**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GILBERTO HIDEO KAIHAMI

**Envolvimento da peroxirredoxina LsfA
na virulência de *Pseudomonas aeruginosa***

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

14/05/2013

GILBERTO HIDEO KAIHAMI

**Envolvimento da peroxirredoxina LsfA
na virulência de *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra Regina Lúcia Baldini

São Paulo

2013

Gilberto Hideo Kaihami

Envolvimento da peroxirredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Bioquímica

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais, pelo amor carinho e
apoio em todos os momentos da minha vida*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Mario e Harumi que deram todo o apoio durante todas as fases da minha vida, com muito amor e dedicação.

Aos meus irmãos Ricardo e Fabio, por fazerem parte da minha vida.

À Dr^a Regina Baldini pelo carinho, incentivo, dedicação neste trabalho, e mais que isso por acreditar que eu seria capaz de desenvolvê-lo.

Ao Dr. Sandro de Almeida pelo incentivo, disponibilidade, e pela coragem ao aceitar desenvolver este trabalho conosco.

À Dr^a Suely Lopes Gomes pelo apoio e disponibilidade do espaço físico, e pelos grandes conselhos e ensinamentos.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, Dr^a Nadja Cristhina de Souza Pinto Lardner e Dr^a Aline Maria da Silva, pelas críticas e sugestões.

A todos os professores que contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica, em especial, à Dr^a Iolanda Midea Cuccovia, ao Dr. Bayardo Baptista Torres, ao Dr. Luis Eduardo Soares Netto, à Dr^a Karen Spadari Ferreira e a Dr^a Marilis do Valle Marques.

Aos amigos do grupo da professora Regina: Ana Paula, Ana Laura, Eliezer, Patrícia, Thays e Duílio pelos ótimos momentos de descontração tornando o ambiente agradável para o trabalho. Gostaria de agradecer em especial ao Diogo e Gianluca por me ensinarem as técnicas básicas de biologia molecular, além do carinho e atenção em todos os momentos desde a iniciação até o presente momento.

Aos amigos do grupo do professor Sandro: Karla, José (Zé), Lucas, Fábio, Miriam, Pollyanna, Suelen, Lavinia e Grasi pela ajuda e pelo aprendizado e desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Ao grupo da professora Suely: Rogério, César, André, Gabriela, Juliana e Liliane pelo bom ambiente de trabalho.

À Sandra, Luci, Doris e Nilde pela dedicação e competência ao trabalho.

À Dona Maria e Dona Miriam pelo cafezinho de todo dia.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Cibeles, Emiliano e Milton pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Aos amigos e colegas da Bioquímica e da Farmácia pelos sorrisos e conversas pelo corredor.

Aos amigos Andreas, Mario (Moxila), Mauro (Boteco), Marião, Rapha, Thiago (Menudo), Luizinho, Akira, Deris, por acreditarem e apoiarem hoje e sempre.

À Sayuri por sempre estar ao meu lado em todas as minhas decisões,
pelo apoio quando foi preciso, por sempre me animar quando eu mais
precisava.

Por fim, a Deus.

RESUMO

Kaihami, G.H. **Envolvimento da peroxirredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa***. 2012. 95p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As bactérias são reconhecidas pelos macrófagos através dos receptores do tipo Toll (TLR), que ativam as vias do NF- κ B e das MAPKs, resultando em respostas como a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), que causam a morte do microrganismo. *P. aeruginosa*, uma causa comum de pneumonia associada à ventilação mecânica, é uma bactéria que utiliza diversas estratégias de virulência e defesa, incluindo mecanismos antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre o papel da 1-Cys peroxirredoxina LsfA está envolvida na virulência de *P. aeruginosa*. Linhagens mutantes com deleção em *lsfA* ou com uma mutação pontual neste gene (troca da Cys45 por Ala, RB302) foram construídas, sendo mais sensíveis a peróxido de hidrogênio que a linhagem selvagem PA14, como verificado pelo halo de inibição de crescimento. A atividade peroxidásica de LsfA foi medida *in vitro* pelo ensaio de tiocianato férrico e apenas a proteína com a sequência selvagem foi ativa, enquanto uma mutação na Cys45 aboliu completamente a sua atividade. Infecção de macrófagos J774 com as linhagens Δ *lsfA* ou C45A resultaram em uma diminuição da morte dos macrófagos, aumento do *clearance* bacteriano e aumento da secreção de TNF- α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem PA14, sugerindo uma maior ativação das vias do NF- κ B e das MAPKs nos macrófagos infectados com as linhagens mutantes. Para verificar se LsfA poderia alterar o estado oxidativo dos macrófagos, eles foram infectados com as linhagens PA14 ou RB302 (C45A) e incubadas com

carbóxi-H₂DCFDA, um indicador que se torna fluorescente quando oxidado. Macrófagos infectados com a linhagem mutante demonstraram um maior estado oxidativo em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem, confirmando que LsfA limita a ativação dos macrófagos, resultando numa menor produção de TNF- α e diminuição da citotoxicidade. A via das MAPKs e do NF- κ B são requeridos para a produção máxima de TNF- α nos macrófagos infectados com a linhagem RB302, o que foi demonstrado utilizando-se de inibidores farmacológicos para essas vias. Como esperado, quando os macrófagos foram infectados com a linhagem RB302 na presença do antioxidante N-acetil-cisteína, houve uma redução da produção de TNF- α a níveis semelhantes dos macrófagos infectados com a linhagem selvagem. Em modelo de pneumonia aguda, todos os camundongos infectados com a linhagem PA14 morreram 48h pós-infecção, enquanto os camundongos infectados com a linhagem RB302 sobreviveram por mais de 60 dias após a infecção. Houve uma redução do número de bactérias nos pulmões, baço e fígado nos camundongos infectados com a linhagem RB302 em comparação aos camundongos infectados com a linhagem PA14. Também foi observado um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias nos camundongos infectados com a linhagem RB302 em comparação aos camundongos infectados com PA14. Com isso, foi demonstrado pela primeira vez o envolvimento de uma 1-Cys peroxirredoxina de bactérias na virulência, com a modulação da resposta imune do hospedeiro *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: peroxirredoxina, macrófagos, pneumonia, *Pseudomonas aeruginosa*, virulência, imunidade inata

ABSTRACT

Kaihami, G.H. **Involvement of peroxiredoxin LsfA in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa***. Masters Thesis -- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bacteria are recognized by macrophages via Toll-Like Receptors (TLR), leading to a signaling pathway that activates NF- κ B and MAPKs. Killing in phagosomes is achieved by reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) generation. *P. aeruginosa* is a common cause of ventilator associated pneumonia and it uses several strategies for virulence and defense, including antioxidant mechanisms. In this work, we show for the first time that the 1-Cys peroxiredoxin LsfA is implicated in *P. aeruginosa* virulence. Mutant strains with a deletion in *LsfA* or with a mutation (Cys45 to Ala, RB302) were constructed and they were more sensitive to H₂O₂ than the wild type strain PA14, as verified by a growth inhibition assay. *In vitro* peroxidasic activity of LsfA was measured by ferric-thiocyanate assay, and while the wild-type protein was active, the mutation in Cys45 abolished its activity. Infection of J774 macrophages with Δ *LsfA* or C45A strains resulted in lower cell death, increased bacterial clearance and higher TNF- α production in comparison to PA14-infected macrophages, suggesting a higher level of MAPKs and NF- κ B activation due to the mutant strains. To verify whether LsfA could modify the oxidative state of infected macrophages, they were infected with PA14 or RB302 strains and incubated with carboxy-H₂DCFDA, an indicator that emits fluorescence when oxidized. Macrophages infected with mutant strains showed a higher oxidative state in comparison to PA14-infected cells, thus confirming that LsfA limits macrophages activation that leads to TNF- α production and cytotoxic activity. MAPKs and NF- κ B

pathways are required to full production of TNF- α in macrophages infected with RB302, as shown using pharmacological inhibitors for those pathways. When macrophages were infected with RB302 in the presence of the antioxidant N-acetylcysteine, there was a reduction in TNF- α production as compared to PA14, as expected. In an acute pneumonia model, all PA14-infected mice died at 48h post-infection, while C45A-infected mice survived as long as 60 days. There was also reduction in bacterial counts in the lungs, spleen and liver of mice infected with RB302, in comparison to PA14-infected mice. A greater pro-inflammatory cytokine production was observed in mice infected with mutant strain in comparison to mice infected with PA14. Altogether, this work shows for the first time the role of a bacterial 1-Cys Prx that modulates host immune response *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Peroxiredoxin, macrophages, pneumonia, *Pseudomonas aeruginosa*, virulence, innate immunity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Abs</i>	<i>Absorbância</i>
<i>ADPRT</i>	<i>ADP ribosiltransferase</i>
<i>AIDS</i>	<i>Síndrome da imunodeficiência adquirida</i>
<i>Ap</i>	<i>Ampicilina</i>
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>c-di-GMP</i>	<i>bis(3'5') monofosfato de diguanosina cíclico</i>
<i>CysP</i>	<i>Cisteína Peroxidásica</i>
<i>CysR</i>	<i>Cisteína de Resolução</i>
<i>D.O.</i>	<i>Densidade óptica</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>FMO</i>	<i>Fluorescence-Minus-One</i>
<i>GAP</i>	<i>GTPase-activating protein</i>
<i>HAP</i>	<i>Pneumonia adquirida em hospitais</i>
<i>IgG</i>	<i>Imunoglobulina G</i>
<i>IkB</i>	<i>Inibidor do kappa B</i>
<i>IPTG</i>	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
<i>Km</i>	<i>Canamicina</i>
<i>LB</i>	<i>Luria Broth</i>
<i>LDH</i>	<i>Lactato desidrogenase</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolissacarídeo</i>
<i>MAPKs</i>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<i>MIP-2</i>	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
<i>MOI</i>	<i>Multiplicidade de infecção</i>

<i>MYSTIC</i>	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Information Collection</i>
<i>NAC</i>	<i>N-acetilcisteína</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Fator nuclear kappa B</i>
<i>PAMPs</i>	<i>Padrões moleculares associados a patógenos</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PMN</i>	<i>Polimorfonucleares</i>
<i>PMSF</i>	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
<i>PRR</i>	<i>Receptores de reconhecimento padrão</i>
<i>Prxs</i>	<i>Peroxirredoxinas</i>
<i>QS</i>	<i>Quorum sensing</i>
<i>RNS</i>	<i>Espécies reativas de nitrogênio</i>
<i>ROS</i>	<i>Espécies reativas de oxigênio</i>
<i>SDS-PAGE:</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
<i>SFB</i>	<i>Soro Fetal Bovino</i>
<i>SPF:</i>	<i>Specific Pathogen Free</i>
<i>TAK-1</i>	<i>TGF-β activated kinase 1</i>
<i>TLR</i>	<i>Receptores do tipo Toll</i>
<i>TTSS</i>	<i>Type III secretion system</i>
<i>VAP</i>	<i>Pneumonia associada à ventilação mecânica</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. O arsenal microbicida dos fagócitos contra os mecanismos de defesa dos microrganismos.....	23
Figura 2. Via de transdução de sinal dos receptores do tipo Toll (TLR).....	25
Figura 3. ROS podem aumentar a ativação da via das MAPKs.....	27
Figura 4. Mecanismo de reação das peroxirredoxinas.....	30
Figura 5. Gel representativo da amostra PA14/pJSG39.....	53
Figura 6. LsfA pertence à subfamília Prx6 das peroxirredoxinas.....	56
Figura 7. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	57
Figura 8. LsfA apresenta atividade peroxidásica frente a peróxido de hidrogênio.....	58
Figura 9. A falta de LsfA ou a cisteína peroxidásica resulta em uma maior sensibilidade a H ₂ O.....	60
Figura 10. LsfA é importante para a resistência ao <i>clearance</i> mediado por macrófagos <i>in vitro</i>	62
Figura 11. Mutantes em LsfA apresentam uma redução de citotoxicidade frente a macrófagos <i>in vitro</i>	63
Figura 12. LsfA reduz a secreção de TNF- α pelos macrófagos <i>in vitro</i>	65
Figura 13. LsfA regula o estado oxidativo dos macrófagos durante a infecção <i>in vitro</i>	67
Figura 14. LsfA reduz a ativação do NF- κ B, p38 e ERK1/2.....	70
Figura 15. LsfA é importante para a virulência <i>in vivo</i>	72
Figura 16. LsfA é importante para a sobrevivência de <i>P. aeruginosa</i> durante a infecção.....	73
Figura 17. LsfA induz uma imunossupressão local.....	76
Figura 18. LsfA reduz o recrutamento de neutrófilos e macrófagos aos pulmões.....	78
Tabela 1. Linhagens e plasmídeos.....	36
Tabela 2 Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	37
Tabela 3. “Spots” identificados no gel bidimensional comparando-se as linhagens PA14/pJSG e PA14/pJSG39.....	54

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.2. Infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i>	19
1.3. Respostas do hospedeiro frente à infecção por <i>P. aeruginosa</i>	22
1.4. Peroxirredoxinas microbianas	28
2. Objetivos	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo	35
3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular	35
3.3. Análise proteômica	37
3.3.1. Extração de proteínas	37
3.3.2. Focalização isoeletrica (1ª dimensão) e SDS-PAGE (2ª dimensão)	38
3.3.3. Análise de imagem e identificação dos spots	38
3.4. Construção do mutante não polar e mutação sítio dirigida	39
3.5. Análise de homologia da proteína LsfA com proteínas pertencentes a subfamília Prx6.	41
3.6. Expressão e purificação das proteínas recombinantes	42
3.6.1. Construção dos plasmídeos	42
3.6.2. Expressão das proteínas recombinantes	42
3.6.3. Purificação das proteínas recombinantes	43
3.6.4. Determinação da concentração proteica	44
3.7. Determinação da atividade peroxidásica	44
3.8. Ensaio de halo de inibição de crescimento	45
3.9. Ensaios de infecção <i>in vitro</i>	46
3.9.1. Cultura dos macrófagos	46
3.9.2. Ensaios de <i>clearance</i> bacteriano	46
3.9.3. Ensaios de citotoxicidade	46
3.9.4. Avaliação da secreção de TNF- α	47
3.9.5. Avaliação do estado oxidativo	47
3.10 Ensaios de infecção <i>in vivo</i>	48
3.10.1 Animais	48
3.10.2. Infecção intra-traqueal	48

3.10.3. Sobrevivência	49
3.10.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônia nos órgãos após infecção	50
3.10.5. Quantificação das citocinas do pulmão	50
3.10.6. Imunofenotipagem pulmonar.....	50
4. Resultados e Discussão.....	52
4.1. Detecção de LsfA no proteoma da linhagem PA14.	52
4.2. Caracterização da 1-Cys peroxirredoxina LsfA.....	54
4.2.1. LsfA é uma peroxirredoxina da família Prx6.....	54
4.2.2. Atividade peroxidásica de LsfA in vitro.....	56
4.2.3 LsfA é importante na resistência ao peróxido de hidrogênio	58
4.3. Envolvimento de LsfA na virulência de <i>P. aeruginosa</i>	60
4.3.1. LsfA é importante para a sobrevivência da bactéria frente a macrófagos	61
4.3.2 A ausência de LsfA ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias	64
4.3.3. LsfA reduz o estado oxidativo dos macrófagos	66
4.4.4 LsfA reduz a ativação do NF- κ B e das MAPKs	68
4.4.5. LsfA é importante para a virulência <i>in vivo</i>	70
4.4.6 LsfA aumenta a sobrevivência de <i>P. aeruginosa</i> durante a infecção <i>in vivo</i>	72
4.4.7. LsfA reduz a produção de citocinas no pulmão	74
4.4.8. LsfA reduz o recrutamento de células do sistema imune	76
5. Conclusões	79
6. Referências Bibliográficas	81
7. Anexo.....	92
8. SÚMULA CURRICULAR.....	93

1. Introdução

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama que habita a água e o solo e, sendo encontrada em associação com plantas e animais, pode se comportar como um patógeno oportunista. A capacidade de metabolizar fontes alternativas de carbono e nitrogênio e de crescer tanto aeróbica quanto anaerobicamente permite que esta bactéria cresça em diversos ambientes e se adapte a diferentes nichos, refletindo seu vasto repertório genético. Em humanos, *P. aeruginosa* é frequentemente associada a infecções oportunistas em pacientes sob quimioterapia, portadores de AIDS, de fibrose cística, ou com queimaduras graves, sendo responsável também por infecções respiratórias, gastrointestinais e do trato urinário, além de ceratite, otite média e bacteremia (Lyczak *et al.*, 2000, Wagner & Iglewski, 2008).

