjo estrutural é responsável por estabilizar o estado de transição da reação de redução de peróxidos por C_p das Prxs (POOLE; NELSON, 2016).

O mecanismo enzimático observado para as Prxs é o Ping-Pong, observado em enzimas que apresentam dois substratos (no caso hidroperóxido e redutor). O mecanismo ping-pong consiste em uma sequência de duas reações bi moleculares sem a formação de um complexo ternário com os dois substratos simultaneamente (DIETZ, 2007).

Essas proteínas podem ser divididas em dois grupos, as 1-Cys Prx e as 2-Cys Prx, levando-se em consideração a quantidade de resíduos de Cys envolvidos na catálise. As 2-Cys Prxs possuem uma segunda cisteína (de resolução - C_R) na porção C-terminal, e podem ser subdivididas em típicas e atípicas. Nas primeiras, a C_P-SOH de uma subunidade reage com a C_R-SH que está na segunda subunidade do homo dímero para formar pontes dissulfeto intermoleculares. Por outro lado, nas 2-Cys Prxs atípicas, a C_P-SOH reage com a C_R-SH que está na mesma subunidade formando pontes dissulfeto intramoleculares (Fig. 3A). Ao final do ciclo, em ambos os casos, o dissulfeto é reduzido para que a enzima possa completar o seu ciclo catalítico. Em geral, o redutor responsável por essa etapa é a oxidoreductase tiorredoxinas (Trx) (WEN et al., 2007; WINTERBOURN; PESKIN, 2016).

Para as 1-Cys Prx, não há a formação de um dissulfeto, pela ausência de C_R . Dessa maneira, após a oxidação da C_P (C_P-SOH), haverá a redução direta por compostos contendo grupamentos tióis, como Trxs, glutarredoxinas, glutathione (GSH) ou outros grupos antioxidantes doadores de elétrons como ascorbato (Fig. 3B)(PEDRAJAS et al., 2016). A descrição de ascorbato como redutor de 1-Cys Prx foi realizada pela primeira vez por nosso grupo (MONTEIRO et al., 2007).

Fig. 3: Mecanismo catalítico das Prxs, em A) das 2-Cys Prx típicas e atípicas; em B) 1-Cys Prx.

As Prx podem ainda ser superoxidadas a ácido sulfinico ($-\text{SO}_2^-$) ou sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}^-$), estados que não são reduzidos por tiorredoxina, glutarredoxina ou GSH. No caso específico das 2-Cys Prx típicas, as formas superoxidadas podem ser reduzidas pela ação da enzima sulfirredoxina. Já para as 1-Cys Prx não é conhecido nenhum mecanismo de redução da C_p superoxidada (KIM; LEE; KIM, 2016; WOO et al., 2005).

Fig. 4: Ciclo catalítico de uma 2-Cys Prx, evidenciando a transição de FF (*fully folded*) em seu estado reduzido (C_P-S^-), para LU (*locally unfolded*) quando oxidado (C_P-SOH). * Possível mecanismo de regulação das Prx (Adaptado de Perkins et al., 2015).

Existe também, uma correlação entre o estado de oxidação das 2-Cys Prx com seu estado oligomérico. As 2-Cys Prxs podem ser encontradas como dímeros ou decâmeros, sendo que a formação do dissulfeto do sítio ativo parece ser um fator importante para desestabilizar sua forma decamérica (TAIRUM et al., 2016; WOOD et al., 2003). Embora pouco estudada, parece que as 1-Cys Prx se apresentam predominantemente como dímeros (WOOD et al., 2003).

Outra mudança estrutural que ocorre nas 2-Cys Prxs ao longo do ciclo catalítico é um desenovelamento parcial da última volta da α hélice onde a C_P está inserida, capaz de afetar a reatividade da enzima com o peróxido e também a formação do dissulfeto. Em seu estado chamado FF (*Fully Folded*) a Prx é capaz de reagir rapidamente com peróxidos, sendo esse o estado em que a Prx pode sofrer oxidação ou superoxidação. Já na conformação LU (*Locally Unfolded*) a C_P está menos restrita e assim pode reagir com a C_R , possibilitando a formação do dissulfeto, que mantém a forma LU estável (Fig. 4)(HALL et al., 2010; HALL; KARPLUS;

POOLE, 2009; PERKINS et al., 2015). Esse mecanismo é proposto para todas as Prx, contudo amplamente estudado e conhecido somente para as 2-Cys Prx típicas (KARPLUS, 2015).

Além da divisão mecanística em 1-Cys Prx e 2-Cys Prx, há também uma classificação baseada em sua sequência primária, que leva em consideração fatores estruturais e não necessariamente está relacionada à divisão anterior. Nesse caso, as Prxs são divididas em seis subfamílias: Prx1/AhpC (abreviada como Prx1), Prx5, Prx6, Tpx, BCP/PrxQ (abreviada como PrxQ), e AhpE. O subgrupo das Prx6 é um dos menos estudados (POOLE; NELSON, 2016).

A subfamília da Prx6, cujos integrantes possuem, em sua maioria, o mecanismo catalítico do tipo 1-Cys; apresenta semelhança com a subfamília das Prx1, como a extensão C-terminal em sua estrutura que as difere das demais Prxs. As distinções cinéticas entre as Prxs são ainda menos claras, havendo maiores diferenças quanto aos seus redutores, à exemplo de AhpC, uma Prx da subfamília Prx1, cujo redutor é uma flavoproteína especializada na sua redução, chamada AhpF (POOLE; NELSON, 2016). Padrões de sequência no sítio ativo, contudo, são capazes de diferenciar essas duas subfamílias que aparentam ser evolutivamente similares. Enquanto as Prx1 apresentam o motivo $PxDF(T/S)FVC_P$, as Prx6 possuem o $Px(D/N)(F/Y)TPVC_P$, com a sequência que precede a cisteína catalítica, TFVC ou TPVC, tida como característica única para cada um desses subgrupos respectivamente (HARPER et al., 2017).