As infecções por *P. aeruginosa* são geralmente de difícil tratamento utilizando-se de antibioticoterapias convencionais, pois esta bactéria é intrinsecamente resistente a muitos desses fármacos, principalmente pela presença de diversas bombas de membrana e à aquisição de mecanismos de resistência a antibióticos (Mutlu & Wunderink, 2006, Wolfgang *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2006, Westbrook-Wadman S, 1999, Cao *et al.*, 2001, Lyczak *et al.*, 2000, Van Delden & Iglewski, 1998, Wiehlmann *et al.*, 2007). A persistência de formas tolerantes a antibióticos também contribui para sua difícil erradicação (Drenkard, 2003).

Recentemente, tem se buscado por novas drogas anti-infectivas, em contraponto a drogas bactericidas e bacteriostáticas, supondo-se que essas drogas não causem uma pressão seletiva que leve à aquisição de resistência do patógeno e tendo como alvo a inibição de fatores envolvidos com sua virulência, ao invés da sobrevivência (Wiehlmann et al., 2007, Lesic *et al.*, 2007). Para que essa busca tenha sucesso e novas drogas contra alvos específicos possam ser planejadas racionalmente, os mecanismos responsáveis pela patogenicidade precisam ser entendidos em detalhes. Assim, torna-se cada vez mais relevante a busca por estratégias alternativas de tratamento contra *P. aeruginosa*, com interesse crescente de vários grupos de pesquisa, tanto básica quanto aplicada, na compreensão de seus mecanismos de adaptação e de patogenicidade.

Em *P. aeruginosa*, a expressão de muitos fatores de virulência é controlada de uma maneira dependente de densidade celular, num processo denominado percepção de quorum ou *quorum sensing* (QS) (Girard & Bloemberg, 2008). A piocianina, por exemplo, é uma fenazina que pode oxidar outras moléculas, cuja produção é regulada positivamente por mecanismos de QS.

Para entender o papel que a piocianina pode desempenhar na virulência, estudos *in vitro* utilizando-se de linhagens celulares em contato com a piocianina purificada foram realizados por diversos autores. Nestes estudos, foi observado que a piocianina é capaz de inibir a respiração celular, a função ciliar, o crescimento celular e a liberação de prostaciclina, além de interferir na homeostase do cálcio. (Sorensen & Klinger, 1987, Kamath *et al.*, 1995, Denning *et al.*, 1998). Linhagens de *P. aeruginosa* deficientes na produção de piocianina apresentam uma menor capacidade de matar os neutrófilos em comparação à linhagem selvagem (Usher *et al.*, 2002, Prince *et al.*,

2008). A piocianina foi correlacionada com o aumento do estresse oxidativo pela inibição da catalase (O'Malley *et al.*, 2003), que induz um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na apoptose de neutrófilos *in vitro* (Usher *et al.*, 2002).

Por sua ubiquidade, virulência, facilidade de manutenção e disponibilidade de ferramentas para manipulação genética, *P. aeruginosa* é um importante modelo de estudo, com enfoque em diferentes temas e que empregam abordagens distintas. Os trabalhos com ênfase nos fatores de virulência em si, como toxinas, proteases, seus mecanismos de ação, estrutura e exportação via sistemas de secreção, além dos mecanismos de resistência a drogas e a regulação da expressão destes fatores, desdobraram-se em estudos de sistemas globais presentes também em outras bactérias, como o QS e a sinalização pelo segundo mensageiro bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) (Haussler, 2004, Bjarnsholt & Givskov, 2007, Juhas *et al.*, 2005, Jenal & Malone, 2006). Outra vertente bastante explorada é o crescimento em forma de biofilme, resultado de um padrão de expressão gênica particular, responsável pela diferenciação das células de uma população e pela manutenção de estruturas multicelulares tridimensionais típicas, que favorecem a colonização de superfícies bióticas e abióticas (Kirisits & Parsek, 2006). Todos esses aspectos estão interligados, pois a expressão de fatores de virulência e formação de biofilme é regida pela rede de percepção de quorum, e o c-di-GMP também está implicado na diferenciação entre a forma sésil e planctônica das células. Essa diferenciação também tem papel no resultado das infecções por *P. aeruginosa*, sendo a forma persistente encontrada nas infecções crônicas similar ao crescimento em biofilmes, enquanto as células responsáveis pelas infecções agudas têm um padrão de expressão mais similar ao das

células móveis, planctônicas (Haussler, 2004, Schuster & Greenberg, 2006, Bjarnsholt & Givskov, 2007, Juhas et al., 2005, Jenal & Malone, 2006).

Como outras bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* utiliza o sistema de secreção do tipo III (TTSS, de *type III secretion system*) como determinante de patogenicidade em animais e plantas. O TTSS é composto por uma estrutura macromolecular em forma de agulha que atravessa a membrana da bactéria, através da qual são translocadas as proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira. O acesso dessas proteínas ao interior da célula hospedeira é possível após a perfuração da membrana celular, mediada por uma estrutura em forma de poro. Em *P. aeruginosa*, foram identificadas apenas quatro moléculas efetoras do TTSS, as exotoxinas S (ExoS), ExoT, ExoU, e ExoY. A linhagem PA14, objeto de estudo deste trabalho, expressa somente ExoT, ExoU, e ExoY que são, respectivamente, uma enzima bifuncional com domínio GAP (GTPase-activating protein) e ADPRT (ADP ribosiltransferase), uma fosfolipase e uma adenilato ciclase. Essas exotoxinas são capazes de iniciar um evento inflamatório, levando a morte da célula do hospedeiro por apoptose ou necrose (Barbieri 2004, Sato 2004).

1.2. Infecção pulmonar por *P. aeruginosa*

Dentre todos os sítios de infecção por *P. aeruginosa*, as infecções pulmonares são associadas às maiores taxas de mortalidade, sendo uma causa frequente na pneumonia associada à ventilação mecânica (VAP). A incidência de pneumonia adquirida em hospitais (HAP) causada por *P. aeruginosa* quase dobrou, passando de 9,6% para 18,1% entre 1975 a 2003 (Gaynes & Edwards, 2005). *P. aeruginosa* está

associada a uma alta mortalidade de 32-42,8% nesses pacientes, mesmo nos que recebem terapia antimicrobiana adequada (Crouch Brewer *et al.*, 1996). A pneumonia causada por *P. aeruginosa* em portadores de fibrose cística também merece atenção, por causar grande morbidade e mortalidade nesses pacientes (Williams *et al.*, 2010).

No Brasil, em um estudo da quarta edição do programa brasileiro MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Information Collection), *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais prevalente entre os 1550 isolados estudados, estando presente em 30,3% dos casos (Kiffer *et al.*, 2005). Existem poucos estudos epidemiológicos sobre VAP no Brasil, porém em um estudo conduzido em 99 hospitais brasileiros, a pneumonia nosocomial foi responsável por 28,9% de todas as infecções nosocomiais, sendo que 50% dessas estavam relacionadas à ventilação mecânica (Teixeira *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são os microrganismos mais frequentemente isolados de pacientes na unidade de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (Pires *et al.*, 2009). Neste estudo, *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais frequente, presente em 26% dos isolados clínicos, sendo que dentre os 182 casos de *P. aeruginosa*, 55% eram provenientes de amostras respiratórias (Pires *et al.*, 2009).

A pneumonia causada por *P. aeruginosa*, devido a sua alta taxa de mortalidade e dificuldade de tratamento, apresenta um alto custo para o seu tratamento, que inclui procedimentos diagnósticos, medicamentos e estadia em unidades de tratamento intensivo, gerando um gasto médio por paciente de US\$24.700 por 45 dias de hospitalização nos Estados Unidos (Bou *et al.*, 2009).

A primeira linha de defesa contra *P. aeruginosa* no pulmão são os macrófagos pulmonares residentes. Dados contraditórios foram reportados sobre a importância dos

macrófagos para uma resposta protetora na pneumonia aguda causada por *P. aeruginosa*. Quando os macrófagos pulmonares foram depletados utilizando-se lipossomos contendo clodronato, por aerossol, foi reportado um decréscimo no recrutamento inicial de neutrófilos e na produção de quimiocinas (Kooguchi *et al.*, 1998). Este tratamento resultou em uma alveolite neutrofílica persistente, com uma redução do *clearance* bacteriano após 48 horas, sugerindo a importância dos macrófagos para coordenar uma resposta imune inata contra *P. aeruginosa*. Entretanto, em outro estudo foi reportado que a depleção dos macrófagos pulmonares, usando a administração de lipossomos contendo clodronato via intranasal, não resultou em diferença significativa na sobrevivência dos animais ou no *clearance* bacteriano dos camundongos infectados com *P. aeruginosa*, em comparação ao grupo controle (Cheung *et al.*, 2000). Esses dados contraditórios do trabalho de Cheung *et al.* (Cheung *et al.*, 2000) podem ser explicados pelos macrófagos alveolares residuais apresentarem uma alta concentração (12 a 23%), o que pode justificar a falta dos efeitos associados à completa depleção desse tipo celular. Também já foi reportado que a depleção de macrófagos utilizando-se a administração intraperitoneal de lipossomos contendo clodronato, 48 horas antes da infecção, não altera a severidade da bacteremia ou a sobrevivência dos camundongos, porém há uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma, como o TNF- α e a quimiocina MIP-2 (macrophage inflammatory protein) (Fujimoto *et al.*, 2002).

No estudo de Morissette e colaboradores (Morissette *et al.*, 1996), não houve diferenças na habilidade dos macrófagos pulmonares de camundongos sensíveis ou resistentes a *P. aeruginosa*, em fagocitar e matar as bactérias. Entretanto, houve uma

maior produção de TNF- α pelos macrófagos pulmonares dos camundongos resistentes à infecção em comparação aos macrófagos pulmonares dos camundongos sensíveis a infecção (Morissette et al., 1996). Esse estudo confirma observações anteriores (Dunkley *et al.*, 1995), em que os macrófagos pulmonares devem atuar principalmente como produtores de citocinas, e não como células bactericidas. Corroborando essa hipótese, nos camundongos suscetíveis à infecção por *P. aeruginosa*, ocorre um atraso no recrutamento de PMN, como os neutrófilos. Quando TNF- α foi administrado aos camundongos suscetíveis à infecção, uma resposta inflamatória comparável aos níveis dos camundongos resistentes foi observada, sendo o número de PMN semelhantes aos animais resistentes à infecção (Morissette et al., 1996). Assim, o atraso no recrutamento de PMN nos animais suscetíveis foi atribuído à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , nesses animais, e não a atuação primária dos macrófagos como células fagocitárias.

1.3. Respostas do hospedeiro frente à infecção por *P. aeruginosa*

Os macrófagos são capazes de reconhecer as bactérias por duas vias distintas: diretamente, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como carboidratos, peptidoglicanas ou lipoproteínas, através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs). Na via indireta, o reconhecimento se dá por opsoninas, que têm como alvo antígenos específicos, destacando-se fatores como a imunoglobulina G (IgG) e componentes do sistema complemento. Uma vez que a opsonina se liga a um antígeno na superfície do patógeno, o processo de fagocitose é facilitado, devido a uma mudança conformacional

reconhecida por receptores fagocíticos, como o receptor $Fc\gamma$ ($Fc\gamma Rs$) e o receptor de complemento 3 (CR3).

Com a fagocitose, ocorre a formação do fagossomo, que adquire um grande arsenal antimicrobiano durante sua maturação, destacando-se a acidificação, presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos e a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) (**Figura 1**).

Figura 1. O arsenal microbicida dos fagócitos contra os mecanismos de defesa dos microrganismos. Os mecanismos microbicidas do hospedeiro incluem a NADPH oxidase (produtora de ROS), “scavengers” e exportadores, como lactoferrina, que sequestra o ferro do meio, e a presença de peptídeos antimicrobianos e proteínas que permeabilizam e degradam a bactéria (**a**). Os mecanismos de defesa da bactéria incluem modificações na superfície para resistir ou degradar os peptídeos antimicrobianos, a expressão de enzimas, como a catalase, que converte as espécies reativas de oxigênio (ROS) em espécies menos prejudiciais, ou prevenindo o recrutamento de complexos proteicos que são capazes de sintetizar espécies reativas de nitrogênio (RNS) ou ROS (**b**). Retirado de (Flannagan et al., 2009)

O reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato baseia-se na detecção de PAMPs pelos respectivos PRRs. A ativação de quase todos os TLRs, com exceção do TLR-3, é dependente da proteína adaptadora MyD88. A ativação da via dos TLRs dependente de MyD88 resulta na ativação da TAK-1 (TGF- β activated kinase 1), que por sua vez irá culminar na ativação do NF- κ B e das MAPKs (Kawai & Akira, 2010) (**Figura 2**). O NF- κ B ativo é translocado para o núcleo e ativa genes que codificam TNF- α , IL-1 e IL-6. Assim como o NF- κ B, a ativação das MAPKs, como p38, JNK1/2 e ERK1/2, irá promover a ativação do sistema imune pela expressão de genes pró-inflamatórios.

Na infecção por *P. aeruginosa*, os principais PAMPs são a flagelina e o LPS, reconhecidos por TLR-5 e TLR-4, respectivamente (Raoust *et al.*, 2009). A participação desses receptores na imunidade contra *P. aeruginosa* já foi comprovada *in vivo*, na qual camundongos que não expressam TLR4/5 apresentam uma maior susceptibilidade à infecção pulmonar, demonstrando a importância desses receptores para o controle da bactéria durante a infecção (Ramphal *et al.*, 2008, Feuillet *et al.*, 2006). As interações dos TLRs com o respectivo PAMPs resultam em uma transdução de sinal que resulta na produção de produtos antimicrobianos, como descrito acima.

As espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas durante o *burst* oxidativo (descrito abaixo), participam ativamente do controle da infecção. Elas exercem um papel bactericida, pela oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, culminando na morte do patógeno. Além desse efeito microbicida, ROS estão envolvidas na ativação de diversas vias de transdução de sinal, atuando como ativadores primários ou como segundos mensageiros.

Figura 2. Via de transdução de sinal dos receptores do tipo Toll (TLR). A estimulação dos receptores TLR promove a ativação da TRAF6, que promove a sua própria ubiquitinação facilitando o recrutamento e a ativação do complexo TAB-TAK1. A TAK1 ativa pode fosforilar o complexo IKK, ativando-o. IKK pode então fosforilar o IκB possibilitando a translocação do NF-κB para o núcleo. IKK pode fosforilar p105, culminando na sua degradação e subsequente liberação da Tpl2 ativa, a qual irá ativar a ERK1/2. A TAK1 pode ativar a p38 e a JNK pela ativação das MKK3, 4 e 6. A via das MAPKs ativam diversos fatores de transcrição que funcionam junto com o NF-κB, induzindo a expressão de uma grande variedade de genes que codificam as citocinas TNF-α, IL-6 e IL-1. A via das MAPKs podem regular também o transporte e a estabilização dos transcritos. Retirado de (Moynagh, 2009)

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na ativação do NF-κB. Um modelo proposto, em que células estimuladas com dsRNA (RNA dupla fita), TNF-α, éster de forbol, LPS, entre outros, tiveram um aumento da ativação do NF-κB, sendo esse efeito reduzido quando antioxidantes, como N-acetilcisteína, eram administrados, indicando que a geração de ROS a partir dos estímulos é capaz de ativar o NF-κB (Schreck *et al.*, 1991).

Estudos posteriores demonstraram que a ação da catalase, ou a depleção de ferro ou do radical hidroxila bloqueiam a ativação do NF- κ B, sugerindo a importância de ROS como um segundo mensageiro nesse processo (Chen *et al.*, 1998, Kang *et al.*, 2000a, Kang *et al.*, 2001). O exato mecanismo de como ROS ativa a via do NF- κ B não está completamente elucidada, porém foi demonstrado que a sílica, que induz a produção de ROS, é capaz de induzir a fosforilação do I κ B (inibidor do NF- κ B) e sua posterior degradação, resultando na ativação do NF- κ B em macrófagos de camundongos (Kang *et al.*, 2000b)

O aumento na concentração de ROS pode apontar também para um papel dessas espécies como um mensageiro secundário para as vias das MAPKs. Estudos já demonstraram o direto envolvimento de ROS para ativação de ERK (Irani & Goldschmidt-Clermont, 1998), JNK (Adler *et al.*, 1999) e p38 (Ding *et al.*, 2001). Apesar dos efeitos causados pelo aumento de ROS intracelular, com o aumento da atividade das MAPKs e, conseqüentemente, com a maior produção de citocinas pró-inflamatórias estarem bem estabelecidos (**Figura 3**), os mecanismos pelos quais as espécies reativas de oxigênio culminam na ativação dessas vias não estão bem estabelecidos.