1.2.2 Aspectos Bioquímicos

Como mencionado anteriormente as Prxs apresentam uma altíssima capacidade de reduzir diversos tipos de peróxidos (FLOHÉ; BUDDE; HOFMANN, 2003). Contudo, o aminoácido cisteína, livre da cadeia polipeptídica, apresenta uma baixa reatividade para hidroperóxidos (WOOD et al., 2003). Em termos quantitativos, a C_P em Prxs é entre 1 a 10 milhões de vezes mais reativa com hidroperóxidos do que a cisteína livre (revisado por NETTO et al., 2016).

Portanto, o enovelamento da proteína parece criar um microambiente no sítio ativo para que essas enzimas apresentem tamanha reatividade. Esse microambiente é capaz de estabilizar a C_P na forma de tiolato (C_P-S^-) em pH fisiológico. A forma desprotonada de cisteínas é mais reativa, por conta da sua maior nucleofilicidade (NETTO et al., 2016). A reação entre essas enzimas e seus substratos, envolve um ataque nucleofílico do tiolato da cisteína (C_P-S^-) a um

eletrófilo que, no caso, é um hidroperóxido. Os grupos guanidina da arginina conservada e outras interações não covalentes com resíduos não carregados estabilizam o tiolato.

Porém, a estabilização da C_P na forma desprotonada é responsável por somente um ganho de dez vezes na reatividade em relação à cisteína livre. Outro fator mais relevante é a estabilização do estado de transição da reação de substituição nucleofílica entre a C_P e hidroperóxidos (HALL et al., 2011). A dessolvatação (ausência de água no sítio ativo) é outro fator capaz de influenciar na reatividade das cisteínas por aumentarem as interações eletrostáticas como um todo (FERRER-SUETA et al., 2011). E para isso, a Thr e a Arg conservadas no sítio ativo desempenham um papel fundamental, interagindo com o substrato peróxido e estabilizando um estado de transição que possibilita a catálise (Fig. 5).

Essas considerações se aplicam ao primeiro passo da catálise, que consiste no ataque do tiolato da cisteína ao hidroperóxido, havendo a quebra da ligação entre os oxigênios, que gera o ácido sulfênico na cisteína (C_P -SOH) e a molécula produto (água ou álcool) (Fig. 4). Em seguida, ocorre uma reorganização do sítio ativo como um todo, para que possa haver a formação de uma ponte dissulfeto (Fig. 4), proporcionando a possibilidade de redução e ciclagem da enzima, em especial para as 2-Cys Prx (PARSONAGE et al., 2015).

Fig. 5: Esquema do estado de transição no sítio ativo das Prxs. Onde tanto a cadeia principal, quanto as cadeias laterais de alguns aminoácidos interagem com o peróxido, aumentando assim a reatividade das Prxs. Em especial ressaltando a reação de substituição nucleofílica entre o hidróperóxido e o enxofre da C_p . (HALL et al., 2011).

As Prx apresentam uma reatividade excepcional, atingindo constantes de segunda ordem de até $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, com oxidantes variados, dentre eles H_2O_2 e peroxinitrito (RHEE; KIL, 2017). Contudo, há casos em que a Prx pode apresentar uma maior especificidade quanto a seu substrato, o que pode correlacioná-la ao seu papel biológico. A Prx II humana possui uma reatividade 10 vezes maior com H_2O_2 do que com peroxinitrito (MANTA et al., 2009). *Arenicola marina* possui uma Prx6 que apresenta uma alta reatividade com H_2O_2 e peroxinitrito, na ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, enquanto que com *Terc* butilhidroperóxido (THP) apresentou uma constante de segunda ordem 100x menor (LOUMAYE et al., 2011). De maneira oposta, Ahp1 de *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma grande preferência por

hidroperóxidos orgânicos, como THP ou hidroperóxido de cumeno (CHP), em relação à H_2O_2 (LIAN et al., 2012). Contudo, há ainda aquelas Prx que não apresentam preferências quanto ao peróxido a ser reduzido, a exemplo da Prx6 humana, que apresenta uma reatividade similar tanto para H_2O_2 , THP, hidroperóxidos de ácidos graxos e além deles, é capaz de reduzir também hidroperóxidos de fosfolipídeos com similar eficiência (MANEVICH; FISHER, 2005), sendo esse último a principal molécula que HsPrx6 é responsável por reduzir nas membranas celulares do pulmão (FISHER, 2017).