Muitos patógenos conseguem sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro, por desenvolverem estratégias que impedem seu reconhecimento pelo sistema imune, dificultam a fagocitose e inibem a maturação do fagossomo (**Figura 1**). *P. aeruginosa* é capaz de inibir a fagocitose via a exotoxina ExoT, que exibe um domínio GAP, cuja ação compromete a maquinaria fagocítica de macrófagos e neutrófilos (Garrity-Ryan *et al.*, 2000).

Figura 3. ROS podem aumentar a ativação da via das MAPKs. O aumento da concentração intracelular de ROS culmina na ativação das MAPKs ERK, p38 e JNK, que uma vez ativadas aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Esse efeito pode ser pelo aumento da expressão dos genes via ativação da AP-1, estabilização do mRNA, pela exporte nuclear do mRNA. Retirado de (Gwinn & Vallyathan, 2006)

Para sobreviver à diminuição do pH do fagolisossomo, algumas bactérias desenvolveram vias metabólicas que evitam o acúmulo de ácido ou adquiriram proteínas únicas para suportar o baixo pH (Park *et al.*, 1996, Vandal *et al.*, 2008). Ainda outras bactérias protegem-se degradando ativamente os peptídeos antimicrobianos ou blindando-se destes e de proteínas produzidas pelos fagócitos (Peschel *et al.*, 2001, Stinavage *et al.*, 1989, Trent *et al.*, 2001).

A principal linha de defesa contra os microrganismos é a produção de ROS pelos macrófagos e neutrófilos. Esse processo é conhecido como *burst* oxidativo, ou *burst*

respiratório. O *burst* oxidativo depende da ativação da NADPH oxidase, que irá originar o ânion superóxido. Os TLRs podem ativar diretamente a NADPH oxidase, resultando na produção de ROS e na expressão de citocinas numa maneira dependente da ativação da NADPH oxidase (Pawate *et al.*, 2004). Para se proteger da produção de ROS dos macrófagos e neutrófilos, diversos patógenos apresentam um complexo sistema de detoxificação dessas espécies reativas. Dentre eles, destacam-se as catalases, as superóxido dismutases (SOD) e as peroxirredoxinas. SOD e catalase são os dois sistemas melhor estudados. A SOD é capaz de degradar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a catalase decompõe o H_2O_2 em água e O_2 . Ambas as classes de enzimas são importantes para a virulência de diversos patógenos, incluindo *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2005, Iiyama *et al.*, 2007). As peroxirredoxinas são outra classe de enzimas fundamentais para a detoxificação de ROS nas bactérias patogênicas e seu mecanismo de ação e o envolvimento na patogenicidade será descrito com maiores detalhes abaixo.

1.4. Peroxirredoxinas microbianas

Além da SOD e das catalases, as peroxirredoxinas (Prxs) são enzimas que exercem uma importante função antioxidante devido a sua atividade peroxidásica ($ROOH + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$), reduzindo peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, e uma vasta gama de hidroperóxidos orgânicos (Christman *et al.*, 1985, Bryk *et al.*, 2000, Atichartpongkul *et al.*, 2010). As Prxs são amplamente encontradas em leveduras, plantas, animais, protozoários e na maior parte, se não em todas, as bactérias e arqueia, indicando o seu importante papel fisiológico para a manutenção da vida.

As Prxs podem ser divididas em duas principais classes, de acordo com o número de resíduos de cisteína envolvidos na catálise, as 2-Cys peroxirredoxinas, que apresentam dois resíduos de cisteína envolvidos na catálise, e as 1-Cys peroxirredoxinas com apenas um resíduo de cisteína catalítico. Inicialmente, a cisteína peroxidásica (CysP) é atacada por um hidroperóxido, resultando na oxidação do ânion tiolato da cisteína (Cys-S⁻) a ácido sulfênico (Cys-SOH). O modo como a CysP oxidada é então reduzida diferencia as três grandes famílias das peroxirredoxinas, que compreendem as 2-Cys peroxirredoxinas típicas, 2-Cys peroxirredoxinas atípicas e as 1-Cys peroxirredoxinas (**Figura 4**).

As 2-Cys Prxs típicas apresentam duas cisteínas ativas, a CysP geralmente no N-terminal e a cisteína de resolução (CysR) localizada próxima do C-terminal. Essas são homodímeros obrigatórios, contendo dois sítios ativos idênticos (Hirotsu *et al.*, 1999, Schroder *et al.*, 2000, Alphey *et al.*, 2000, Wood *et al.*, 2002). Após a oxidação da CysP a ácido sulfênico, ocorre o ataque da CysR da outra subunidade a esse resíduo oxidado, resultando na formação de uma ligação dissulfeto intersubunidades, que é então reduzida por uma das diversas oxidoredutases de dissulfeto, como a tiorredoxina, AhpF ou AhpD, completando o ciclo catalítico (**Figura 4 A**) (Poole *et al.*, 2000, Bryk *et al.*, 2002).

Figura 4. Mecanismo de reação das peroxirredoxinas. 2-Cys peroxirredoxina típica **(A)**, 2-Cys peroxirredoxina atípica **(B)**, e 1-Cys peroxirredoxina **(C)**.

A 2-Cys Prxs atípicas apresentam o mesmo mecanismo de catálise que a 2-Cys Prxs típicas, porém elas são funcionais em monômeros e apresentam a CysP e a CysR na mesma cadeia polipeptídica (Seo *et al.*, 2000, Declercq *et al.*, 2001). Com isso, o ataque da CysR à CysP oxidada resulta na formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular (**Figura 4B**). Para reduzir a ponte de dissulfeto, aparentemente a tiorredoxina age como o agente doador de elétrons (Seo *et al.*, 2000).

As 1-Cys Prxs possuem somente a cisteína peroxidásica, não contendo a CysR (Choi *et al.*, 1998). Apesar da identidade do seu real par redox não ser geralmente conhecida, a cisteína oxidada gerada da reação com peróxidos é reduzida por compostos contendo tióis ou outros grupos antioxidantes como doadores de elétrons. Alguns compostos, como glutathiona, ácido lipóico, ciclofilina e ascorbato são candidatos a esse papel, tendo alguns deles suporte experimental (Manevich *et al.*, 2004, Ralat *et al.*, 2008, Peshenko & Shichi, 2001, Fisher *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2001, Monteiro *et al.*, 2007).

Diferentes estratégias de classificação das Prxs já foram utilizadas, resultando em divisões compreendendo de quatro a sete subfamílias (Hofmann *et al.*, 2002, Karplus & Hall, 2007, Knoop *et al.*, 2007, Cha *et al.*, 2007, Copley *et al.*, 2004, Hall *et al.*, 2011, Mizohata *et al.*, 2005, Rouhier & Jacquot, 2005, Sarma *et al.*, 2005). A classificação mais recente foi proposta por Nelson e colaboradores (Nelson *et al.*, 2011), na qual são utilizadas as sequências conservadas próximas ao sítio ativo da enzima, promovendo uma classificação de acordo com o mecanismo de ação. A partir dessa classificação as peroxirredoxinas foram divididas em seis subfamílias (AhpC/Prx1, Prx6, Prx5, Tpx, BCP/PrxQ, e AhpE).

Diversos trabalhos demonstraram o papel das peroxirredoxinas na virulência de bactérias, principalmente a 2-Cys peroxirredoxina AhpC, já correlacionada com a virulência de diversas bactérias, incluindo *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium bovis* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, aparentemente ela não é essencial para a virulência de outras bactérias, como *Samonella enterica* serovar Typhimurium, *M. tuberculosis*, *Legionella pneumophila* e *Porphyromonas gingivalis* (LeBlanc *et al.*, 2006). Nas bactérias em que a falta de AhpC não foi correlacionada com a atenuação da

virulência, talvez ocorra um efeito compensatório que seria responsável pelo aumento da expressão de outras enzimas antioxidantes, como a catalase, como demonstrado em *E. coli* (Seaver & Imlay, 2001), *Staphylococcus aureus* (Mongkolsuk *et al.*, 2000, Cosgrove *et al.*, 2007), *Xanthomonas campestris* (Mongkolsuk *et al.*, 2000), entre outras bactérias.

P. aeruginosa apresenta pelo menos dez genes que codificam para peroxirredoxinas em seu genoma, incluindo AhpC (PA14_18690) e Tpx (PA14_31810), sendo que ambas já foram relacionadas a virulência em outras bactérias (LeBlanc *et al.*, 2006, Hu & Coates, 2009). Há poucos estudos cinéticos, estruturais ou sobre o envolvimento das peroxirredoxinas na virulência de *P. aeruginosa*.

Dentre as peroxirredoxinas de *P. aeruginosa*, apenas a 2-Cys peroxirredoxina Ohr já teve sua estrutura e atividade enzimática elucidadas. Aparentemente, Ohr não é necessária para a virulência de *P. aeruginosa* no modelo de virulência de *Caenorhabditis elegans* (Atichartpongkul *et al.*, 2010)

Das dez prováveis peroxirredoxinas de *P. aeruginosa*, apenas a peroxirredoxina denominada LsfA (PA14_19490) pode pertencer à classe das 1-Cys peroxirredoxinas. Estudos de transcriptoma de culturas crescendo na ausência de sulfato inorgânico como fonte de enxofre mostraram que a expressão de *lsfA* é induzida nessas condições, juntamente com um conjunto de genes de transporte e utilização de fontes orgânicas de enxofre. Porém, a função e atividade peroxidásica de LsfA não foram caracterizadas até o momento (Tralau *et al.*, 2007).

A família das 1-Cys peroxirredoxinas é a menos estudada dentre as enzimas antioxidantes. A maioria dos trabalhos aborda estudos cinéticos e estruturais dessas enzimas (Loumaye *et al.*, 2011, Pedrajas *et al.*, 2010, Monteiro *et al.*, 2007, Mizohata *et*

al., 2005, Li *et al.*, 2005, Sarma et al., 2005), mas sua função fisiológica é pouco explorada. Desta forma, há a necessidade de verificar se essa família apresenta um papel na virulência de patógenos bacterianos. Neste trabalho, foi demonstrada pela primeira vez a participação de uma 1-Cys peroxirredoxina bacteriana na virulência, utilizando-se modelos *in vitro* de macrófagos e modelo *in vivo* de pneumonia aguda em camundongos.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal verificar o envolvimento da 1-Cys peroxirredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

Objetivos específicos:

- Comprovar a atividade peroxidásica de LsfA.
- Obtenção dos mutantes em LsfA (mutante apolar e mutante pontual C45A).
- Verificar a importância de LsfA para a resistência de *P. aeruginosa* frente ao estresse oxidativo.
- Verificar se LsfA é importante para a sobrevivência da bactéria frente aos macrófagos.
- Verificar se LsfA influencia a ativação dos macrófagos e como isso ocorre.
- Verificar em modelo de pneumonia aguda em camundongos, se LsfA participa para a virulência de *P. aeruginosa*, e se há diferenças na carga bacteriana no órgão primário de infecção (pulmão) e secundários a infecção (baço e fígado) dos animais infectados com a linhagem selvagem ou a linhagem mutante C45A.
- Analisar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) nos pulmões dos camundongos infectados com a linhagem selvagem ou o mutante C45A.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens e plasmídeos utilizados estão listados na **Tabela 1**. Culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cultivadas rotineiramente em meio LB a 37°C acrescido de antibióticos, quando necessários, nas seguintes concentrações: ampicilina 100µg/mL, carbenicilina 350µg/mL, canamicina 50µg/mL (*E. coli*) e 250µg/mL (*P. aeruginosa*).

3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular.

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações, transformações e outras técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologia padrão, descritas em manuais de referência (Sambrook *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1996). DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de Chen e Kuo (Chen & Kuo, 1993).

Tabela 1. Linhagens e plasmídeos.

Linhagens/ plasmídeos	Características	Fonte ou referência
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Isolado clínico UCBPP-PA14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
RB301	PA14 com deleção em <i>lsfA</i>	Este trabalho
RB302	PA14 com mutação pontual em <i>lsfA</i> na Cys45Ala	Este trabalho
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	<i>prothirecA hsdR</i> ($r^{-}m^{+}$) $Tp^{r} Sm^{r} Km^{s}$ [Ω RP4-2-Tc::Um-Km::Tn7]	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
BL21(DE3)	F- <i>ompTgaldcm1on hsdS_b(r_b⁻m_b⁻)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	(Studier & Moffatt, 1986)
RB303	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carregando o plasmídeo pGHK005	Este trabalho
RB304	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carregando o plasmídeo pGHK006	Este trabalho
Macrófagos		
J774.A1	Linhagem celular de monócitos/macrófagos	(Ralph Snyderman, 1977)
Plasmídeos		
pGEM-T easy	Vetor de clonagem para produtos de PCR, Ap ^R	Promega
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	(Tsai & Alley, 2000)
pProEx HTa	Vetor de expressão. adiciona cauda de poli-histina na posição N-terminal do produto do gene clonado, Ap ^r	Invitrogen
pGHK001	Região de 729 pb a montante da região codificadora de <i>lsfA</i> clonado no vetor pGEM-T Easy	Este trabalho
pGHK002	Região de 799 pb a jusante da região codificadora de <i>lsfA</i> clonado no vetor pGEM-T Easy	Este trabalho
pGHK003	Região de 729 pb a montante e 799 pb a jusante da região codificadora de <i>lsfA</i> clonado no vetor pNPTS138	Este trabalho
pGHK004	Região de 2047 pb contendo a mutação pontual no gene <i>lsfAC45A</i> clonado no vetor pNPTS138	Este trabalho
pGHK005	Região codificadora de <i>lsfA</i> clonada no vetor pProEx HTa	Este trabalho
pGHK006	Região codificadora de <i>lsfAC45A</i> clonada no vetor pProEx HTa	Este trabalho

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência ^{1,2}	Utilização	Temp. Hibridização
Del_LsfA 1 <i>Hin</i> DIII	AAGCTT CACGTCGACCGGTTTTTC	Deleção de <i>lsfA</i>	60°C
Del_LsfA 1 <i>Bam</i> HI	GGATCC GATGTGCGCCGAGTCTGAGG		60°C
Del_LsfA 2 <i>Bam</i> HI	GGATCC TCGCTGAAGGACGAGGAAG	Deleção de <i>lsfA</i>	60°C
Del_LsfA 2 <i>Eco</i> RI	GAATTC GCGGAGCAGGAACAGGTA		60°C
LsfA_C45A left	ACCCCGGTG <u>GC</u> AACACCGAG	Mutação sítio dirigida em <i>lsfA</i>	60°C
LsfA_C45A right	CTCGGTGGT <u>TGC</u> ACCGGGGT		60°C
Overexp LsfA Left	GAATTC CTCAGACTCGGCGACATC	Amplificação da região codificadora de <i>lsfA</i>	60°C
Overexp LsfA Right	AAGCTT GACGAATCCGGCCTCAG		60°C

¹Os sítios de restrição inseridos nos produtos de PCR estão destacados em negrito.

²Os resíduos sublinhados indicam as bases trocadas para a geração da mutação sítio-dirigida

3.3. Análise proteômica

3.3.1. Extração de proteínas.

Para a obtenção dos extratos proteicos totais, as culturas bacterianas foram crescidas até $DO_{600nm}=1$, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 7000 *g* por 10 minutos a 4 °C, lavadas duas vezes com Tris-HCl pH 8 (primeiramente 100mM e depois 10mM) e suspensas em um tampão de lise (8M ureia, 2M tioureia, 2% CHAPS[3-[(3- colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato], 40mM DTT [Ditiotreitol] e 2% pharmalyte 3-10). As células foram rompidas por sonicação em banho de gelo, no Branson Sonifier 450 e o lisado foi centrifugado 40 minutos a 12000 *g* a 4°C por duas vezes, para separar a fração solúvel dos restos

celulares. A determinação da concentração proteica foi realizada através do reagente de Bradford (Sigma), utilizando o protocolo do fabricante e uma curva-padrão construída com soluções de albumina.

3.3.2. Focalização isoeétrica (1ª dimensão) e SDS-PAGE (2ª dimensão)

Amostras de proteínas (350 µg) foram ajustadas em 350 µL de tampão de solubilização (8M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS, 40mM DTT, 2% pharmalyte 3-10 e 10% glicerol), centrifugadas por 10 minutos a 12000 *g* e aplicadas sobre tiras de gel (Immobiline dry strips GE Healthcare) com gradiente de pH imobilizado não linear, variando de 3 a 10, e incubadas por 16 horas. A focalização isoeétrica foi realizada no IPGphor III em um gradiente de voltagem: aumento linear de 0 para 500 V por 500V/h, seguido de um aumento para 1000 V por 1000 V/h, e uma fase final de 8000 V por 32000 V/h. Após a focalização, as fitas foram equilibradas por 15 minutos em solução de equilíbrio A (6 M ureia, 29,3% glicerol, 2% SDS, 65 mM DTT) e mais 15 minutos em solução de equilíbrio B (6 M ureia, 29,3% glicerol, 2% SDS, 135 mM iodoacetamida). Após essas etapas, a segunda corrida foi realizada em géis de 12,5% poliacrilamida com corrente de aproximadamente 2 W por gel, por 16 horas. Os géis foram fixados por uma hora (40% etanol 10% ácido acético), corados por 16 horas com azul de Coomassie coloidal e descorados por 16 horas em água.

3.3.3. Análise de imagem e identificação dos spots.

Os géis foram analisados pelo software Delta 2D (Decodon). As comparações foram feitas em triplicatas biológicas, comparando a linhagem de interesse com a linhagem

selvagem. A identificação das proteínas diferencialmente expressas foram realizadas no serviço do Institut Armand-Frappier, INRS (*Institut National de la Recherche Scientifique*), Canadá, por HPLC/MS/MS.

3.4. Construção do mutante não polar e mutação sítio dirigida

A fim de se evitar efeitos polares nos genes adjacentes, o mutante RB301 foi construído com a deleção de 173 códon da porção codificadora de *lsfA*, mantendo-se a fase de leitura. Foi utilizada a estratégia de recombinação homóloga, amplificando regiões a montante e a jusante do gene a ser deletado e inserindo essa construção em um vetor suicida. Para a amplificação da região a montante e a jusante de *lsfA*, foram utilizados oligonucleotídeos contendo sítios de restrição na extremidade 5' dos iniciadores (**Tabela 2**). Após a amplificação, foram gerados produtos de 729 e 799 pares de bases, contendo os sítios de restrição 5' *HinDIII*-3' *BamHI* e 5' *BamHI*- 3' *EcoRI*, respectivamente, em suas extremidades. Esses fragmentos foram clonados separadamente no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), gerando os plasmídeos pGHK001 e pGHK002. As construções foram analisadas por digestão com as enzimas apropriadas e por sequenciamento, sendo obtidas sequências livres de erro para todas as amplificações. Esses plasmídeos foram digeridos com as devidas enzimas de restrição, os fragmentos de interesse isolados e ligados em uma mesma reação no plasmídeo pNPTS138 previamente digerido com as enzimas *HinDIII* e *EcoRI*, originando o plasmídeo pGHK003.

Foi construído um mutante com uma mutação sitio dirigida em *lsfA* do códon que codifica a cisteína 45 para um códon de alanina. Brevemente, foram feitas duas PCRs

utilizando-se o seguinte conjunto de oligonucleotídeos: Del_LsfA 1 *Hin*DIII/LsfA_C45A left e LsfA_C45A right/Del_LsfA 2 *Eco*RI (**Tabela 2**). Os fragmentos obtidos foram purificados e submetidos a uma nova PCR utilizando-se o par de oligonucleotídeos Del_LsfA 1 *Hin*DIII /Del_LsfA 2 *Eco*RI. O produto foi ligado ao pGEM-T Easy, gerando o plasmídeo pGEMLsfAC45Amut. A construção foi confirmada por digestão e por sequenciamento, sendo obtidas sequências livres de erro. Esse plasmídeo foi então digerido, o inserto isolado e ligado ao plasmídeo pNPTS138, como descrito acima, originando o plasmídeo pGHK004.

O plasmídeo pNPTS138 é replicativo em *E. coli* mas não em *Pseudomonas*, integrando-se no cromossomo por recombinação homóloga, tornando a célula resistente a canamicina. Além disso, apresenta o gene *sacB*, cujo produto metaboliza a sacarose a um produto tóxico para a célula, permitindo a seleção das colônias que integraram o plasmídeo (1ª recombinação, resistência a canamicina) e depois o perdem (2ª recombinação, resistência a sacarose e sensibilidade a canamicina).

Portanto, os plasmídeos pGHK003 e pGHK004 foram inseridos na cepa conjugativa de *E. coli* S17-1, e transferidos por conjugação para a linhagem parental *P. aeruginosa* PA14, sendo os transconjugantes selecionadas em meio LB com canamicina. A inserção do plasmídeo pNPTS138 no cromossomo de *P. aeruginosa* permitiu a seleção de colônias resistentes a canamicina e sensíveis a sacarose, indicando duas cópias do gene de interesse, uma completa e outra deletada/mutante .

As colônias resistentes a canamicina e sensíveis a sacarose foram crescidas a 37°C por 16 horas em meio LB. Nesta etapa, não foi adicionada canamicina ao meio, permitindo o segundo evento de recombinação, que consiste na saída do vetor pNPTS138 do cromossomo de *P. aeruginosa* carregando uma das cópias do gene de

interesse. Após o crescimento das bactérias, as células foram diluídas e plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 5% sacarose.

As colônias resistentes à sacarose foram repicadas e selecionadas em duas condições diferentes:

(1): LB-ágar + 5% sacarose

(2): LB-ágar + canamicina + 5% sacarose

As colônias que cresceram somente no meio 1 e não no meio 2 indicam o segundo evento de recombinação, com a perda do vetor pNPTS138. Essas colônias foram analisadas por PCR, a fim de confirmar a presença da cópia selvagem ou deletada/mutante no cromossomo. Para a confirmação do mutante sítio-dirigido C45A, o produto de PCR foi digerido com a enzima *Apa*LI, que digere apenas o gene selvagem. Os produtos de PCR resistentes a essa enzima foram posteriormente sequenciados, obtendo-se sequências livres de erro e contendo a troca de bases desejada.

3.5. Análise de homologia da proteína LsfA com proteínas pertencentes a subfamília Prx6.

Análises *in silico* foram realizadas buscando identificar a qual subfamília a peroxirredoxina LsfA melhor se enquadra. Para isso, a classificação de Nelson e colaboradores foi empregada (Nelson et al., 2011). Proteínas da subfamília Prx6 de *Burkholderia cepacia* 383 (gi: 78065379), *Plasmodium yoelii* (gi: 56967056), *Aeropyrum pernix* K1 (gi: 85543926) e humana (gi:85543926) foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e alinhadas com LsfA de *P. aeruginosa* PA14 (gi: 116051470), utilizando-se o programa ClustalW.

3.6. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

3.6.1. Construção dos plasmídeos

As regiões codificadoras de *LsfA* e do mutante *LsfAC45A* foram amplificadas a partir do DNA genômico de PA14 e do mutante RB302, respectivamente. Os fragmentos foram clonados em pGEM-T Easy e suas sequências foram confirmadas como descrito acima, gerando os plasmídeos pGEMsuperLsfA e pGEMsuperLsfAC45A. Esses plasmídeos foram digeridos e os insertos purificados e ligados ao plasmídeo pProEx-HTa (Invitrogen) previamente digerido, originando os plasmídeos pGHK005 e pGHK006, correspondente aos genes selvagem e com a mutação sítio dirigida, respectivamente. Os plasmídeos foram transformados na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) foi transformadas com os plasmídeos descritos acima, originando as linhagens RB303 (superexpressão de LsfA) e RB304 (superexpressão de LsfAC45A).

3.6.2. Expressão das proteínas recombinantes

As linhagens RB303 e RB304 foram incubadas em meio LB+Amp por 16 horas a 37°C. Após esse período, as bactérias foram diluídas em 250 mL de LB+Amp para uma $DO_{600nm} = 0,1$, mantendo a cultura sobre agitação constante a 37°C. Quando a cultura atingiu $DO_{600nm} \sim 0,5$, o meio foi suplementado com 0,6 mM IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) e a cultura foi mantida sob agitação a 30°C, por 6 horas. Após esse período, as bactérias foram coletadas por centrifugação e o precipitado foi mantido a -80°C até o uso.

As bactérias foram suspensas em 25 mL de tampão de lise (20 mM fosfato de sódio pH 7,4; 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM PMSF). As suspensões bacterianas foram submetidas a 5 ciclos de ultrasonicação de 15 segundos, seguido de 15 segundos de descanso em gelo. Após a lise, a suspensão foi centrifugada a 16000 x g por 20 minutos a 4°C, e a fração solúvel foi utilizado na purificação das proteínas de interesse.

3.6.3. Purificação das proteínas recombinantes

O extrato proteico foi purificado por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina Ni-NTA Agarose (Invitrogen). Inicialmente, a coluna foi equilibrada com o tampão de lise; seguida da eluição da amostra, a proteína foi eluída no mesmo tampão, com concentrações crescentes de imidazol (20-1000 mM). As frações foram analisadas por gel de poliacrilamida desnaturante, e as frações que continham a proteína de interesse com um alto grau de pureza (>95% após coloração por azul de comassie) foram agrupadas.

O tampão das proteínas purificadas foi trocado por um tampão de reação incompleto (20 mM fosfato de sódio pH 7,4; 500 mM NaCl), utilizando-se colunas PD10 Desalting (GE Healthcare). As proteínas foram então concentradas utilizando-se o sistema Centriprep® - Ultracel YM-10 10.000 MWCO (Millipore).

3.6.4. Determinação da concentração proteica

A concentração molar da proteína recombinante purificada foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração (M)} = \text{Abs}_{280\text{nm}} / \epsilon$$

Sendo a concentração M: mol/L; Abs: Absorbância a 280nm; ϵ : coeficiente de extinção molar, e considerando o caminho óptico de 1 cm. O coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes His-LsfA e His-C45A é igual a 33920 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), e foi determinado utilizando o programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

A concentração proteica também foi determinada utilizando-se o reagente de bradford (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7. Determinação da atividade peroxidásica

A atividade peroxidásica foi determinada *in vitro* pelo ensaio de tiocianato férrico. Brevemente, a proteína recombinante purificada (10 μM) foi incubada a 37°C em 100 μL de tampão de reação (20 mM fosfato de sódio pH 7,4; 500 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 μM DTPA; 10 μM azida de sódio), na ausência ou na presença de 200 μM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após diversos períodos da reação, a mesma foi interrompida com a adição de 20 μL de 2M HCl, seguida de uma incubação por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 μL 2,5 M KSCN (tiocianato de potássio), 100 μL 20 mM FeSO_4 , e 680 μL de H_2O . A absorbância do complexo formado foi medida a 480nm.

Como controle, foram utilizadas as mesmas condições descritas acima, sendo a primeira com a adição da proteína na ausência de DTT e a segunda reação na ausência da proteína e na presença de DTT. A concentração de H_2O_2 presente após os períodos das reações foi comparada a uma curva padrão com diferentes concentrações de H_2O_2 (15,625-1000 μM).

3.8. Ensaio de halo de inibição de crescimento

O ensaio de formação de halo de inibição de crescimento foi realizado como já descrito (Passalacqua *et al.*, 2006), com algumas modificações. As culturas da linhagem selvagem PA14 ou dos mutantes RB301 e RB302 foram cultivadas em meio LB a 37°C até uma $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$. As placas foram preparadas adicionando-se 200 μL da cultura bacteriana a 5 mL de LB aquecido contendo 0,7% ágar e 3 mL dessa suspensão bacteriana foi espalhada em placas LB-1,5% ágar. Papéis de filtro de 6 mm de diâmetro foram permeados com 10 μL de 2,5% peróxido de hidrogênio, 1% t-butil hidroperóxido ou 0,5 mM paraquat. Os discos foram colocados sobre as placas, que foram incubadas por 16 horas a 37°C. Após esse período, o halo de inibição foi observado e medido. Para cada ensaio, três papéis de filtro contendo os compostos foram colocados em cada placa, e três placas foram usadas para cada condição.

3.9. Ensaios de infecção *in vitro*

3.9.1. Cultura dos macrófagos

A linhagem celular de macrófagos murinos J774 foi mantida em meio R-10 (RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 40 µg/mL gentamicina) a 37°C em 5% CO₂. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de tripan para excluir as células mortas. Os macrófagos foram plaqueados na concentração desejada em meio R-10 sem antibiótico, acrescido de 10 ng/mL IFN-γ e mantidos a 37°C em 5% CO₂.

3.9.2. Ensaios de *clearance* bacteriano

As linhagens selvagem PA14 e os mutantes RB301 e RB302 foram cultivados em meio LB até uma DO_{600nm} = 2. Essas culturas foram diluídas em meio R-10 sem antibiótico, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 5 x 10⁶ bactérias/mL. O número de unidades formadoras de colônias (ufc) foi confirmado via diluição em série e inóculo em placas LB-ágar, sendo as colônias contadas após 16-18h a 37°C. Os macrófagos, previamente semeados em placas de 96 poços a uma concentração de 1 x 10⁵ macrófagos/poço, foram infectados a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10. Após a infecção, amostras do sobrenadante contendo as bactérias foram coletadas em tempos determinados, o número de ufc foi determinado como descrito acima.

3.9.3. Ensaios de citotoxicidade

Para verificar a citotoxicidade da linhagem selvagem e dos mutantes frente à cultura de macrófagos, ou seja, a capacidade das bactérias de lisarem os macrófagos, foi

realizado o mesmo protocolo de infecção descrito no item acima. Após o período de infecção, a placa foi centrifugada a 200 *g* por 5 min e o sobrenadante foi recolhido. A citotoxicidade foi verificada pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada pelos macrófagos no sobrenadante, utilizando-se o kit Cytotox 96 Nonradioactive cytotoxicity Assay (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9.4. Avaliação da secreção de TNF- α

Para a quantificação de TNF- α , foi utilizado o mesmo método de infecção referido no item 3.6.2, com algumas modificações. Foram plaqueados 2×10^6 macrófagos/poço, em placas de 6 poços. Quatro horas antes da infecção, os macrófagos foram tratados ou não com inibidores do NF- κ B (10 μ M BAY11-7085), inibidor da ERK1/2 (1 μ M U0126), inibidor da p38 (1 μ M SB203580), inibidor da JNK (1 μ M SP600125), ou 2 mM do antioxidante *N*-Acetilcisteína (NAC). Todos os inibidores foram obtidos da Sigma-Aldrich. Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi recolhido e o TNF- α quantificado via ELISA (R&D systems), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9.5. Avaliação do estado oxidativo

Para avaliar o estado oxidativo dos macrófagos, foi utilizado o marcador carboxi- H_2DCFDA , como descrito (West *et al.*, 2011). Macrófagos (2×10^6 /poço, em placas de 6 poços) foram tratados ou não com o antioxidante NAC, na concentração de 2 mM. Após quatro horas, as células foram infectadas com a linhagem selvagem ou os mutantes RB301 ou RB302 em uma MOI de 10. Após o período de infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na_2HPO_4 , 1,47mM KH_2PO_4) estéril, e 1 mL de PBS foi adicionado por poço, descolando-se as células da

placa por raspagem. As células foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o precipitado suspenso em 10µM carboxi-H₂DCFDA e incubado por 15 minutos a 37°C. As células foram lavadas com PBS pré-aquecido à 37°C e suspensas em PBS frio contendo 3% SFB. As células foram analisadas por FACS (Fluorescence-activated cell sorting), utilizando o aparelho FacsCanto II. Os dados gerados foram analisados com o software FlowJo (TREE STAR).

3.10 Ensaios de infecção *in vivo*

3.10.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8-12 semanas de vida foram obtidos do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em padrão SPF (specific pathogen free) e alimentados com ração comercial irradiada. Todos os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovada pela Comissão Ética em Uso de Animais (CEUA/IQ-USP) número de certificado 08/2012 (Anexo I).