1.2.3 Aspectos Estruturais

As Prxs possuem uma grande variação quanto à sua estrutura primária (sequência de aminoácidos). No entanto, ao observarmos sua estrutura terciária, existe um cerne que é comum a todas elas. Esse padrão comum é baseado no *fold* Trx, compartilhado por todas as Prx: folhas β centrais, cercadas por α hélices, consistindo em um motivo N-terminal $\beta\alpha\beta$ e um C-terminal $\beta\beta\alpha$, ligados por uma região de loops com α hélice (CAO; LINDSAY, 2017; HALL et al., 2011). Esse *fold* é também compartilhado com diversos outros grupos de proteínas, como as dissulfeto isomerases, glutarredoxinas, glutathione-S-transferases e glutathione peroxidases. Isto pode estabelecer uma correlação evolutiva, mostrada para a relação entre as Prx e Trx, ficando claro que as Prx evoluíram de um ancestral Trx-like capaz de realizar reações de troca tiól-dissulfeto. Desse ancestral comum, derivaram ao menos oito superfamílias, que compreendem cerca de 0,45% de todas as sequências presentes no UniProt (<http://www.uniprot.org>) (ATKINSON; BABBITT, 2009). A presença ou não da C_R surge como um refinamento de algumas linhagens de Prx, em detrimento de outras. Dentro do grupo das que possuem a C_R , existe uma distinção entre quatro possíveis posições na qual a C_R pode ser encontrada, o que pode ser facilmente compreendido ao observarmos a grande variação de estrutura quaternária (oligomerização) que essas Prxs apresentam (COPLEY; NOVAK; BABBITT, 2004).

O estado oligomérico das Prxs varia, em especial, conforme o estado redox na qual ela se encontra. Contudo, outras condições podem influenciar no estado de oligomerização, em especial das 2-Cys, como: força iônica, pH baixo, altas concentrações de cálcio ou magnésio e até mesmo a superoxidação de sua C_P a ácido sulfínico (SO_2^-) (WOOD et al., 2003). Dentre todas as Prx, apesar de seus sítios ativo serem independentes, e consequentemente, serem capazes de desempenhar a catálise como um monômero; os estados de oligomerização mais

comuns são os dímeros (tipo A e B), além de octamêros, decâmeros e até mesmo dodecâmeros (Fig. 6) (KARPLUS; HALL, 2007). Os dímeros do tipo B são alinhados no sentido antiparalelo (*Head to Tail*), onde as folhas β interagem, alinhando os cernes Trx dos dois monômeros que formam uma sequência de 10-14 folhas β . Em geral, essa interação entre monômeros se dá por interações hidrofóbicas, como descrito para a HsPrx6, com o envolvimento especial de duas leucinas (ZHOU et al., 2016). Enquanto isso, os dímeros com interface do tipo A, apresentam uma interação entre monômeros próximo a $\alpha 3$ (POOLE; NELSON, 2016).

Dímeros

Tipo A: (Prx5 Tpx e PrxQ)

Tipo B: (Prx1, Prx6 e AhpE)

Decâmero (Prx1 e Prx6)

Fig. 6: Possíveis estados oligoméricos das Prx, divididos por subfamílias, com destaque para as interfaces de dimerização do tipo A e B (POOLE; NELSON, 2016).

A atividade de algumas Prx já foi correlacionada ao seu estado oligomérico, com maiores estudos sobre as 2-Cys. Os dímeros, sejam reduzidos ou superoxidados, tendem a oligomerizar em decâmeros ou dodecâmeros; enquanto que, ao sofrerem oxidação, tendem a permanecer como dímeros. Essa transição entre os variados estados oligoméricos pode ser correlacionada tanto com sua função catalítica como peroxidase, quanto a sua função chaperona (nos estados oligoméricos de alto peso molecular); e até mesmo funcionando como um sensor redox. No caso das 1-Cys, o grupo menos estudado das Prx, o conhecimento sobre a influência de seus estados oligoméricos em sua atividade também é prejudicado (BARRANCO-MEDINA; LÁZARO; DIETZ, 2009). A representante mais bem estudada do grupo das Prx6, a HsPrx6 se comporta majoritariamente como dímero (WU et al., 2006). Contudo, existem outras Prx6 que exibem estados oligoméricos variados, como de decâmero na Tiorredoxina Peroxidase de *Aeropyrum pernix*, que pertence a esse. Há ainda a curiosa Prx6 de *Arenicola marina*, que apresenta grande similaridade de sequência com HsPrx6, mas possui mecanismo catalítico de uma 2-Cys típica, e sua estrutura quaternária pode formar um tetrâmero, unindo dois dímeros (SMEETS et al., 2008).

1.2.4 Papel Biológico

A principal função fisiológica das Prx é a redução de H_2O_2 , peroxinitrito e hidroperóxidos orgânicos; sejam eles endógenos ou gerados por células fagocitárias durante a infecção do organismo pelo patógeno (BRYK; GRIFFIN; NATHAN, 2000). Existem relatos do envolvimento de algumas Prx com a patogenicidade de certas bactérias, a exemplo AhpC em *Helicobacter cinaedi* e LsfA em *P. aeruginosa* (CHAROENLAP et al., 2012; KAIHAMI et al., 2014). Não é claro o papel dessas Prxs, podendo não se restringir à detoxificação de oxidantes, mas também possuir um papel como sinalizadoras intracelulares (NETTO; ANTUNES, 2016).

A capacidade de sinalização das Prx está altamente relacionada ao papel sinalizador desempenhado pelo H_2O_2 , que é capaz de, por exemplo, regular fatores de crescimento e ativar a atividade de receptores do tipo tirosino-quinase, culminando na fosforilação de determinados resíduos de tirosina e, conseqüentemente, a ativação de vias de sinalização intracelulares (HOPKINS, 2017; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Como exemplo de atuação das Prx na sinalização, podemos citar a HsPrx2, capaz de atuar em cascata de sinalização (Fig. 7). HsPrx2 após ser oxidada, é capaz de interagir e transferir equivalente oxidantes para o fator de transcrição STAT3, que por sua vez irá oligomerizar e ter sua atividade transcricional

atenuada (SOBOTTA et al., 2015). Há também a correlação da superoxidação de Prx associada ao ciclo circadiano, especialmente para a HsPrx3 (KIL et al., 2012, 2015; O-NEILL; REDDY, 2011; RHEE; KIL, 2016).