3.10.2. Infecção intra-traqueal

A linhagem selvagem PA14 e os mutantes RB301 e RB302 foram cultivados como descrito acima (item 3.7.2), com algumas modificações. Após atingirem a DO_{600nm} = 2, as bactérias foram centrifugadas a 12000 g por 3 min, e o precipitado lavado com PBS estéril, sendo as bactérias suspensas em PBS. Os animais foram pré-anestesiados com 10 mL/kg de uma solução 0,4% de cloridrato de 2-(2,6- xiidino) 5,6

dihidro-4H-1,3-tiazina pela via intraperitoneal e anestesiados com a administração de cetamida + xilasina (100 + 10 mg/kg) pela via intraperitoneal. Os animais (N=8 para cada linhagem bacteriana) foram infectados via intra-traqueal como já descrito (Cai *et al.*, 2012), com algumas modificações. Após a anestesia, foi feita uma incisão medioventral e os músculos foram isolados, expondo a traqueia. A suspensão bacteriana (2×10^6 bactérias/60µL) em PBS foi inoculada intra-traquealmente. A quantidade de bactérias inoculadas foi confirmada por diluição seriada do inóculo inicial e contagem das ufc. Como controle, 60µL de PBS estéril foram inoculados intra-traquealmente (N=3).

3.10.3. Sobrevivência

Após a infecção intra-traqueal, os animais infectados com a linhagem selvagem ou os mutantes RB301 ou RB302 (N=8 por grupo) e o grupo controle (N=3) foram acompanhados. O grau de moribundidade foi determinado avaliando-se: a respiração rápida, lenta, ofegante ou difícil, rápida perda de peso (perda de 20% do peso a partir do tempo 0 de infecção), anorexia, postura curvada (*hunched*), hipo/hipertermia (variações acima ou abaixo de 4-6°C), ulceração severa, dermatite, diarreia ou constipação, paralisia ou locomoção debilitada e/ou letargia. Os animais que apresentassem um alto grau de moribundidade foram sacrificados em câmara de CO₂, considerando-os como “mortos” na análise de dados. Os dados foram analisados utilizando-se a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e a significância foi calculada utilizando o teste log-rank (Koh *et al.*, 2009).

3.10.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônia nos órgãos após infecção

Após 24 horas de infecção com a linhagem selvagem ou o mutante RB302, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os órgãos (pulmão, fígado, e baço) foram retirados cirurgicamente e macerados mecanicamente em 1mL de PBS. Os sobrenadantes foram diluídos em série e semeados em placas LB-ágar, mantidas por 16-18 horas a 37°C, quando o número de colônias foi determinado.

3.10.5. Quantificação das citocinas do pulmão

Após 24 horas da infecção, os grupos infectados e controle foram eutanasiados, retirando-se o pulmão. Após a maceração do órgão, como descrito acima, o macerado foi centrifugado a 12000 *g* por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação das citocinas TNF- α e IFN- γ via ELISA (R&D systems), de acordo com as recomendações do fabricante dos kits.

3.10.6. Imunofenotipagem pulmonar

Células pulmonares foram purificadas de camundongos BALB/c como descrito (Gonzalez-Juarrero & Orme, 2001). Após 24 horas de infecção, os animais foram sacrificados, retirando-se o pulmão, que foi incubado por 30 minutos a 37°C na presença de tampão de digestão, contendo 0,7 mg/mL de collagenase IV em PBS. Após esse período, o tecido foi macerado para liberação das células, as partículas maiores foram removidas passando-se a suspensão através de uma membrana de nylon, com posterior centrifugação a 500 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, lavando-se o

precipitado com tampão hemolítico (310 mM NH_4Cl , 12 mM NaHCO_3 , 130 μM EDTA), para a remoção dos eritrócitos. As células foram centrifugadas e suspensas em PBS com 3% SFB e contadas em câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de tripan para excluir as células mortas.

Foram utilizadas cerca de 5×10^6 células para a marcação, adicionando-se anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos numa combinação distintas de fluoróforos: F4/80-PECy5 (BM8), CD11c-FITC (HL3), CD11b-PE (M1/70) e Ly6G/Ly6C-APC (RB6-8C5), incubando-se por 20 minutos em gelo. Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS com 3% SFB, utilizando-se as mesmas condições já descritas neste item. O precipitado foi suspenso em PBS com 3% SFB. Para a análise por citometria de foi utilizado o aparelho FACS Canto II e os dados gerados foram analisados posteriormente com o software FlowJo.

Para distinguir células autofluorescentes de células que expressam pequenas concentrações de marcadores de superfície, utilizou-se a metodologia de fluorescence-minus-one (FMO) (Roederer, 2001). Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores, exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados como o limite de FMO e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados positivos. O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal no qual será medido um determinado marcador, revelará a auto-fluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células autofluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo. (Herzenberg *et al.*, 2006).

4. Resultados e Discussão

4.1. Detecção de LsfA no proteoma da linhagem PA14.

Um dos interesses de nosso grupo de pesquisa é determinar o regulon do ativador de transcrição RcsB, codificado por um gene presente na ilha de patogenicidade PAPI-1 de PA14 e importante para a virulência desta linhagem em modelos de planta e mamífero (He *et al.*, 2004, Nicastro *et al.*, 2009). Uma das abordagens experimentais foi a análise proteômica de uma linhagem superexpressando RcsB, em comparação com a linhagem selvagem PA14. Foram detectadas apenas cinco proteínas diferencialmente expressas (**Figura 5 e Tabela 3**). Dentre essas proteínas, destacou-se a maior expressão de LsfA na linhagem superexpressando RcsB.

Para verificar se a transcrição do gene *lsfA* estaria sob o controle de RcsB, ensaios de qRT-PCR foram realizados a partir de RNA extraído das linhagens PA14 e PA14 superexpressando RcsB. Foram encontradas apenas pequenas diferenças não significativas na expressão relativa de *lsfA*. Interessantemente, foi encontrado também induzido um transportador de poliaminas, o qual está envolvido no transporte de espermidina, que apresenta uma função protetora contra estresse oxidativo (Barbagallo *et al.*, 2011). Porém, não há evidências claras demonstrando o papel de RcsB para a maior resistência frente a diferentes estresses oxidativos (dados não mostrados)

Apesar dos resultados não sugerirem um controle direto de RcsB sobre *lsfA*, visto que o operon-alvo *cupD* apresenta indução muito maior na superexpressão de RcsB, a expressão aumentada da proteína LsfA no proteoma desta linhagem nos levou a estudar sua função na fisiologia e na patogenicidade de PA14.

Figura 5. Gel representativo da amostra PA14/pJSG39. Em vermelho, estão destacados os “spots” diferencialmente expressos ($p < 0,05$) que foram posteriormente identificados via LC/MS/MS.

Tabela 3. “Spots” identificados no gel bidimensional comparando-se as linhagens PA14/pJSG e PA14/pJSG39.

Spot*	Proteína	Número de acesso (gi)**	PA14pJSG39/ PA14pJSG	t test	Cobertura de sequência (%)
5	polyamine transport protein PotA	15598803	1,57	99,32	27,5
2	putative short-chain dehydrogenase (PA14_46890)	116049296	1,47	99,97	13,2
3	Thiol-specific antioxidant protein (<i>LsfA</i>)	116051470	1,45	98,06	26,9
1	urocanate hydratase (<i>hutU</i>)	116053247	1,35	98,99	11,5
4	succinyl-CoA synthetase subunit beta (<i>sucC</i>)	116049533	1,28	97,82	13,4

* Número do spot correspondente ao gel mostrado na Figura 5.

**Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

4.2. Caracterização da 1-Cys peroxirredoxina LsfA

4.2.1. LsfA é uma peroxirredoxina da família Prx6

A classificação das Prxs em subfamílias de acordo com o mecanismo da catálise é fundamental para compreender os diversos papéis biológicos que elas podem atuar. LsfA de *P. aeruginosa* apresenta somente uma cisteína na posição 45. O alinhamento entre LsfA e proteínas da subfamília Prx6 (Nelson et al., 2011), onde vários motivos conservados podem ser observados, demonstra que essa proteína pertence a subfamília Prx6 (**Figura 6**), indicando uma possível atividade peroxidásica.

Uma característica importante da peroxirredoxina 6 de humanos e camundongos é a presença de um domínio de aiPLA₂ (fosfolipase A₂ acídica, independente de cálcio),

além do domínio de peroxirredoxina. O domínio aiPLA₂ da Prx6 humana consiste na sequência conservada da lipase (GX SXG), que se encontra na posição 30-34 da sequência de aminoácidos (**Figura 6**, destacado em cinza).

Interessantemente, LsfA de *P. aeruginosa* apresenta o motivo de PLA₂ conservado (aminoácidos de 28-32, **Figura 6**, destacado em cinza), diferente de *B. cepacia*, que apresenta uma glicina no lugar da serina do centro catalítico putativo (GxGxG). O motivo PLA₂ está ausente no protozoário *Plasmodium*, agente etiológico da malária, e da arqueia *Aeropyrum* (**Figura 6**).

A atividade de fosfolipase é importante para diversos microrganismos patogênicos como *Candida sp.* (PLC) (Kumar *et al.*, 2006), *Cryptococcus neoformans* (PLB) (Cox *et al.*, 2001, Ganendren *et al.*, 2006) e *Plasmodium sp.* (PLA₂) (Bhanot *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* apresenta pelo menos três fosfolipases envolvidas na virulência (Vasil *et al.*, 1982, Berka & Vasil, 1982). Uma dessas fosfolipases é a exotoxina ExoU, que ocasiona a morte de células eucariotas e a destruição de tecidos (Allewelt *et al.*, 2000, Finck-Barbancon *et al.*, 1997).

A função de PLA₂ de LsfA não foi determinada até o presente momento, porém, com base no alinhamento LsfA de *P. aeruginosa* pode apresentar uma atividade de fosfolipase e essa pode estar correlacionada a virulência.

Já foi demonstrado que a atividade peroxidásica da Prx6 de humanos independe da atividade de PLA₂, em que mutações na cisteína peroxidásica inibem a atividade peroxidásica sem afetar a atividade de fosfolipase, e uma mutação na serina 32 (do domínio de lipase) inibe somente a atividade PLA₂, sem alterar a função peroxidásica (Chen *et al.*, 2000, Fisher *et al.*, 1999).

Figura 6. LsfA pertence à subfamília Prx6 das peroxirredoxinas. Alinhamento múltiplo de diferentes sequências da subfamília Prx6 utilizando o programa ClustalW. Resíduos conservados no sítio ativo da subfamília Prx6 estão destacados nas caixas pretas, a cisteína predita com atividade peroxidásica está destacada em laranja, destacado na caixa cinza o domínio de lipase (GxSxG) presente somente em *Pseudomonas aeruginosa* e em humanos. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (gi: 116051470); *Burkholderia cepacia* 383 (gi: 78065379); *Plasmodium yoelii* (gi: 56967056); *Aeropyrum pernix* K1 (gi: 85543926; Humano (gi:85543926).

4.2.2. Atividade peroxidásica de LsfA in vitro.

As peroxirredoxinas são capazes de degradar eficientemente ROS/RNS com uma alta constante específica (K_{cat}/K_m) ($>10^5 \text{ M s}^{-1}$), sendo sua atividade dependente da CysP (Seaver & Imlay, 2001). Para verificar se LsfA de *P. aeruginosa* PA14 apresenta atividade peroxidásica, as proteínas LsfA e LsfAC45A, que apresenta uma

mutação pontual na cisteína, substituindo-a por alanina, foram expressas em *E. coli* com uma etiqueta de histidina e purificadas com sucesso por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-agarose (**Figura 7**). As frações com um alto grau de pureza foram agrupadas para verificar a atividade peroxidásica de LsfA.

Figura 7. Expressão e purificação das proteínas recombinantes (A) His-LsfA e (B) His-C45A. A expressão das proteínas recombinantes foi feita em *E. coli* BL21(DE3) portando os plasmídeos pGHK005 ou pGHK006, a indução foi feita com a adição de 0,6mM de IPTG. Após 6 horas de indução, as bactérias foram coletadas e lisadas. A fração solúvel contendo a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade. 1: Marcador de peso molecular; 2 e 3: Extrato de 0 e 6 horas de indução, respectivamente; 4: fração solúvel; 5-10: frações obtidas após eluição da proteína recombinante com concentrações crescentes de imidazol.

A atividade peroxidásica das proteínas recombinantes purificadas (His-LsfA e His-C45A) foi medida *in vitro* pelo ensaio de tiocianato férrico. Após a oxidação da cisteína de LsfA para ácido sulfênico, ocorre a redução do ácido sulfênico para o tiolato, fechando o ciclo catalítico da peroxirredoxina, sendo esse processo mediado pelo seu cognato agente redutor. Foi utilizado DTT como agente redutor e este foi capaz de reduzir LsfA oxidada, permitindo confirmar que LsfA apresenta atividade peroxidásica.

Nesse ensaio, apenas a proteína com a sequência selvagem apresentou a capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio, demonstrando que a cisteína na posição 45 é essencial para a atividade peroxidásica de LsfA (**Figura 8**).

Peroxirredoxinas estão relacionadas ao aumento da resistência de bactérias frente a peróxidos orgânicos e inorgânicos (Christman et al., 1985, Bryk et al., 2000, Atichartpongkul et al., 2010). Portanto, foi investigado se LsfA de *P. aeruginosa* poderia desempenhar um papel na proteção frente ao estresse oxidativo.

Figura 8. LsfA apresenta atividade peroxidásica frente a peróxido de hidrogênio. As curvas representam a cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença de 10 μM de LsfA ou de LsfAC45A (curvas vermelha e verde, respectivamente). A reação foi iniciada pela adição de DTT (1mM) e a concentração de H_2O_2 presente ao longo do tempo foram determinados pelo ensaio de tiocianato férrico. Como controle, a reação foi realizada na ausência de DTT (curva azul). As curvas são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2.3 LsfA é importante na resistência ao peróxido de hidrogênio

Para compreender se LsfA de *P. aeruginosa* pode desempenhar um efeito protetor frente a peróxidos, foram construídos um mutante apolar, pela deleção da

região codificadora de *lsfA* (RB301) e um mutante pontual na CysP, *lsfAC45A* (RB302), conforme descrito em Material e Métodos. As linhagens mutantes RB301 e RB302 não apresentaram deficiência no seu crescimento em meio mínimo (dado não mostrado). Foi utilizado o ensaio de halo de inibição frente a H₂O₂, t-butil hidroperóxido e paraquat. Foi observado um maior halo de inibição das linhagens mutantes quando comparados à linhagem selvagem apenas na presença de H₂O₂ (**Figura 9**), demonstrando que LsfA é importante para uma maior resistência de PA14 frente ao estresse oxidativo. Entretanto, não houve diferença nos diâmetros dos halos de inibição na presença dos peróxidos orgânicos (dados não mostrados), mostrando uma especificidade do requerimento de LsfA.

Curiosamente, a proteína LsfA oxidada de *P. aeruginosa* PAO1 foi observada na presença de paraquat, um doador de ânion superóxido, mas não na presença de peróxido de hidrogênio (Hare *et al.*, 2011), contrastando com os resultados obtidos aqui. Em outro estudo, não foi observado o aumento da transcrição de *lsfA* após o tratamento com H₂O₂ (Salunkhe *et al.*, 2005), porém vale ressaltar que ambos os estudos obtiveram amostras de proteína ou de mRNA após 2 horas da adição de H₂O₂. Este período pode ser considerado muito longo, pois após 2h há a redução de 90-95% do peróxido de hidrogênio extracelular (Hare *et al.*, 2011). Portanto, se LsfA está correlacionada a proteção contra H₂O₂, ela pode ser induzida nos tempos iniciais ou nos tempos tardios do estresse, quando apenas a presença de AhpCF e catalase não é suficiente para manter a bactéria viável. Dessa forma, estudos utilizando outros tempos de incubação frente ao estresse oxidativo deveriam ser realizados para entender a importância de outras enzimas antioxidantes não identificadas no estudo proteômico e transcriptômico, como LsfA.

Figura 9. A falta de LsfA ou a cisteína peroxidásica resulta em uma maior sensibilidade a H_2O_2 . As bactérias foram crescidas até $DO_{600nm}=1$, espalhadas em placas LB e um disco de filtro de 6mm contendo 2,5% H_2O_2 foi posicionado no topo da camada bacteriana. As placas foram incubadas a $37^\circ C$ por 16 horas. Dado representativo de 1 de 5 experimentos independentes.

4.3. Envolvimento de LsfA na virulência de *P. aeruginosa*.

Embora haja relatos sobre a função enzimática das 1-Cys Prxs (Loumaye et al., 2011, Pedrajas et al., 2010, Monteiro et al., 2007, Mizohata et al., 2005, Li et al., 2005, Sarma et al., 2005), não há na literatura estudos descrevendo o seu possível envolvimento na patogenicidade de bactérias. Uma vez que macrófagos e neutrófilos fagocitam eficientemente os patógenos, produzindo ROS/RNS e consequentemente promovendo a morte das bactérias, estas desenvolveram mecanismos para contrapor

esse estresse, sendo que as 2-Cys Prxs, as catalases, e a superóxido dismutase já foram correlacionadas com a virulência de *P. aeruginosa* (Lee et al., 2005, Iiyama et al., 2007, Atichartpongkul et al., 2010). Como a 1-Cys Prx LsfA apresenta um papel na resistência de *P. aeruginosa* frente a um estresse oxidativo e atividade peroxidásica *in vitro* (**Figuras 8 e 9**), isto sugere que ela pode apresentar um papel na virulência desta bactéria. Assim, foram realizados ensaios com macrófagos *in vitro* e ensaios de virulência no modelo de infecção pulmonar em camundongos, cujos resultados estão descritos a seguir.

4.3.1. LsfA é importante para a sobrevivência da bactéria frente a macrófagos

Inicialmente, para entender o papel de LsfA, foi utilizado o ensaio de *clearance* bacteriano, utilizando-se a linhagem de macrófagos J774 estimulados com IFN- γ . Nesse ensaio, é possível medir a capacidade dos macrófagos de matar as bactérias. Após 1, 2 ou 3 horas de incubação das bactérias com os macrófagos, o meio líquido foi coletado e as unidades formadoras de colônias foram enumeradas. Como os macrófagos continuam aderidos ao fundo da placa, apenas as bactérias que não estão associadas a eles se encontram nessa fase.

Foi observada uma rápida redução de 25 a 50 vezes no número de unidades formadoras de colônia após uma hora de incubação com os macrófagos, demonstrando uma rápida fagocitose das bactérias, podendo essa resultar na morte do patógeno ou na sua evasão, resultando na morte do macrófago. Após 3 horas de infecção, a alta contagem de UFC deve-se a sobrevivência das bactérias frente aos macrófagos, resultando na morte destes. Outro fator que pode estar contribuindo para a alta

contagem de UFC no tempo de 3 horas é a capacidade da bactéria de crescer na presença dos macrófagos. Já foi observado que *P. aeruginosa* cresce melhor na presença de células de linhagem epiteliais pulmonares A549 do que no meio de cultura DMEM (D. Meireles, comunicação pessoal), provavelmente por usar os restos celulares como nutriente. Nesse ensaio, também foi observado que os macrófagos conseguem eliminar as bactérias mutantes em *lsfA* RB301 e RB302 com maior eficiência, em comparação à linhagem selvagem PA14 (**Figura 10**), sendo que os mutantes RB301 e RB302 apresentam números de UFC de 2 a 4 vezes menores que PA14.

Figura 10. *LsfA* é importante para a resistência ao *clearance* mediado por macrófagos *in vitro*. Macrófagos J774 estimulados com 10ng/mL de IFN- γ foram infectados com *P. aeruginosa* PA14 (barras azuis), RB301 (Δ *lsfA*, barras vermelhas) e RB302 (*lsfAC45A*, barras verdes), em uma MOI de 10. Após 1, 2 ou 3 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado, diluído e o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi determinado. Representativo de 3 experimentos independentes repetidos em triplicata, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. (* $p < 0,05$)

P. aeruginosa promove a morte do macrófago, sendo este processo importante para a virulência (Hauser & Engel, 1999). Portanto, foi medida a influência de *LsfA* na morte dos macrófagos. Para tal, após 1, 2 ou 3 horas de infecção com PA14 ou

mutantes em *lsfA*, o sobrenadante foi recolhido e a atividade de LDH medida, como um indicador da morte dos macrófagos. Os macrófagos infectados com as linhagens mutantes apresentaram uma maior sobrevivência em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 11**), principalmente nos tempos iniciais de interação. Esse ensaio de citotoxicidade, em conjunto com o ensaio de *clearance* bacteriano, demonstra que LsfA é importante para a sobrevivência da bactéria frente a um fagócito, provavelmente por diminuir o estado oxidativo do macrófago e/ou permitir uma maior resistência à injúria causada por esse estresse. Assim, LsfA apresenta um papel na virulência da bactéria, sendo que a ausência de sua atividade diminui o efeito citotóxico de maneira significativa.

Figura 11. Mutantes em LsfA apresentam uma redução de citotoxicidade frente a macrófagos *in vitro*. Macrófagos estimulados com 10ng/mL de IFN- γ foram infectados com a linhagem selvagem PA14 (barras azuis), RB301 (Δ *lsfA*, barras vermelhas) e RB302 (*lsfA*C45A, barras verdes) a uma MOI de 10. Após os períodos indicados, o sobrenadante foi coletado e a atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada. Representativo de 3 experimentos independentes, repetidos em triplicata; as barras representam a média $\pm$ desvio padrão (* $p < 0,05$).

O motivo de lipase presente em LsfA também pode contribuir para o efeito citotóxico, porém esta atividade não foi avaliada neste trabalho.

4.3.2 A ausência de LsfA ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias

Os macrófagos, uma vez em contato com as bactérias, ativam diversas vias de sinalização, por exemplo, a via dos TLRs, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (Kawai & Akira, 2010). Para entender se a presença de LsfA em *P. aeruginosa* poderia exercer um efeito imunomodulador, macrófagos estimulados com IFN- γ foram infectados com a linhagem selvagem PA14 ou com os mutantes RB301 e RB302. Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi retirado e a concentração de TNF- α medida por ELISA. Os macrófagos infectados com as linhagens RB301 e RB302 apresentaram uma maior secreção de TNF- α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 12**), indicando que LsfA está diminuindo a ativação dos macrófagos, exercendo um efeito imunomodulador, provavelmente por diminuir o estado oxidativo dos macrófagos, resultando na diminuição da secreção de TNF- α (Sutterwala *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2010)

Outros fatores de virulência de *P. aeruginosa* têm um efeito modulador da resposta imune, por exemplo, a exotoxina U (ExoU), que é capaz de inibir a ativação da caspase-1 (Sutterwala *et al.*, 2007), correlacionada à maturação da citocina pró-IL1 β para a sua forma ativa (REVISADO em (Martinon *et al.*, 2009). Além de ExoU, as pequenas moléculas ativadoras do *quorum sensing* HHQ e PQS são capazes de

regular negativamente o sistema imune, diminuindo a ativação do NF- κ B, resultando na diminuição do *clearance* bacteriano e na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) (Kim et al., 2010). Porém, esta é a primeira evidência de uma 1-Cys peroxirredoxina sendo capaz de exercer uma função imunoregulatória além de proteger o patógeno frente a um fagócito, diminuindo a sua ativação e com isso favorecendo a virulência da bactéria.

Figura 12. LsfA reduz a secreção de TNF- α pelos macrófagos *in vitro*. Macrófagos estimulados com 10ng/mL de IFN- γ foram infectados com a linhagem selvagem PA14 (barras azuis), RB301 (Δ /sfA, barras vermelhas) e RB302 (/sfAC45A, barras verdes) a uma MOI de 10. Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado e a concentração de TNF- α determinado via ELISA. Representativo de 3 experimentos independentes, repetidos em triplicata; as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. (* $p < 0,05$).

4.3.3. LsfA reduz o estado oxidativo dos macrófagos

Para compreender se a falta da atividade peroxidásica de LsfA na bactéria induz um aumento no estado oxidativo dos macrófagos, foi utilizado o indicador carboxi-H₂DCFDA, que, uma vez oxidado, torna-se fluorescente.

Vale ressaltar que apesar do H₂DCFDA ser amplamente utilizado para avaliar a produção de peróxido de hidrogênio, ele não apresenta uma alta especificidade para essa molécula (Kalyanaraman *et al.*, 2012). Porém, ele fornece indícios do estado oxidativo da célula, pelo aumento de ROS e/ou RNS, indicando uma maior ativação da NADPH oxidase (Bass *et al.*, 1983). Como o objetivo desse ensaio foi verificar se LsfA estaria influenciando negativamente a geração de ROS/RNS nos macrófagos, e dessa forma comprovando os resultados obtidos acima (**Figuras 10, 11 e 12**), o H₂DCFDA foi utilizado para avaliar esse fenômeno, sem fornecer dados específicos sobre qual espécie (ROS/RNS) apresenta-se em níveis aumentados.

Após a infecção dos macrófagos *in vitro* e posterior análise por FACS, observou-se uma maior fluorescência dos macrófagos infectados com as linhagens mutantes RB301 e RB302 (**Figura 13A**). Esse dado pode indicar que LsfA, além de proteger a bactéria frente a um estresse oxidativo, exerce um papel imunomodulador, diminuindo o estado oxidativo dos macrófagos, e dessa forma diminuindo sua ativação, culminando em uma resposta pró-inflamatória deficiente.

Figura 13. *LsfA* regula o estado oxidativo dos macrófagos durante a infecção *in vitro*. (A)

Macrófagos estimulados com 10ng/mL de IFN- γ foram infectados com a linhagem selvagem PA14(barras azuis), RB301 (Δ *lsfA*, barras vermelhas) e RB302 (*lsfAC45A*, barras verdes) a uma MOI de 10. Após os tempos de infecção indicados, o sobrenadante foi removido, os macrófagos aderidos foram lavados, raspados e tratados com 10 μ M carboxi-H₂DCFDA. As células foram então analisadas por FACS. (B) Macrófagos infectados com PA14 ou o mutante RB302 foram tratados com 2mM do antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Após 3 horas de infecção, as células foram tratadas e analisadas como descrito em (A). Representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. (* $p < 0,05$)

4.4.4 LsfA reduz a ativação do NF- κ B e das MAPKs

Macrófagos nocautes para o gene Prx II apresentam uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6, após desafio com LPS. Esse aumento foi correlacionado com a maior produção de ROS pelos macrófagos, resultando no aumento da ativação das vias das MAPKs e do NF- κ B (Yang *et al.*, 2007). Os ensaios descritos acima indicam uma maior ativação dessas vias (MAPKs, e o NF- κ B) nos macrófagos infectados com *P. aeruginosa* deficiente em LsfA e essa ativação pode ser resultado da alteração de seu estado oxidativo.

Para verificar se a maior secreção de TNF- α pelos macrófagos infectados com a linhagem mutante RB302 é devido a um aumento no estado oxidativo dos macrófagos, N-acetilcisteína (NAC) foi utilizada como um antioxidante. Na concentração utilizada, NAC foi capaz de reduzir o estado oxidativo dos macrófagos infectados com a linhagem mutante RB302 a níveis semelhantes aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 14B**). Ao adicionar esse antioxidante, os níveis de secreção de TNF- α pelos macrófagos infectados com a linhagem mutante RB302 tornaram-se semelhantes aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem na presença ou na ausência de NAC (**Figura 14**). Este resultado comprova que *P. aeruginosa* é capaz de modular o estado oxidativo dos macrófagos por ação da peroxirredoxina LsfA, diminuindo a ativação e consequentemente a menor secreção de TNF- α pelos macrófagos.

Além do efeito bactericida que o ROS pode desempenhar, sabe-se que eles podem agir como importantes moléculas sinalizadoras, podendo levar à ativação de vias de sinalização como as MAPKs e o NF- κ B (Chen *et al.*, 1998, Kang *et al.*, 2000a,

Kang et al., 2001, Kang et al., 2000b, Adler et al., 1999, Ding et al., 2001, Irani & Goldschmidt-Clermont, 1998), e, conseqüentemente, à maior produção de citocinas.

Utilizando-se inibidores específicos, foram identificadas quais vias de sinalização poderiam estar com um maior grau de ativação nos macrófagos infectados com a linhagem RB302 em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem PA14. Nesse ensaio, foi observado que LsfA atua negativamente na via do NF- κ B, e na via das MAPKs p38 e ERK1/2 (**Figura 14**), culminando na menor secreção de TNF- α nos macrófagos infectados com a linhagem selvagem. Apesar da via da JNK estar envolvida na secreção de TNF- α nos macrófagos infectados com a linhagem selvagem ou com o mutante RB302, aparentemente a via da JNK não se apresenta hiperativa nos macrófagos infectados com a linhagem RB302, uma vez que mesmo na presença do inibidor SP600125, que é específico para a JNK, a diferença de secreção de TNF- α foi mantida entre os macrófagos infectados com a linhagem selvagem e os macrófagos infectados com a linhagem mutante na presença e ausência do inibidor da JNK.

Figura 14. LsfA reduz a ativação do NF- κ B, p38 e ERK1/2 resultando em uma menor secreção de TNF- α . Macrófagos estimulados com 10ng/mL de IFN- γ foram infectados com a linhagem selvagem PA14(barras azuis) ou RB302 (*lsfAC45A*, barras verdes) a uma MOI de 10. Antes da infecção os macrófagos foram tratados com inibidores do NF- κ B (10 μ M BAY11-7580), p38 (1 μ M SB203580), ERK1/2 (1 μ M U0126), e JNK1/2 (1 μ M SP600125), ou na presença do antioxidante NAC (2mM), como controle foi utilizado macrófagos infectados com a linhagem selvagem PA14 ou RB302 (-). Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado e a concentração de TNF- α determinado via ELISA. * $p < 0,05$, em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem PA14 na ausência de inibidores; # $p < 0,05$, em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem RB302 na ausência de inibidores.

4.4.5. LsfA é importante para a virulência *in vivo*

A falta das peroxirredoxinas já foi correlacionada com a diminuição da virulência de algumas bactérias em modelos *in vitro* de infecção, porém em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *M. tuberculosis*, *Legionella pneumophila* e *Porphyromonas gingivalis*, a 2-Cys peroxirredoxina AhpC não é requerida em modelo de virulência *in vivo*. Portanto, para confirmar o envolvimento da 1-Cys Prxs LsfA de *P. aeruginosa* na virulência, foi utilizado o modelo de pneumonia aguda em camundongos. Para tal,

camundongos BALB/c foram infectados intra-traquealmente com a cepa selvagem PA14 ou com os mutantes RB301 e RB302.

Os animais infectados com a linhagem selvagem apresentaram uma rápida morte, com todos os animais mortos após 48 horas após a infecção, enquanto os animais infectados com as linhagens mutantes, RB301 e RB302, apresentaram uma maior sobrevivência, sendo que após 10 dias de infecção 37,5% dos animais infectados com as linhagens mutantes encontravam-se vivos (**Figura 15**). Após 60 dias de infecção, os animais infectados com a linhagem mutante RB301 (37,5%) e RB302 (25%) apresentavam-se saudáveis, podendo indicar a cura desses animais. Nesse ensaio, foi possível comprovar a importância de LsfA na virulência *in vivo* no modelo murino de pneumonia aguda.

Figura 15. LsfA é importante para a virulência *in vivo*. Camundongo BALB/c (n=8 por grupo) foram infectados intra-traquealmente com 2×10^6 bactérias da linhagem selvagem (círculos) ou os mutantes RB301 (quadrados) e RB302 (triângulos). A mortalidade foi determinada como descrito nos materiais e métodos. Como controle, foi inoculado intra-traquealmente PBS (n=3; triângulos invertidos). A significância foi determinada pelo teste log-rank.

4.4.6 LsfA aumenta a sobrevivência de *P. aeruginosa* durante a infecção *in vivo*

Os camundongos infectados intra-traquealmente com *P. aeruginosa* apresentam uma rápida disseminação da bactéria para os outros órgãos, gerando um quadro de sepse, culminando na morte do animal (Ramphal et al., 2008). Para compreender como LsfA influencia a virulência de *P. aeruginosa* durante a infecção, foi analisada a carga bacteriana no sítio primário de infecção (pulmão), assim como em órgãos secundários (fígado e baço), esses indicando um quadro de sepse.