Fig. 7: Mecanismo de sinalização do H_2O_2 , que pode ocorrer de maneira direta, ou por intermédio das Prxs (Adaptado de Winterbourn e Hampton (2015)).

As Prx podem ser utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo, algo que, novamente, é mais caracterizado para as 2-Cys Prx. A reação de oxido-redução das Prx tem sua velocidade sendo limitada pela taxa de redução da C_P , já que a velocidade de oxidação é extremamente alta. Esse fato, unido a menor quantidade de redutor em relação às Prxs, faz

com que haja um efeito gargalo. Pelo fato das 2-Cys típicas formarem dímeros em seu estado oxidado, um ambiente oxidativo proporcionaria um maior acúmulo dessas proteínas nesse estado, o que pode ser detectado e utilizado como um marcador redox. Há ainda a possibilidade de explorar a superoxidação das Prxs como um marcador de estresse oxidativo (POYNTON; HAMPTON, 2014).

1.2.5 Subfamília das Prx6

Essa subfamília está amplamente distribuída nos diversos filos (POOLE; NELSON, 2016), e apresenta uma grande quantidade de membros com o mecanismo catalítico do tipo 1-Cys, porém há também aquelas com mecanismo 2-Cys. Como mencionado anteriormente, a subfamília das Prx6 é o grupo menos estudado dentro das Prx. Seu primeiro membro identificado foi encontrado no epitélio ciliar de bovinos (SHICHI; DEMAR, 1990); e, seu membro melhor estudado, é a Prx6 humana, a última das Prxs humanas a ser identificada e a primeira das Prx a ter sua estrutura cristalográfica elucidada (CHOI et al., 1998). O pouco conhecimento sobre as Prx da subfamília das Prx6 se reflete na baixa quantidade de estruturas cristalográficas disponíveis. Apesar da primeira Prx a ter sua estrutura resolvida ser a Prx6 de mamíferos, das cerca de 32 estruturas cristalográficas diferentes de Prx disponíveis, apenas 5 são de membros da subfamília Prx6 (HALL et al., 2011).

Em comparação com outras Prx, a redução das 1-Cys Prx não está bem caracterizada, sendo controversa a identidade do redutor biológico. HsPrx6 pode ser reduzida por GSH (glutathiona), com o auxílio de uma Π -GST (Glutathione transferase) (RALAT et al., 2008; ZHOU et al., 2016). O ascorbato (vitamina C) já foi descrito, por nosso grupo, como sendo um redutor não tiólico de diversas 1-Cys Prx, incluindo Prx6 de *Ratus norvegicus* (MONTEIRO et al., 2007). Vários redutores foram propostos para Prx1 mitocondrial de *S. cerevisiae*, incluindo GSH, Grx (Glutarredoxina) e/ou Trx (GREETHAM; GRANT, 2009; PEDRAJAS et al., 2000, 2016, 2010).

A HsPrx6 apresenta uma altíssima reatividade frente os mais diferentes peróxidos e peroxinitrito (PESHENKO; SHICHI, 2001); contudo, possui algumas peculiaridades que a distingue das demais Prx. Sua multifuncionalidade pode ser notada por suas distintas atividades catalíticas, dentre elas, a primeira que podemos citar é a sua capacidade de reduzir hidroperóxidos de fosfolipídeos com constante na ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (FISHER et al., 1999).

HsPrx6 ainda possui duas outras atividades catalíticas que a diferencia das demais Prxs, a atividade aiPLA₂ (atividade lisossomal fosfolipase do tipo 2 independente de cálcio) e a LPCAT (lisofosfatidilcolina acil CoA transferase) (FISHER et al., 2016; KIM et al., 1998). A atividade PLA₂ está centrada no motivo lipase GxSxG, e desempenha papel majoritário no metabolismo do surfactante dos pulmões. Seu papel se dá pela hidrólise de fosfolípidos na posição sn-2, e tem como pH ótimo o lisossomal (~4). Contudo, com a fosforilação da Thr 144, essa atividade passa a operar com maior eficiência em pH neutro (citoplasmático) (MANEVICH et al., 2007; WU et al., 2009). Acilar a lisofosfatidilcolina com um ácido graxo livre é papel da atividade LPCAT, que atua em continuidade à atividade PLA₂. Essa ação se inicia com a hidrólise, pela atividade PLA₂, e a seguida reacilação pela atividade LPCAT; ambas já foram associadas a regeneração de fosfolípidos de membrana reduzidos (FISHER et al., 2016). O resumo das atividades de HsPrx6 está esquematizado na Fig. 8.

Fig. 8: Esquema da atuação de HsPrx6 no reparo de fosfolipídeos de membrana. A) representa um fosfolipídio de membrana em seu estado normal. Em B) A oxidação de uma de suas cadeias lipídicas, possibilitando a ação de HsPrx6; que poderá C) reduzir diretamente o hidroperóxido de fosfolipídio, por meio de sua atividade peroxidásica, ou D) remover a cadeia lipídica oxidada, utilizando a atividade PLA_2 , e posteriormente, pela atividade LPCAT, reintroduzir uma cadeia lipídica reduzida para reestabelecer o fosfolipídio de membrana à sua condição original (Baseado em Fisher, 2017).

1.2.6 LsfA

Existem dez Prx em *P. aeruginosa*, sendo que LsfA é a única 1-Cys Prx. Essa enzima pertence à subfamília das Prx6, apresentando massa aproximada de 24 kDa. Como predito por análise de sua sequência de amino ácidos, ela se localiza no citoplasma (KAIHAMI et al., 2014).

O gene *lsfa* é induzido por carência de sulfato inorgânico, além de outros genes associados ao transporte e utilização de sulfato. Há também uma correlação entre a privação do sulfato com o estresse oxidativo (TRALAU et al., 2007). Além disso, a expressão de LsfA

é induzida em *P. aeruginosa* quando a mesma é desafiada por *paraquat*, um composto gerador de $O_2^{\cdot -}$, assim como quando desafiada com hipoclorito de sódio. Porém, não apresenta mudanças de expressão quando a bactéria é desafiada com H_2O_2 ou ácido paracético (HARE et al., 2011; PALMA et al., 2004; SMALL et al., 2007). A regulação da expressão de LsfA parece ser mediada por OxyR, um conhecido regulador transcricional sensível a H_2O_2 , já que o mesmo se liga ao promotor do gene dessa enzima antioxidante (WEI et al., 2012).

Pseudomonas fluorescens apresenta uma 1-Cys Prx homóloga de LsfA (identidade de 84%) que, quando superexpressa em *E. coli*, apresentou capacidade de proteger essa bactéria de altas doses de H_2O_2 (1,9 mmol/L), além de ser capaz de reduzir H_2O_2 *in vitro*. Foi verificada também a capacidade dessa proteína em reduzir insulina *in vitro* (LIU et al., 2015).

Em *Aspergillus fumigatus* foi identificada uma Prx mitocondrial que apresenta ~54% de identidade com LsfA, com o mesmo nome, que apresentou uma maior expressão quando o fungo é tratado com anfotericina B, que dentre outras funções, é capaz de acarretar em um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (MOLONEY; OWENS; DOYLE, 2016). Resultados contrários foram observados quando o mesmo foi tratado com a micotoxina T-2, produzida por *Fusarium spp* (LI et al., 2015).

O presente trabalho é justificado pelo fato de *P. aeruginosa* ser um importante patógeno e principal causador de infecção hospitalar no Brasil e no mundo. De fato, o NNIS/EUA (*National Nosocomial Infections Surveillance*) classifica *P. aeruginosa* como a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com pneumonia em UTI (FAVERO et al., 1996). O que também ocorre no Brasil, estando entre os principais agentes etiológicos mais encontrado em pacientes adultos com infecções primárias de corrente sanguínea associada à cateter venoso central na UTI; além de apresentar altos graus de resistência, atingindo, na região sul do Brasil, taxas de até 93,7% das cepas encontradas tendo resistência à antibióticos (ANVISA, 2016; NEVES et al., 2011).

Por outro lado, LsfA tem papel na patogenicidade em *P. aeruginosa* (KAIHAMI et al., 2014). Dessa forma, a obtenção da estrutura dessa 1-Cys Prx possibilita a busca por inibidores e assim novas formas de tratamento. A determinação de suas características cinéticas possibilita uma maior compreensão sobre a proteína e suas possíveis funções biológicas.

2. Objetivos

2.1 Gerais

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar bioquímica e estruturalmente a proteína LsfA, uma 1-Cys Prx de *P. aeruginosa*. Compreender os possíveis substratos biológicos dessa proteína, e abrir a perspectiva de identificar futuros inibidores e compreender seu papel na proteção da bactéria. Como LsfA está envolvida em patogenicidade, moléculas com propriedades inibitórias podem apresentar potencial terapêutico.

2.2 Específicos

- Determinar constantes de segunda ordem da oxidação de LsfA por diferentes oxidantes. Ex.: H_2O_2 , THP, peroxinitrito;
- Buscar possíveis redutores biológicos de LsfA;
- Determinar a estrutura cristalográfica de LsfA em diferentes estados oxidativos.

3 Conclusões

Por meio de análises cinéticas, fomos capazes de determinar as constantes de segunda ordem de LsfA com diferentes tipos de peróxidos.

- Constante de segunda ordem com H_2O_2 na ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;
 - Competição com HRP: $2,95 \pm 0,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;
 - Cinética por Mudança de Fluorescência: $3,47 \pm 0,18 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;
 - Cinética acompanhando o decaimento de peroxinitrito: $3,28 \pm 0,60 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- Constante de segunda ordem com THP na ordem de $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;
 - Cinética por Mudança de Fluorescência: $1,7 \pm 0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;
 - Cinética acompanhando o decaimento de peroxinitrito: $1,3 \pm 0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- Constante de segunda ordem com peroxinitrito na ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;
 - Competição com HRP: $8,2 \pm 1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;

- Cinética acompanhando o decaimento de peroxinitrito: $1,93 \pm 0,66 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Mostrarmos possíveis redutores de LsfA

- Ascorbato, constante de segunda ordem de $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (ANSCHAU, 2016);
- GSH foi capaz de sustentar a atividade peroxidásica de LsfA;

Além disso, foram determinadas duas estruturas cristalográficas de LsfA, em diferentes estados oxidativos. Os seguintes dados foram obtidos no presente trabalho:

- LsfA em sua forma SOH, apresenta estado oligomérico de dímero e na conformação FF;
- LsfA em sua forma superoxidada (SO₃H), apresenta o estado oligomérico de dímero e na conformação FF;
- PEG presente no sítio ativo, possivelmente simulando uma molécula de substrato.

4 Bibliografia

ALEGRIA, T. G. P. et al. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 2, p. E132–E141, 10 jan. 2017.

ANSCHAU, V. **Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato**. [s.l.] (Tese de Doutorado em Biologia (Genética)) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, 2016.

ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**, v. 16, p. 82, 2016.

ATKINSON, H. J.; BABBITT, P. C. An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 10, 2009.

BARRANCO-MEDINA, S.; LÁZARO, J. J.; DIETZ, K. J. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. **FEBS Letters**, v. 583, n. 12, p. 1809–1816, 2009.

BRYK, R.; GRIFFIN, P.; NATHAN, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 211–215, 2000.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2000.

CALCERRADA, P.; PELUFFO, G.; RADI, R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 3905–3932, 2011.

CAO, Z.; LINDSAY, J. G. The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. In: HARRIS, J. R.; MARLES-WRIGHT, J. (Eds.). . Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 83p. 127–147.

CHAE, H. Z. et al. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 15, p. 7017–7021, 19 jul. 1994.

CHANG, X. et al. Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. R76, 2 dez. 2007.

CHAROENLAP, N. et al. Alkyl hydroperoxide reductase is required for helicobacter cinaedi intestinal colonization and survival under oxidative stress in balb/c and balb/c interleukin-10-/- mice. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 921–928, 2012.

CHEN, J. W. et al. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28421–28427, 2000.

CHOI, H.-J. J. et al. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 ? resolution. **Nat Struct Biol**, v. 5, n. 5, p. 400–406, maio 1998.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v.

50, n. 5, p. 760–763, 1 set. 1994.

COPLEY, S. D.; NOVAK, W. R. P.; BABBITT, P. C. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: Evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. **Biochemistry**, v. 43, n. 44, p. 13981–13995, 2004.

COSGROVE, K. et al. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1025–1035, 2007.

COWTAN, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, n. 9, p. 1002–1011, 2006.

DE SOYZA, A. et al. Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. **MicrobiologyOpen**, v. 2, n. 6, p. 1010–1023, 2013.

DETTMAN, J. R. et al. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 52, p. 21065–70, 2013.

DIETZ, K.-J. **The dual function of plant peroxiredoxins in antioxidant defence and redox signaling**. [s.l: s.n.].

DONNELLY, S. et al. Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 166–173, 1 jan. 2005.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1213–1219, 2003.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 1 jan. 2002.

DUBUISSON, M. et al. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. **FEBS Letters**, v. 571, n. 1–3, p. 161–165, 2004.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta**

Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 60, n. 12 I, p. 2126–2132, 2004.

ESPENSON, H. J. Chemical kinetics and reaction mechanisms. In: **Series in Advanced Chemistry**. [s.l: s.n.].

FALAGAS, M. E.; KARAGEORGOPOULOS, D. E. Pandrug Resistance (PDR), Extensive Drug Resistance (XDR), and Multidrug Resistance (MDR) among Gram-Negative Bacilli: Need for International Harmonization in Terminology. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 7, p. 1121–1122, 2008.

FALAGAS, M. E.; KOLETSI, P. K.; BLIZIOTIS, I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1619–1629, 2006.

FAVERO, M. S. et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report, data summary from October 1986–April 1996, issued May 1996. **American Journal of Infection Control**, v. 24, n. 5, p. 380–388, out. 1996.

FERRER-SUETA, G. et al. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 434–450, 2011.

FISHER, A. et al. Phospholipid hydroperoxidase are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. v. 274, n. 30, p. 21326–21334, 1999.

FISHER, A. B. et al. A novel lysophosphatidylcholine acyl transferase activity is expressed by peroxiredoxin 6. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 4, p. 587–596, 2016.

FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 617, p. 68–83, mar. 2017.

FISHER, A. B. et al. Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes. **Redox Biology**, v. 14, n. June 2017, p. 41–46, abr. 2018.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, ago. 2012.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.

GEORGESCU, M. et al. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. S1, p. 92, 2016.

GREETHAM, D.; GRANT, C. M. Antioxidant Activity of the Yeast Mitochondrial One-Cys Peroxiredoxin Is Dependent on Thioredoxin Reductase and Glutathione In Vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 11, p. 3229–3240, 2009.

GRETES, M. C.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxins in parasites. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 4, p. 608–33, 2012.

HALL, A. et al. Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power is Based on Transition-State Stabilization. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 1, p. 194–209, set. 2010.

HALL, A. et al. Structure-based Insights into the Catalytic Power and Conformational Dexterity of Peroxiredoxins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 795–815, ago. 2011.

HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Typical 2-Cys peroxiredoxins - Structures, mechanisms and functions. **FEBS Journal**, v. 276, n. 9, p. 2469–2477, 2009.

HANSCHMANN, E.-M. et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 13, p. 1539–605, 2013.

HARBARTH, S. et al. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>.

HARE, N. J. et al. Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 15, p. 3056–3069, ago. 2011.

HARPER, A. F. et al. An Atlas of Peroxiredoxins Created Using an Active Site Profile-Based Approach to Functionally Relevant Clustering of Proteins. **PLoS Computational**

Biology, v. 13, n. 2, p. 1–32, 2017.

HO, J.-N. et al. Phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 promotes invasion and metastasis of lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 825–832, 2010.

HOPKINS, R. Z. Hydrogen Peroxide in Biology and Medicine: An Overview. **Reactive Oxygen Species Cell Med Press**, v. 26, n. 37, p. 1–12, 2017.

HORTA, B. B. et al. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Q?? from *Xylella fastidiosa*: Catalytic mechanism and high reactivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p. 16051–16065, 2010.

JAEGER, T. et al. Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, n. 1, p. 182–191, 2004.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, maio 1992.

KABSCH, W. Xds. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.

KAIHAMI, G. H. et al. Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.

KARPLUS, P. A. A primer on peroxiredoxin biochemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, n. 4, p. 183–190, mar. 2015.

KARPLUS, P. A. .; HALL, A. **Peroxiredoxin Systems**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. v. 44

KERTESZ, M. A. Riding the sulfur cycle--metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 2, p. 135–75, abr. 2000.

KIL, I. S. et al. Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H2O2-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 584–594, 2012.

- KIL, I. S. et al. Circadian Oscillation of Sulfiredoxin in the Mitochondria. **Molecular Cell**, v. 59, n. 4, p. 651–663, 2015.
- KIM, K. et al. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a Thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 10, p. 4704–4711, 1988.
- KIM, K. H.; LEE, W.; KIM, E. E. K. Crystal structures of human peroxiredoxin 6 in different oxidation states. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 717–722, 2016.
- KIM, T. S. et al. Cloning and expression of rat lung acidic Ca(2+)-independent PLA₂ and its organ distribution. **The American journal of physiology**, v. 274, p. L750–L761, 1998.
- KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78–91, 2006.
- KWON, J. et al. Peroxiredoxin 6 (Prdx6) supports NADPH oxidase1 (Nox1)-based superoxide generation and cell migration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 96, p. 99–115, jul. 2016.
- LANGER, G. G. et al. Visual automated macromolecular model building. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 69, n. 4, p. 635–641, 1 abr. 2013.
- LEE, J. et al. A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4537–4544, 1999.
- LEE, S. B. et al. Peroxiredoxin 6 promotes lung cancer cell invasion by inducing urokinase-type plasminogen activator via p38 kinase, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. **Molecules and Cells**, v. 28, n. 6, p. 583–588, 2009.
- LI, S.-J. et al. Exposure of *Aspergillus fumigatus* to T-2 toxin results in a stress response associated with exacerbation of aspergillosis in poultry. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 3, p. 323–333, 2015.
- LIAN, F. M. et al. Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp1 peroxiredoxin reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 21, p. 17077–17087,

2012.

LIU, G. et al. Overexpression and activities of 1-Cys peroxiredoxin from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A carried by pine wood nematode. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 5, p. 443–450, 2015.

LOPER, J. E. et al. Comparative genomics of plant-associated *pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 7, 2012.

LOUMAYE, E. et al. Kinetic studies of peroxiredoxin 6 from *Arenicola marina*: Rapid oxidation by hydrogen peroxide and peroxynitrite but lack of reduction by hydrogen sulfide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 514, n. 1–2, p. 1–7, out. 2011.

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 5, p. 476–489, 2001.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MANEVICH, Y. et al. Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 10, p. 2306–2318, 2007.

MANEVICH, Y.; FEINSTEIN, S. I.; FISHER, A. B. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with GST. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 11, p. 3780–3785, 2004.

MANEVICH, Y.; FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 11, p. 1422–1432, 2005.

MANTA, B. et al. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, n. 2, p. 146–154, 2009.

MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the dawn of the 2d millenium. **Antibiotiques**, v. 9, n. 3, p. 189–198, 2007.

MISHRA, Y. et al. Active-site plasticity revealed in the asymmetric dimer of AnPrx6 the 1-Cys peroxiredoxin and molecular chaperone from *Anabaena* sp. PCC 7210. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17151, 2017.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 835–846, 2004.

MOLONEY, N. M.; OWENS, R. A.; DOYLE, S. **Proteomic analysis of *Aspergillus fumigatus* - clinical implications**. [s.l: s.n.]. v. 9450

MONTEIRO, G. et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 12, p. 4886–91, 2007.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JAN, p. 1–8, 2013.

NAKAMURA, T. et al. Crystal structure of thioredoxin peroxidase from aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 62, n. 3, p. 822–826, 2006.

NAKAMURA, T. et al. Structure of peroxiredoxin from the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69, n. 7, p. 719–722, 2013.

NELSON, K. J. et al. Cysteine p K a Values for the Bacterial Peroxiredoxin AhpC † ‡. **Biochemistry**, v. 47, n. 48, p. 12860–12868, 2 dez. 2008.

NETTO, L. E. S. et al. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. **Free Radical Research**, v. 50, n. 2, p. 206–245, 8 fev. 2016.

NETTO, L. E. S.; ANTUNES, F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. **Molecules and cells**, v. 39, n. 1, p. 65–71, 2016.

- NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, 2011.
- O-NEILL, J. S.; REDDY, A. B. Circadian clocks in human red blood cells. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 498–504, 2011.
- OGUSUCU, R. et al. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 3, p. 326–334, 2007.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Structural Insights into Enzyme–Substrate Interaction and Characterization of Enzymatic Intermediates of Organic Hydroperoxide Resistance Protein from *Xylella fastidiosa*. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 2, p. 433–445, jun. 2006.
- ÖZEN, A. I.; USSERY, D. W. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 239–248, 2012.
- PACIFICI, F. et al. Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 10, p. 3210–3220, 2014.
- PALMA, M. et al. Transcriptome Analysis of the Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Hydrogen Peroxide. v. 186, n. 1, p. 248–252, 2004.
- PARSONAGE, D. et al. Dissecting Peroxiredoxin Catalysis: Separating Binding, Peroxidation, and Resolution for a Bacterial AhpC. **Biochemistry**, v. 54, n. 7, p. 1567–1575, 24 fev. 2015.
- PEDRAJAS, J. R. et al. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16296–16301, 2000.
- PEDRAJAS, J. R. et al. Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 24, n. 3, p. 115–128, 20 jan. 2016.
- PEDRAJAS, R. et al. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 3, p. 249–258, 2010.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2420–4, jul. 2002.

PELUFFO, G.; RADI, R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 291–302, 15 jul. 2007.

PERKINS, A. et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 8, p. 435–45, 2015.

PESHENKO, I. V.; SHICHI, H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 3, p. 292–303, 1 ago. 2001.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

POOLE, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 148–157, 2015.

POOLE, L. B.; NELSON, K. J. Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. **Molecules and cells**, v. 38, n. 9, p. 53–59, 2016.

POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 906–912, 2014.

QUADRONI, M. et al. Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **European journal of biochemistry**, v. 266, n. 3, p. 986–996, 15 dez. 1999.

RADI, R. et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4244–50, 5 mar. 1991.

RADI, R. **Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules**. [s.l.: s.n.]. v. 269

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26464–26472, 2013.

RALAT, L. A. et al. Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and 1-cysteine peroxiredoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, n. 1, p. 109–118, 2008.

RHEE, S. G. Overview on Peroxiredoxin. **Molecules and cells**, v. 39, n. 1, p. 1–5, 2016.

RHEE, S. G.; KIL, I. S. Mitochondrial H₂O₂ signaling is controlled by the concerted action of peroxiredoxin III and sulfiredoxin: Linking mitochondrial function to circadian rhythm. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 73–80, 2016.

RHEE, S. G.; KIL, I. S. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. annurev-biochem-060815-014431, 7 jul. 2017.

ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 17–32, 2005.

SADER, H. S. et al. Ceftazidime/avibactam tested against Gram-negative bacteria from intensive care unit (ICU) and non-ICU patients, including those with ventilator-associated pneumonia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 1, p. 53–59, 2015.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, maio 2014.

SHICHI, H.; DEMAR, J. C. Non-selenium glutathione peroxidase without glutathione S-transferase activity from bovine ciliary body. **Experimental Eye Research**, v. 50, n. 5, p. 513–520, maio 1990.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, n. November 2016, p. 613–619, abr. 2017.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

SMALL, D. A. et al. Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 1093–1105, 14 set. 2007.

SMEETS, A. et al. The crystal structure of the C45S mutant of annelid *Arenicola marina* peroxiredoxin 6 supports its assignment to the mechanistically typical 2-Cys subfamily without any formation of toroid-shaped decamers. **Protein Science**, v. 17, n. 4, p. 700–710, abr. 2008.

SOBOTTA, M. C. et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H_2O_2 signaling. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 64–70, 2015.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, 2009.

SUNTRES, Z. E.; OMRI, A.; SHEK, P. N. *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury: role of oxidative stress. **Microbial Pathogenesis**, v. 32, n. 1, p. 27–34, 2002.

TAIRUM, C. A. et al. Catalytic Thr or ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–12, 2016.

TOLEDO, J. C. et al. Horseradish peroxidase compound i as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: From quantification to kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1032–1038, 2011.

TRALAU, T. et al. Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 19, p. 6743–6750, 2007.

TRUJILLO, M. et al. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* Tryparedoxin Peroxidases Catalytically Detoxify Peroxynitrite via Oxidation of Fast Reacting Thiols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34175–34182, 13 ago. 2004.

TRUJILLO, M. et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 467, n. 1, p. 95–106, 2007.

TRUJILLO, M.; FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Kinetic Studies on Peroxynitrite Reduction by Peroxiredoxins. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 441p. 173–196.

VAGIN, A. A. et al. REFMAC5 dictionary: Organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2184–2195, 2004.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, n. 6, p. 1022–1025, 1997.

VEDADI, M. et al. Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 100–110, 2007.

VITKAUSKIENĖ, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 46, n. 7, p. 490–5, 2010.

VONRHEIN, C. et al. Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 293–302, 2011.

WANG, Q. et al. Identification and characterization of a novel 1-Cys peroxiredoxin from silkworm, *Bombyx mori*. v. 149, p. 176–182, 2008.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.

WEI, Q. et al. Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4320–4333, 2012.

WEN, L. et al. Biochemical characterization of 1-Cys peroxiredoxin from *Antrodia camphorata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1314–1322, 2007.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. **Respirology**, v. 15, n. 7, p. 1037–1056, 2010.

WINTERBOURN, C. C. **The biological chemistry of hydrogen peroxide**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 528

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Redox biology: Signaling via a peroxiredoxin sensor. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 5–6, 2015.

WINTERBOURN, C. C.; PESKIN, A. V. Kinetic Approaches to Measuring Peroxiredoxin

Reactivity. **Molecules and cells**, v. 39, n. 1, p. 26–30, 2016.

WOO, H. A. et al. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3125–3128, 4 fev. 2005.

WOOD, Z. A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 1, p. 32–40, 2003.

WU, Y. et al. Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A 2 activity. **Biochemical Journal**, v. 419, n. 3, p. 669–679, 1 maio 2009.

WU, Y. Z. et al. Interaction of surfactant protein A with peroxiredoxin 6 regulates phospholipase A2 activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7515–7525, 2006.

ZHOU, S. et al. Peroxiredoxin 6 homodimerization and heterodimerization with glutathione S-transferase pi are required for its peroxidase but not phospholipase A2 activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 94, p. 145–156, maio 2016.