Após 24 horas de infecção, os órgãos (fígado, baço e pulmão) dos animais infectados, foram retirados e as unidades formadoras de colônia foram enumeradas. Os animais infectados com a linhagem mutante em LsfA, RB302, apresentaram uma

grande diminuição (cerca de 1000 vezes menos no pulmão e baço) na carga bacteriana nos órgãos analisados, em comparação aos animais infectados com a linhagem selvagem PA14, indicando uma melhor resolução da doença nos animais infectados com a linhagem RB302 (**Figura 16**). Estes dados mostram também a importância de LsfA para a maior resistência da bactéria frente ao sistema imune do hospedeiro, permitindo sua sobrevivência e posterior disseminação, resultando na morte do animal.

Figura 16. LsfA é importante para a sobrevivência de *P. aeruginosa* durante a infecção. Camundongos BALB/c foram infectados intra-traquealmente com 2×10^6 bactérias da linhagem selvagem (barras azuis) ou do mutante RB302 (barras verdes). Após 24 horas de infecção, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e macerados, o sobrenadante foi coletado, diluído e o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi determinado. Representativo de 3 experimentos independentes repetidos em triplicata, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. (* $p < 0,05$)

4.4.7. LsfA reduz a produção de citocinas no pulmão

Os macrófagos pulmonares exercem um papel essencial na resposta frente a *P. aeruginosa*. Ao sentirem o patógeno, ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que recrutam neutrófilos ao sítio de infecção, controlando-a (Kooguchi et al., 1998, Morissette et al., 1996). A expressão dessas citocinas pró-inflamatórias é estimulada em macrófagos pelas vias do NF- κ B e das MAPKs. Como LsfA é capaz de diminuir a ativação dessa vias, por diminuir o estado oxidativo dos macrófagos (**Figura 14**), a bactéria mutante em LsfA pode ser menos virulenta pela capacidade do hospedeiro em recrutar adequadamente células do sistema imune para posterior erradicação da doença.

O aumento da concentração de TNF- α é importante para o aumento do *clearance* bacteriano nos pulmões, sendo que animais suscetíveis a infecção por *P. aeruginosa* apresentam uma diminuição da secreção desta citocina (Morissette et al., 1996). Entretanto, o papel do IFN- γ durante a infecção por *P. aeruginosa* não está muito claro: a administração intraperitoneal de IFN- γ em modelo de infecção crônica pulmonar por *P. aeruginosa* em ratos demonstrou uma diminuição da inflamação nos pulmões (Johansen et al., 1996), enquanto, a administração exógena de IFN- γ , utilizando-se vetores de adenovírus, demonstrou um aumento no *clearance* bacteriano, além do aumento da produção de TNF- α (Lei et al., 1997). Porém, camundongos nocautes para o receptor de IFN- γ demonstraram um aumento do *clearance* bacteriano no pulmão em comparação aos camundongos selvagens, apresentando os mesmos níveis de citocinas (Schultz et al., 2001). Os camundongos nocaute, porém, apresentaram

maiores níveis de óxido nítrico no lavado broncoalveolar em comparação aos camundongos selvagens após o desafio com *P. aeruginosa* (Schultz et al., 2001). Esses estudos sugerem que os níveis endógenos de IFN- γ não são suficientes para exercerem um efeito benéfico ao hospedeiro, porém níveis aumentados dessa citocina por sua administração endógena podem ser benéficos ao hospedeiro.

Após 24 horas de infecção, as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ presentes no pulmão nos camundongos infectados foram determinados. Foi observado que a bactéria selvagem PA14 foi capaz de causar uma imunossupressão local nos camundongos, com níveis de TNF- α e IFN- γ pulmonares semelhantes aos camundongos não infectados. Por outro lado, camundongos infectados com a linhagem mutante RB302 maiores níveis tanto de IFN- γ como de TNF- α foram observados (**Figura 17**). Nesse caso, ambas as citocinas podem desempenhar importante papel para o controle da infecção, induzindo o aumento do recrutamento de células do sistema imune, como neutrófilos, além do IFN- γ regular positivamente os TLRs, resultando no melhor reconhecimento do patógeno pelos macrófagos e neutrófilos, aumentando a atividade da NADPH oxidase e culminando na morte do patógeno (Almeida *et al.*, 2005).

Figura 17. LsfA induz uma imunossupressão local. Camundongo BALB/c foram infectados intra-traquealmente com 2×10^6 bactérias da linhagem selvagem ou o mutante RB302. Após 24 horas de infecção os animais foram sacrificados, os pulmões foram retirados e macerados, posteriormente o sobrenadante foi coletado e a concentração de TNF- α e IFN- γ foram determinados por ELISA. Representativo de três experimentos independentes repetidos em triplicata, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4.4.8. LsfA reduz o recrutamento de células do sistema imune

Para verificar se LsfA diminui o recrutamento das células do sistema imune ao sítio de infecção, principalmente de neutrófilos, os pulmões dos camundongos infectados com a linhagem selvagem ou a linhagem mutante RB302 foram retirados após 24 horas de infecção e o perfil celular das células pulmonares foram avaliados por FACS. Os animais infectados com a linhagem RB302 apresentaram um aumento no recrutamento de neutrófilos (Ly6G/Ly6C⁺; F4/80⁻) e macrófagos (F4/80⁺; CD11b⁺) no sítio de infecção, quando comparados ao grupo infectado com a linhagem selvagem (**Figura 18**). Este resultado justifica o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e

IFN- γ , que resulta no aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos, diminuindo assim a carga bacteriana e resultando na melhor sobrevivência dos camundongos infectados com as linhagens mutantes em LsfA

Figura 18. LsfA reduz o recrutamento de neutrófilos e macrófagos aos pulmões. Camundongos BALB/c foram infectados intra-traquealmente com 2×10^6 bactérias da linhagem selvagem (barras azuis) ou do mutante RB302 (barras verdes). Como controle foi inoculado PBS intra-traquealmente (barras brancas, “Sham”). Após 24 horas de infecção, os animais foram sacrificados, os pulmões foram retirados e macerados, as células totais foram marcadas com anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos: F4/80-PECy5, CD11b-PE e Ly6G/Ly6C-APC, com posterior análise por FACS. Estratégia de *gateway* para análise de macrófagos ($F4/80^+$; $CD11b^+$) (**A**) e neutrófilos ($Ly6G/Ly6C^+$; $F4/80^-$) (**B**). Porcentagem de neutrófilos presentes no pulmão (**C**). Porcentagem de macrófagos presentes no pulmão (**D**). Resultados representativos de um experimento de três experimentos independentes.

5. Conclusões

Neste trabalho foi descrito pela primeira vez o envolvimento das 1-Cys peroxirredoxinas na virulência de bactérias. Para estudar a função dessa subfamília, foi utilizada a 1-Cys Prx LsfA de *P. aeruginosa* PA14. LsfA pertence a subfamília Prx6 das peroxirredoxinas, e interessante apresenta além dos motivos de peroxirredoxinas, um motivo de lipase conservado, semelhante a Prx6 de humanos e camundongos.

Para compreender como LsfA participa na virulência de *P. aeruginosa*, foi utilizado um modelo *in vitro* de infecção utilizando-se de macrófagos J774. Neste modelo foi verificado que LsfA é capaz de proteger a bactéria do fagócito, promovendo a morte do macrófago. Além disso, foi observado que LsfA é capaz de regular o estado oxidativo dos macrófagos resultando em uma diminuição da função imune, resultando na menor secreção de TNF- α .

O aumento do estado oxidativo dos macrófagos infectados com a linhagem mutante resultou no aumento da ativação das vias do NF- κ B, p38 e ERK1/2, porém não houve o aumento da ativação da via da JNK1/2.

Os mecanismos moleculares em que ROS/RNS ativam a via das MAPKs e do NF- κ B não são bem compreendidas, portanto o modelo de infecção *in vitro* de macrófagos com a bactéria selvagem e os mutantes em LsfA pode ser uma ferramenta útil para entender tais mecanismos.

Foi observado que LsfA participa na virulência de *P. aeruginosa*, resultando em uma rápida morte dos camundongos infectados. Essa rápida morte foi devido a uma imunossupressão local, com produções basais de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e

IFN- γ), além de um recrutamento deficiente de células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos.

Atualmente é essencial explorar novos paradigmas para o desenvolvimento de terapias anti-infectivas. Essas podem ser contra os mecanismos de virulência da bactéria, como contra o sistema de secreção do tipo III, ou terapias imunomodulatórias do hospedeiro, em que os mecanismos naturais do hospedeiro são explorados para aumentar os efeitos benéficos da terapia. Para que ambas as vertentes se tornem realidade, os mecanismos de virulência da bactéria e os mecanismos de defesa do hospedeiro devem ser elucidados.

Neste trabalho, foi demonstrado que LsfA pode ser um alvo para o desenvolvimento de novas drogas, suportando estudos anteriores, em que o aumento de TNF- α e IFN- γ é benéfico para o hospedeiro, sugerindo que a administração dessas citocinas podem ser utilizadas como uma possível terapia contra *P. aeruginosa*.

6. Referências Bibliográficas

- Adler, V., Z. Yin, S. Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K. D. Tew, M. R. Pincus, M. Sardana, C. J. Henderson, C. R. Wolf, R. J. Davis & Z. Ronai, (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO journal* 18: 1321-1334.
- Allewelt, M., F. T. Coleman, M. Grout, G. P. Priebe & G. B. Pier, (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infection and immunity* 68: 3998-4004.
- Almeida, A. C., J. Rehder, S. D. Severino, J. Martins-Filho, P. E. Newburger & A. Condino-Neto, (2005) The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the NADPH oxidase system of human colostrum macrophages, blood monocytes, and THP-1 cells. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 25: 540-546.
- Alphey, M. S., C. S. Bond, E. Tetaud, A. H. Fairlamb & W. N. Hunter, (2000) The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *Journal of molecular biology* 300: 903-916.
- Atichartpongkul, S., M. Fuangthong, P. Vattanaviboon & S. Mongkolsuk, (2010) Analyses of the regulatory mechanism and physiological roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a transcription regulator and a sensor of organic hydroperoxides. *Journal of bacteriology* 192: 2093-2101.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl, (1996) Current Protocols in Molecular Biology. In. New York: John Wiley and Sons, pp.
- Barbagallo, M., M. L. Di Martino, L. Marcocci, P. Pietrangeli, E. De Carolis, M. Casalino, B. Colonna & G. Prosseda, (2011) A new piece of the Shigella Pathogenicity puzzle: spermidine accumulation by silencing of the speG gene [corrected]. *PloS one* 6: e27226.
- Barbieri, J., Sun, J, (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 152: 79-92.
- Bass, D. A., J. W. Parce, L. R. Dechatelet, P. Szejda, M. C. Seeds & M. Thomas, (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130: 1910-1917.
- Berka, R. M. & M. L. Vasil, (1982) Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *Journal of bacteriology* 152: 239-245.
- Bhanot, P., K. Schauer, I. Coppens & V. Nussenzweig, (2005) A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. *The Journal of biological chemistry* 280: 6752-6760.
- Bjarnsholt, T. & M. Givskov, (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem* 387: 409-414.
- Bou, R., L. Lorente, A. Aguilar, J. Perpignan, P. Ramos, M. Peris & D. Gonzalez, (2009) Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect* 71: 138-142.

- Bryk, R., P. Griffin & C. Nathan, (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-215.
- Bryk, R., C. D. Lima, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & C. Nathan, (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295: 1073-1077.
- Cai, S., S. Batra, N. Wakamatsu, P. Pacher & S. Jeyaseelan, (2012) NLRC4 inflammasome-mediated production of IL-1 β modulates mucosal immunity in the lung against gram-negative bacterial infection. *J Immunol* 188: 5623-5635.
- Cao, H., R. L. Baldini & L. G. Rahme, (2001) Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol* 39: 259-284.
- Cha, M. K., S. K. Hong & I. H. Kim, (2007) Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and act as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena* sp. PCC7120. *Free radical biology & medicine* 42: 1736-1748.
- Chen, F., Y. Lu, L. M. Demers, Y. Rojanasakul, X. Shi, V. Vallyathan & V. Castranova, (1998) Role of hydroxyl radical in silica-induced NF- κ B activation in macrophages. *Annals of clinical and laboratory science* 28: 1-13.
- Chen, J. W., C. Dodia, S. I. Feinstein, M. K. Jain & A. B. Fisher, (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *The Journal of biological chemistry* 275: 28421-28427.
- Chen, W. P. & T. T. Kuo, (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21: 2260.
- Cheung, D. O., K. Halsey & D. P. Speert, (2000) Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 68: 4585-4592.
- Choi, H. J., S. W. Kang, C. H. Yang, S. G. Rhee & S. E. Ryu, (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* 5: 400-406.
- Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson & B. N. Ames, (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41: 753-762.
- Copley, S. D., W. R. Novak & P. C. Babbitt, (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43: 13981-13995.
- Cosgrove, K., G. Coutts, I. M. Jonsson, A. Tarkowski, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond & S. J. Foster, (2007) 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* 189: 1025-1035.

- Cox, G. M., H. C. McDade, S. C. Chen, S. C. Tucker, M. Gottfredsson, L. C. Wright, T. C. Sorrell, S. D. Leidich, A. Casadevall, M. A. Ghannoum & J. R. Perfect, (2001) Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology* 39: 166-175.
- Crouch Brewer, S., R. G. Wunderink, C. B. Jones & K. V. Leeper, Jr., (1996) Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 109: 1019-1029.
- Declercq, J. P., C. Evrard, A. Clippe, D. V. Stricht, A. Bernard & B. Knoop, (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *Journal of molecular biology* 311: 751-759.
- Denning, G. M., M. A. Railsback, G. T. Rasmussen, C. D. Cox & B. E. Britigan, (1998) *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *The American journal of physiology* 274: L893-900.
- Ding, M., X. Shi, Y. Lu, C. Huang, S. Leonard, J. Roberts, J. Antonini, V. Castranova & V. Vallyathan, (2001) Induction of activator protein-1 through reactive oxygen species by crystalline silica in JB6 cells. *The Journal of biological chemistry* 276: 9108-9114.
- Drenkard, E., (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection* 5: 1213-1219.
- Dunkley, M., R. Pabst & A. Cripps, (1995) An important role for intestinally derived T cells in respiratory defence. *Immunol Today* 16: 231-236.
- Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galan, R. A. Flavell & L. Alexopoulou, (2006) Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12487-12492.
- Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller & D. W. Frank, (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Molecular microbiology* 25: 547-557.
- Fisher, A. B., C. Dodia, Y. Manevich, J. W. Chen & S. I. Feinstein, (1999) Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *The Journal of biological chemistry* 274: 21326-21334.
- Fujimoto, J., J. P. Wiener-Kronish, S. Hashimoto & T. Sawa, (2002) Effects of Cl2MDP-encapsulating liposomes in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *J Liposome Res* 12: 239-257.
- Ganendren, R., E. Carter, T. Sorrell, F. Widmer & L. Wright, (2006) Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8: 1006-1015.
- Garrity-Ryan, L., B. Kazmierczak, R. Kowal, J. Comolli, A. Hauser & J. Engel, (2000) The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infection and immunity* 68: 7100-7113.

- Gaynes, R. & J. R. Edwards, (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41: 848-854.
- Girard, G. & G. V. Bloemberg, (2008) Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol* 3: 97-106.
- Gonzalez-Juarrero, M. & I. M. Orme, (2001) Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 69: 1127-1133.
- Gwinn, M. R. & V. Vallyathan, (2006) Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 9: 27-39.
- Hall, A., K. Nelson, L. B. Poole & P. A. Karplus, (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants & redox signaling* 15: 795-815.
- Hare, N. J., N. E. Scott, E. H. Shin, A. M. Connolly, M. R. Larsen, G. Palmisano & S. J. Cordwell, (2011) Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* 11: 3056-3069.
- Hauser, A. R. & J. N. Engel, (1999) *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infection and immunity* 67: 5530-5537.
- Haussler, S., (2004) Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 6: 546-551.
- He, J., R. L. Baldini, E. Deziel, M. Saucier, Q. Zhang, N. T. Liberati, D. Lee, J. Urbach, H. M. Goodman & L. G. Rahme, (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2530-2535.
- Herzenberg, L. A., J. Tung, W. A. Moore & D. R. Parks, (2006) Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature immunology* 7: 681-685.
- Hirotsu, S., Y. Abe, K. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino & T. Hakoshima, (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12333-12338.
- Hofmann, B., H. J. Hecht & L. Flohe, (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383: 347-364.
- Hu, Y. & A. R. Coates, (2009) Acute and persistent *Mycobacterium tuberculosis* infections depend on the thiol peroxidase Tpx. *PLoS one* 4: e5150.
- Iiyama, K., Y. Chieda, J. M. Lee, T. Kusakabe, C. Yasunaga-Aoki & S. Shimizu, (2007) Effect of superoxide dismutase gene inactivation on virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl Environ Microbiol* 73: 1569-1575.

- Irani, K. & P. J. Goldschmidt-Clermont, (1998) Ras, superoxide and signal transduction. *Biochemical pharmacology* 55: 1339-1346.
- Jenal, U. & J. Malone, (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* 40: 385-407.
- Johansen, H. K., H. P. Hougen, J. Rygaard & N. Hoiby, (1996) Interferon-gamma (IFN-gamma) treatment decreases the inflammatory response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats. *Clinical and experimental immunology* 103: 212-218.
- Juhas, M., L. Eberl & B. Tummler, (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 7: 459-471.
- Kalyanaraman, B., V. Darley-USmar, K. J. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts, 2nd & H. Ischiropoulos, (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine* 52: 1-6.
- Kamath, J. M., B. E. Britigan, C. D. Cox & D. M. Shasby, (1995) Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits prostacyclin release from endothelial cells. *Infection and immunity* 63: 4921-4923.
- Kang, J. L., Y. H. Go, K. C. Hur & V. Castranova, (2000a) Silica-induced nuclear factor-kappaB activation: involvement of reactive oxygen species and protein tyrosine kinase activation. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 60: 27-46.
- Kang, J. L., H. S. Lee, I. S. Pack, S. Leonard & V. Castranova, (2001) Iron tetrakis (n-methyl-4'-pyridyl) porphyrinato (FeTMPyP) is a potent scavenging antioxidant and an inhibitor of stimulant-induced NF-kappaB activation of raw 264.7 macrophages. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 64: 291-310.
- Kang, J. L., I. S. Pack, S. M. Hong, H. S. Lee & V. Castranova, (2000b) Silica induces nuclear factor-kappa B activation through tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha in RAW264.7 macrophages. *Toxicology and applied pharmacology* 169: 59-65.
- Karplus, P. A. & A. Hall, (2007) Structural survey of the peroxiredoxins. *Subcell Biochem* 44: 41-60.
- Kawai, T. & S. Akira, (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11: 373-384.
- Kiffer, C., A. Hsiung, C. Oplustil, J. Sampaio, E. Sakagami, P. Turner & C. Mendes, (2005) Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 9: 216-224.
- Kim, K., Y. U. Kim, B. H. Koh, S. S. Hwang, S. H. Kim, F. Lepine, Y. H. Cho & G. R. Lee, (2010) HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway. *Immunology* 129: 578-588.
- Kirisits, M. J. & M. R. Parsek, (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol* 8: 1841-1849.

- Knoops, B., E. Loumaye & V. Van Der Eecken, (2007) Evolution of the peroxiredoxins. *Subcell Biochem* 44: 27-40.
- Koh, A. Y., G. P. Priebe, C. Ray, N. Van Rooijen & G. B. Pier, (2009) Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and immunity* 77: 5300-5310.
- Kooguchi, K., S. Hashimoto, A. Kobayashi, Y. Kitamura, I. Kudoh, J. Wiener-Kronish & T. Sawa, (1998) Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and immunity* 66: 3164-3169.
- Kumar, C. P., S. S. Kumar & T. Menon, (2006) Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 161: 213-218.
- LeBlanc, J. J., R. J. Davidson & P. S. Hoffman, (2006) Compensatory functions of two alkyl hydroperoxide reductases in the oxidative defense system of *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology* 188: 6235-6244.
- Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme & F. M. Ausubel, (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7: R90.
- Lee, J. S., Y. J. Heo, J. K. Lee & Y. H. Cho, (2005) KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infection and immunity* 73: 4399-4403.
- Lee, S. P., Y. S. Hwang, Y. J. Kim, K. S. Kwon, H. J. Kim, K. Kim & H. Z. Chae, (2001) Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 276: 29826-29832.
- Lei, D., J. R. Lancaster, Jr., M. S. Joshi, S. Nelson, D. Stoltz, G. J. Bagby, G. Odom, J. E. Shellito & J. K. Kolls, (1997) Activation of alveolar macrophages and lung host defenses using transfer of the interferon-gamma gene. *The American journal of physiology* 272: L852-859.
- Lesic, B., F. Lepine, E. Deziel, J. Zhang, Q. Zhang, K. Padfield, M. H. Castonguay, S. Milot, S. Stachel, A. A. Tzika, R. G. Tompkins & L. G. Rahme, (2007) Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog* 3: 1229-1239.
- Li, S., N. A. Peterson, M. Y. Kim, C. Y. Kim, L. W. Hung, M. Yu, T. Lakin, B. W. Segelke, J. S. Lott & E. N. Baker, (2005) Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. *Journal of molecular biology* 346: 1035-1046.
- Loumaye, E., G. Ferrer-Sueta, B. Alvarez, J. F. Rees, A. Clippe, B. Knoops, R. Radi & M. Trujillo, (2011) 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* 514: 1-7.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon & G. B. Pier, (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2: 1051-1060.

Manevich, Y., S. I. Feinstein & A. B. Fisher, (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3780-3785.

Martinon, F., A. Mayor & J. Tschopp, (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 27: 229-265.

Mizohata, E., H. Sakai, E. Fusatomi, T. Terada, K. Murayama, M. Shirouzu & S. Yokoyama, (2005) Crystal structure of an archaeal peroxiredoxin from the aerobic hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Journal of molecular biology* 354: 317-329.

Mongkolsuk, S., W. Whangsuk, P. Vattanaviboon, S. Loprasert & M. Fuangthong, (2000) A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (ahpC) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *Journal of bacteriology* 182: 6845-6849.

Monteiro, G., B. B. Horta, D. C. Pimenta, O. Augusto & L. E. Netto, (2007) 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* 104: 4886-4891.

Morissette, C., C. Francoeur, C. Darmond-Zwaig & F. Gervais, (1996) Lung phagocyte bactericidal function in strains of mice resistant and susceptible to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 64: 4984-4992.

Moynagh, P. N., (2009) The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. *Trends in immunology* 30: 33-42.

Mutlu, G. M. & R. G. Wunderink, (2006) Severe pseudomonal infections. *Curr Opin Crit Care* 12: 458-463.

Nelson, K. J., S. T. Knutson, L. Soito, C. Klomsiri, L. B. Poole & J. S. Fetrow, (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* 79: 947-964.

Nicastro, G. G., A. L. Boechat, C. M. Abe, G. H. Kaihama & R. L. Baldini, (2009) *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiol Letters* 301: 115-123.

O'Malley, Y. Q., K. J. Reszka, G. T. Rasmussen, M. Y. Abdalla, G. M. Denning & B. E. Britigan, (2003) The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 285: L1077-1086.

Park, Y., B. Bearson, S. Bang, I. Bang & J. Foster, (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* 20: 605-616.

Passalacqua, K. D., N. H. Bergman, A. Herring-Palmer & P. Hanna, (2006) The superoxide dismutases of *Bacillus anthracis* do not cooperatively protect against endogenous superoxide stress. *Journal of bacteriology* 188: 3837-3848.

Pawate, S., Q. Shen, F. Fan & N. R. Bhat, (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res* 77: 540-551.

Pedrajas, J. R., C. A. Padilla, B. McDonagh & J. A. Barcena, (2010) Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants & redox signaling* 13: 249-258.

Peschel, A., R. Jack, M. Otto, L. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K. van Kessel & J. van Strijp, (2001) *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *The Journal of experimental medicine* 193: 1067-1143.

Peshenko, I. V. & H. Shichi, (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free radical biology & medicine* 31: 292-303.

Pires, E. J. V. C., V. V. da Silva, Jr., A. C. S. Lopes, D. L. Veras, L. E. Leite & M. A. V. Maciel, (2009) Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Rev. bras. ter. intensiva* 21: 384-390.

Poole, L. B., C. M. Reynolds, Z. A. Wood, P. A. Karplus, H. R. Ellis & M. Li Calzi, (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6126-6133.

Prince, L. R., S. M. Bianchi, K. M. Vaughan, M. A. Bewley, H. M. Marriott, S. R. Walmsley, G. W. Taylor, D. J. Buttle, I. Sabroe, D. H. Dockrell & M. K. Whyte, (2008) Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin. *J Immunol* 180: 3502-3511.

Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins & F. M. Ausubel, (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.

Ralat, L. A., S. A. Misquitta, Y. Manevich, A. B. Fisher & R. F. Colman, (2008) Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and 1-cysteine peroxiredoxin. *Archives of biochemistry and biophysics* 474: 109-118.

Ralph Snyderman, M. C. P., Dina G. Fischer, Hillel S. Koren, (1977) Biologic and Biochemical Activities of Continuous Macrophage Cell Lines P388D1 and J774.1. *J. Immunol.* 119: 2060 - 2066.

Ramphal, R., V. Balloy, J. Jyot, A. Verma, M. Si-Tahar & M. Chignard, (2008) Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol* 181: 586-592.

Raoust, E., V. Balloy, I. Garcia-Verdugo, L. Touqui, R. Ramphal & M. Chignard, (2009) *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS one* 4: e7259.

Roederer, M., (2001) Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45: 194-205.

- Rouhier, N. & J. P. Jacquot, (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free radical biology & medicine* 38: 1413-1421.
- Salunkhe, P., T. Topfer, J. Buer & B. Tummler, (2005) Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *Journal of bacteriology* 187: 2565-2572.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In.: Cold Spring Harbor Laboratory, pp.
- Sarma, G. N., C. Nickel, S. Rahlfs, M. Fischer, K. Becker & P. A. Karplus, (2005) Crystal structure of a novel Plasmodium falciparum 1-Cys peroxiredoxin. *Journal of molecular biology* 346: 1021-1034.
- Sato, H., Frank, DW, (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* 53: 1279 – 1290.
- Schreck, R., P. Rieber & P. A. Baeuerle, (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal* 10: 2247-2258.
- Schroder, E., J. A. Littlechild, A. A. Lebedev, N. Errington, A. A. Vagin & M. N. Isupov, (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* 8: 605-615.
- Schultz, M. J., A. W. Rijneveld, P. Speelman, S. J. van Deventer & T. van der Poll, (2001) Endogenous interferon-gamma impairs bacterial clearance from lungs during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *European cytokine network* 12: 39-44.
- Schuster, M. & E. P. Greenberg, (2006) A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296: 73-81.
- Seaver, L. C. & J. A. Imlay, (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 183: 7173-7181.
- Seo, M. S., S. W. Kang, K. Kim, I. C. Baines, T. H. Lee & S. G. Rhee, (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *The Journal of biological chemistry* 275: 20346-20354.
- Simon, R., U. Priefer & A. Puhler, (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology (N Y)* 1: 784-790.
- Sorensen, R. U. & J. D. Klinger, (1987) Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. *Antibiotics and chemotherapy* 39: 113-124.
- Stinavage, P., L. Martin & J. Spitznagel, (1989) O antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to nonoxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. *Infection and immunity* 57: 3894-4794.

Studier, F. W. & B. A. Moffatt, (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189: 113-130.

Sutterwala, F. S., L. A. Mijares, L. Li, Y. Ogura, B. I. Kazmierczak & R. A. Flavell, (2007) Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of experimental medicine* 204: 3235-3245.

Teixeira, P. J. Z., R. A. Corrêa, J. L. P. Silva & F. Lundgreen, (2007) Diretrizes brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica. *J Bras Pneumol* 33 (supl 1): S1-S30.

Tralau, T., S. Vuilleumier, C. Thibault, B. J. Campbell, C. A. Hart & M. A. Kertesz, (2007) Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 189: 6743-6750.

Trent, M., A. Ribeiro, S. Lin, R. Cotter & C. Raetz, (2001) An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *The Journal of biological chemistry* 276: 43122-43153.

Tsai, J. W. & M. R. Alley, (2000) Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the *Caulobacter* major chemotaxis operon. *Journal of bacteriology* 182: 504-507.

Usher, L. R., R. A. Lawson, I. Geary, C. J. Taylor, C. D. Bingle, G. W. Taylor & M. K. Whyte, (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168: 1861-1868.

Van Delden, C. & B. H. Iglewski, (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 4: 551-560.

Vandal, O., L. Pierini, D. Schnappinger, C. Nathan & S. Ehrt, (2008) A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 14: 849-903.

Vasil, M. L., R. M. Berka, G. L. Gray & H. Nakai, (1982) Cloning of a phosphate-regulated hemolysin gene (phospholipase C) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 152: 431-440.

Wagner, V. E. & B. H. Iglewski, (2008) *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol*.

West, A. P., I. E. Brodsky, C. Rahner, D. K. Woo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. C. Walsh, Y. Choi, G. S. Shadel & S. Ghosh, (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472: 476-480.

Westbrock-Wadman S, S. D., Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrenner P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK, (1999) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 2975-2983.

Wiehlmann, L., A. Munder, T. Adams, M. Juhas, H. Kolmar, P. Salunkhe & B. Tummli, (2007) Functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to identify habitat-specific determinants of pathogenicity. *Int J Med Microbiol* 297: 615-623.

Williams, B. J., J. Dehnbostel & T. S. Blackwell, (2010) *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* 15: 1037-1056.

Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. G. Miyada & S. Lory, (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8484-8489.

Wood, Z. A., L. B. Poole, R. R. Hantgan & P. A. Karplus, (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 41: 5493-5504.

Yang, C. S., D. S. Lee, C. H. Song, S. J. An, S. Li, J. M. Kim, C. S. Kim, D. G. Yoo, B. H. Jeon, H. Y. Yang, T. H. Lee, Z. W. Lee, J. El-Benna, D. Y. Yu & E. K. Jo, (2007) Roles of peroxiredoxin II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock. *The Journal of experimental medicine* 204: 583-594.

7. Anexo

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO Nº 08/2012

Certifico que o Projeto “Envolvimento da peroxiredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*”, desenvolvido sob responsabilidade da **Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 29/06/2012.

We attest that the project entitled “Envolvimento da peroxiredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*”, developed under the responsibility of Dr. **Regina Lúcia Baldini**, in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 6/29/2012.

São Paulo, 29 de junho de 2012.

Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

8. SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS *PESSOAIS*

Nome: Gilberto Hideo Kaihami

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP.

Data de nascimento: 23/08/1986

2. FORMAÇÃO

2.1 Pós-graduação

2010-2012 Mestrado em Bioquímica

Universidade de São Paulo

Instituto de Química – Departamento de Bioquímica

São Paulo, SP

Título: Envolvimento da peroxirredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.

Orientadora: Regina Lúcia Baldini

Bolsista do CNPq

2.2 Ensino Superior

2005 – 2010 Graduação em Farmácia-Bioquímica.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

3. MONITORIAS

2011 - 2011 PAE-Monitoria em Bioquímica (Curso: Biociências)

Universidade de São Paulo

2012 - 2012 PAE-Monitoria em Biologia Molecular (Curso: Farmácia-Bioquímica)

Universidade de São Paulo

2012 – 2012 PAE-Monitoria em Biologia Molecular (Curso: Farmácia-Bioquímica)

Universidade de São Paulo

4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

56o Congresso Brasileiro de Genética. Caracterização da resposta de macrófagos frente à *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e linhagens mutantes para o sistema de dois componentes RcsCB. **2010**. (Congresso). (Autores: Kaihami, G.H., Baldini, R.L., Almeida, S.R.)

XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Involvement of the 1-Cys peroxiredoxin LsfA in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **2012**. (Congresso). (Autores: Kaihami, G.H., Santos, S.S., Almeida, S.R., Baldini, R.L.)

XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, V Extra Section of Clinical Immunology. *Pseudomonas aeruginosa* 1-Cys Peroxiredoxin LsfA is involved in virulence. **2012**. (Congresso) (Autores: Kaihami, G.H., Santos, S.S., Almeida, J.R.F., Almeida, S.R., Baldini, R.L.)

5. Artigos

NICASTRO, G. G. ; BOECHAT, A. L. ; ABE, C. M. ; KAIHAMI, G. H. ; BALDINI, R. L. . *Pseudomonas aeruginosa* PA14 cupD transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. FEMS Microbiology Letters, v. 301, p. 115-123, 2009.

6. Prêmios

2010 Menção Honrosa para o trabalho do aluno Gilberto Hideo Kaihami no PRÊMIO INICIAÇÃO CIENTÍFICA no 56º Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética.