



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM



LEONARDO SILVA ROCHA

ESTUDO DO PAPEL DA PEROXIRREDOXINA AHPC1 NA
SUBVERSÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* À OXIDANTES GERADOS
NA INFLAMAÇÃO

VITÓRIA DA CONQUISTA - BA
MAIO - 2019

LEONARDO SILVA ROCHA

**ESTUDO DO PAPEL DA PEROXIRREDOXINA AHPC1 NA
SUBVERSÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* À OXIDANTES GERADOS
NA INFLAMAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Carla Meotti

VITÓRIA DA CONQUISTA - BA

MAIO – 2019

TERMO DE APROVAÇÃO**LEONARDO SILVA ROCHA****ESTUDO DO PAPEL DA PEROXIRREDOXINA AHPC1 NA SUBVERSÃO DE
Pseudomonas aeruginosa À OXIDANTES GERADOS NA INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular)

_____ de _____ de 2019

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz
Departamento de Ciências Naturais
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Dr. Diogo de Abreu Meireles
Instituto de Biologia
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Instituto Multidisciplinar de Saúde
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu cuidado, por me guiar e por ter me dado forças para superar todos os desafios e seguir em frente acreditando que tudo é possível.

Aos meus pais, pelo exemplo de pessoas humanas e humildes. Por sempre me mostrar o caminho certo, me apoiar e acreditando em mim! Por muitas vezes abdicar de seus sonhos em prol dos meus. Amo vocês.

Às minhas irmãs, pela amizade, companheirismo e por terem aturado meus “surto” todos esses anos. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos Alfredo, Isabella e Inácio por deixar meus dias mais leves! Amo vocês.

À minha namorada, Ayala pela paciência, companheirismo, por compreender a distância e torcer sempre pelo meu sucesso. Te amo.

Ao professor Raphael Ferreira Queiroz, pela orientação, paciência e por todos os conhecimentos passados ao longo desses quase dois anos, meu muito obrigado.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Médica Camila, Tássia e Aline vocês certamente deixaram meus dias mais leves. Muito obrigado por ouvir minhas lamúrias, desabafos, pelos conhecimentos compartilhados, auxílio nos experimentos e pela convivência diária, vocês são demais!

Aos amigos da UFBA Dani e Thiago, muito obrigado pela amizade, companheirismo e por todo o apoio na condução dos estudos com modelo animal. Vocês são 10!

À Lore por todo suporte dado durante os experimentos envolvendo o modelo animal.

À Lipe, pela amizade, resenhas, paciência para ouvir os desabafos, ajuda na pesquisa e por de fato doar o sangue para a realização deste trabalho. Meu muito obrigado!

À Ramon pelas discussões enriquecedoras, viagens (bate-volta) e pela amizade.

Aos demais mais colegas do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular pelas discussões e conhecimentos compartilhados.

Aos professores do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da UESB pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos professores da UFBA que desde a graduação são sempre muito solícitos e dispostos a ajudar, em especial aos professores Lucas Marques, Robson Amaro e Regiane Yatsuda pelo apoio e por disponibilizarem seus laboratórios para realização de experimentos.

À professora Flávia Carla Meotti, pela co-orientação e por me receber tão bem em seu laboratório no IQ/USP.

À Ray, pela ajuda e por todo conhecimento passado durante o período que fiquei no IQ/USP, você é demais!

À professora Regina Baldini do IQ/USP por ceder gentilmente as capas de *Pseudomonas aeruginosa* para a pesquisa.

Aos animais usados nos experimentos que involuntariamente “doaram” suas vidas, mas que certamente não serão em vão.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pelo suporte ao projeto.

*“O conhecimento serve para encantar
as pessoas, não para humilhá-las”*

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo oportunista que se adapta rapidamente aos mecanismos de defesa do hospedeiro ao produzir uma série de enzimas antioxidantes subvertem os efeitos nocivos dos oxidantes gerados pelos neutrófilos. Dentre essas, destacam-se as peroxirredoxinas, proteínas tiolicas, abundantes e altamente reativas com diferentes peróxidos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento da peroxirredoxina AhpC1 de *P. aeruginosa* na defesa contra o ácido hipocloroso (HOCl) e o hidroperóxido de urato (HOOU) *in vitro*, em neutrófilos e *in vivo*. As linhagens selvagem (WT) e mutantes (Δ ahpc1, Δ ohr, Δ ahpc2, Δ lsfa, Δ gpx e Δ ohrR) de *P. aeruginosa* (PA14) foram expostas *in vitro* ao HOCl, e no caso da cepa WT e Δ ahpc2 também ao HOOU, em diferentes concentrações por 30 min a 37°C em meio mínimo, seguido pela contagem das colônias residuais. Neutrófilos foram isolados de sangue humano por centrifugação gradiente, incubados com as bactérias WT ou Δ ahpc1 opsonizadas em PBS glicose, na presença ou ausência de ácido úrico, antes da contagem bacteriana. Posteriormente, camundongos machos C57BL/6 (n=8) foram infectados por via intranasal com as cepas selvagem e mutante em AhpC1 para induzir pneumonia aguda. Após 24 h os animais foram eutanasiados para coleta do lavado broncoalveolar, pulmões, baço e fígado. O lavado broncoalveolar foi avaliado quanto aos níveis de nitrito e infiltrado leucocitário. Baço, fígado e o lobo direito do pulmão foram então macerados para determinação das unidades formadoras de colônias. Em seguida, o restante dos pulmões foram analisados por histologia (contagem de neutrófilos), métodos bioquímicos (dosagem de nitrito, peroxidação lipídica e atividade peroxidásica da MPO) e expressão de TNF- α e IL-6. Dentre as mutantes testadas, observou-se que a cepa Δ ahpc1 foi sete vezes mais sensível ao HOCl quando comparada com a linhagem selvagem. Também, o HOOU em até 20 μ M causou a morte de 50% da Δ ahpc1 ao passo que não interferiu na sobrevivência da cepa WT em concentrações até 100 μ M. A linhagem Δ ahpc1 opsonizada também foi mais sensível aos neutrófilos humanos quando comparados com as bactérias selvagens. As vias dependentes da NADPH oxidase foram responsáveis por aproximadamente 36 e 44% da morte das bactérias selvagens e Δ ahpc1, respectivamente, de acordo com os experimentos empregando-se apocinina (1 mM). A adição do antioxidante e substrato da mieloperoxidase, ácido úrico, aumentou a sobrevivência da cepa selvagem, todavia, inesperadamente reduziu a sobrevivência da bactéria mutante na enzima AhpC1, o que pode está associado com a formação do HOOU. Os experimentos de cinética rápida confirmaram que a AhpC de *Xylella fastidiosa*, que possui 61% de identidade com AhpC1 de PA14, reagiu

com H_2O_2 e HOOU em altas constantes de velocidade de segunda ordem ($k = 1,54 \pm 0,07 \times 10^8$ e $2,26 \pm 0,09 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), sugerindo o papel da enzima no consumo desses oxidantes. No modelo animal de pneumonia aguda, a cepa mutante na AhpC1 também foi mais susceptível à resposta imune do animal com menor número de colônias recuperadas nos tecidos pulmonar, esplênico e hepático, menor indução de citocinas, infiltrado leucocitário, peroxidação de lipídios e produção de nitrito quando comparada com a cepa selvagem. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez o papel central da enzima AhpC1 na sobrevivência e virulência de PA14 *in vitro*, em modelo celular e *in vivo*. Dessa forma, a enzima AhpC1 de *P. aeruginosa* pode ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novas moléculas direcionadas ao tratamento de infecções causadas por essa bactéria .

Palavras-chave: peroxirredoxinas, *Pseudomonas aeruginosa*, ácido hipocloroso, hidroperóxido de urato, neutrófilos.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic gram-negative bacillus that readily adapts to host defense mechanisms by producing a series of antioxidant enzymes that subvert the harmful effects of neutrophil-generated oxidants. Among these, we highlight peroxiredoxins, thiol proteins, abundant and highly reactive with different peroxides. In this context, the objective of this work was to investigate the involvement of *P. aeruginosa* peroxiredoxin AhpC1 on the defense against hypochlorous acid (HOCl) and uric hydroperoxide (HOOU) *in vitro*, in human neutrophils and *in vivo*. Wild (WT) and mutant (Δ *ahpc1*, Δ *ohr*, Δ *ahpc2*, Δ *lsfa*, Δ *gpx* e Δ *ohrR*) lineages of *P. aeruginosa* (PA14) were exposed *in vitro* to HOCl, or also HOOU in case of WT and Δ *ahpc1* bacteria, at different concentrations for 30 min at 37°C in minimal medium, followed by counting the residual colonies. Neutrophils were isolated from human blood by gradient centrifugation, incubated with opsonized WT or Δ *ahpc1* strains in PBS-glucose, in the presence or absence of uric acid, before residual bacterial counting. Subsequently, male C57BL/6 mice (n = 8) were intranasally infected with WT and Δ *ahpc1* bacteria to induce acute pneumonia. After 24 h the animals were euthanized for collection of bronchoalveolar lavage, lungs, spleen and liver. Bronchoalveolar lavage was evaluated for nitrite levels and leukocyte infiltrate. Spleen, liver and right lung were macerated for determination of colony-forming units. The left lung was analyzed by histology (neutrophil counting), biochemical methods (nitrite dosage, lipid peroxidation and MPO-peroxidase activity) and expression of TNF- α and IL-6. Among the mutants, Δ *ahpc1* strain was found to be seven-fold more sensitive to HOCl in comparison to WT strain. Also, HOOU at up to 20 μ M caused 50% Δ *ahpc1* death while but did not interfere with WT bacteria survival at concentrations of up to 100 μ M. In addition, Δ *ahpc1* lineage was more sensitive to human neutrophils compared to WT bacteria. Subsequently, NADPH oxidase-dependent pathways play for approximately 36 and 44% of WT and Δ *ahpc1* killing, respectively, according to experiments containing apocynin (1 mM). The addition of uric acid, known antioxidant and myeloperoxidase substrate, increased WT strain survival. Surprisingly, uric acid enhanced Δ *ahpc1* killing, which may be associated with HOOU formation. Rapid kinetics experiments confirmed that *Xylella fastidiosa* AhpC, which shows 61% of identity to PA14 AhpC1, reacted with H₂O₂ and HOOU at high second order rate constants ($k = 1.54 \pm 0.07 \times 10^8$ e $2.26 \pm 0.09 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹, respectively), suggesting its role in these oxidant consumption. In the murine model of acute pneumonia, Δ *ahpc1* strain was also more susceptible to mice immune response because few colonies was recovered from lung, spleen and liver, in addition to lesser inflammatory cytokines induction, leukocyte infiltration, lipid peroxidation and nitrite levels

in comparison to WT lineage. Our results demonstrated for the first time that AhpC1 has a central role for PA14 survival and virulence *in vitro*, in cells and *in vivo*. Therefore, AhpC1 of *P. aeruginosa* may be a potential target for development of new drugs against bacterial infections.

Keywords: peroxiredoxins, *Pseudomonas aeruginosa*, hypochlorous acid, urate droperoxide, neutrophils.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO	4
3.1 Revisão de literatura	4
3.1.1 Resposta imune inata	4
3.1.2 Mieloperoxidase	5
3.1.3 Ácido úrico	6
3.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
3.1.5 Peroxirredoxinas	8
3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO	11
3.2.1 Introdução	13
3.2.2 Materiais e métodos	14
3.2.2.1 Materiais e reagentes	14
3.2.2.2 Obtenção da linhagem mutante de PA14	15
3.2.2.3 Avaliação da atividade bactericida do HOCl	15
3.2.2.4 Isolamento de neutrófilos de sangue humano periférico	15
3.2.2.5 Avaliação da atividade bactericida de neutrófilos	16
3.2.2.6 Síntese química e quantificação do HOOU	16
3.2.2.7 Avaliação da atividade bactericida do HOOU	17
3.2.2.8 Análise da homologia entre a AhpC1 de <i>P. aeruginosa</i> e AhpC de <i>Xylella fastidiosa</i>	17
3.2.2.9 Expressão da proteína recombinante	18
3.2.2.10 Purificação da proteína recombinante	19
3.2.2.11 Redução e quantificação do tiol da proteína	20
3.2.2.12 Determinação da cinética de reação	20
3.2.2.13 Modelo animal.....	21
3.2.2.14 Infecção intranasal	21
3.2.2.15 Coleta do lavado broncoalveolar e órgãos.	21
3.2.2.16 Análise do LBA.....	22
3.2.2.17 Determinação das concentrações de nitrito no lavado broncoalveolar.....	22
3.2.2.18 Contagem das unidades formadoras de colônias nos tecidos	22
3.2.2.19 Análise histológicas	22
3.2.2.20 Determinação das concentrações de proteínas das amostras.....	23
3.2.2.21 Atividade peroxidásica nas amostras dos pulmões dos camundongos.....	23
3.2.2.22 Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico	23
3.2.2.23 Avaliação do nível de transcrição de citocinas.....	24
3.2.2.24 Análise estatística	25
3.2.3 Resultados.....	25
3.2.4 Discussão	34
3.2.5 Conflitos de interesse.....	37
3.2.6 Agradecimentos.....	37
3.2.7 Fontes de financiamento.....	38
REFERÊNCIAS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alinhamento entre os aminoácidos das proteínas AhpC1 de PA14 e AhpC de <i>X. fastidiosa</i>	18
Figura 2. Curva de inibição de crescimento das cepas WT e Δ <i>ahpc1</i> de PA14 na presença de HOCl.....	26
Figura 3. Sobrevivência bacteriana ao <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos e efeito do ácido úrico na sobrevivência das cepas WT e Δ <i>ahpc1</i> de PA14.....	27
Figura 4. Sobrevivência bacteriana ao HOOU em cepas PA14 WT e PA14 Δ <i>ahpc</i> <i>in vitro</i>	28
Figura 5. Cinética de oxidação da AhpC1 pelo H ₂ O ₂ e HOOU.....	29
Figura 6. A AhpC1 confere virulência a PA14 durante a infecção pulmonar.....	30
Figura 7. Contagem de leucócitos totais e de neutrófilos no LBA após 24 h de infecção, e fotomicrografias representativas da contagem de células no LBA.....	31
Figura 8. Contagem de neutrófilos no tecido pulmonar, atividade peroxidásica por TMB e fotomicrografias representativas da contagem de neutrófilos nas lâminas do tecido pulmonar.....	32
Figura 9. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido pulmonar e de nitrito no LBA.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de bases nitrogenada utilizadas para a construção dos <i>primers</i>	24
Tabela 2. IC ₅₀ do HOCl incubado com as bactérias selvagem e mutantes.....	25
Tabela 3. Expressão das citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar dos animais expostos as cepas WT e Δ <i>ahpC1</i> de PA14.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABAH – Hidrazida do ácido 4-aminobenzóico, do inglês *4-aminobenzoic acid hydrazide*;
- AhpC – Alquil hidroperóxido redutase subunidade C;
- ANOVA – Análise de variância, do inglês *analysis of variance*;
- APO – Apocinina;
- Cys-P – Cisteína peroxidásica;
- Cys-R – Cisteína de resolução;
- dHL-60 – Células HL-60 diferenciadas em neutrófilos;
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*;
- DTPA – Ácido dietilenotriaminopentacético, do inglês *diethylenetriaminepentaacetic acid*;
- GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;
- HOCl – Ácido hipocloroso;
- HOOU – Hidroperóxido de urato;
- IL-1 β – Interleucina-1 β ;
- IL-6 – Interleucina-6;
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível;
- LB – Caldo Luria, do inglês *Luria Broth*;
- LBA – Lavado broncoalveolar;
- MH – Müeller hinton;
- MPO – Mieloperoxidase;
- MPO-I – Composto I da mieloperoxidase;
- MPO-II – Composto II da mieloperoxidase;
- NaCl – Cloreto de sódio;
- NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;
- NaOH – Hidróxido de sódio;
- NO \cdot – Óxido nítrico;
- NO₂⁻ – Nitrito;
- O₂⁻ – Ânion radical superóxido;
- \cdot OH – Radical hidroxila;
- ONOO⁻ – Peroxinitrito;
- PBS – Tampão fosfato salino, do inglês *phosphate saline buffer*;
- Prx – Peroxirredoxina;

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês *real time polymerase chain reaction*;

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*;

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*;

SOD – Superóxido dismutase;

TBARs – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*;

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumoral necrosis factor alfa*;

UFC – Unidade formadora de colônia;

WT – Cepa selvagem, do inglês *wild type*.

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo oportunista responsável por uma gama de infecções nosocomiais, que acometem principalmente pacientes críticos, imunocomprometidos, que sofreram grandes queimaduras, portadores de distúrbios metabólicos e fibrose cística [1,2]. Essa bactéria se adapta rapidamente aos mecanismos de defesa do hospedeiro e ao tratamento farmacológico convencional ao produzir uma série de fatores de virulência. Esses fatores favorecem a ocorrência de sepse por *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, elevam as taxas de mortalidade nos hospitais [3,4,2].

A ativação dos fagócitos em indivíduos imunocompetentes é fundamental para limitar ou eliminar agentes infecciosos, incluindo as bactérias. Dentre os fagócitos, destacam-se os neutrófilos por constituírem a primeira linha de defesa do organismo em processos agudos além de serem os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea. Na presença de bactérias, os neutrófilos podem atuar por mecanismos não oxidativos e oxidativos, que embora distintos, são complementares durante a resposta imune [5].

O maquinário não oxidativo compreende a fagocitose e destruição da bactéria por enzimas como lisozima, catepsina G, proteinase 3, elastase e lactoferrina [6], bem como a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) [7]. Na fase oxidativa, enzimas pró-oxidantes, como a nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) e mieloperoxidase (MPO), são ativadas e, por conseqüência, as genericamente chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em alta concentração com o objetivo de oxidar as biomoléculas do micro-organismo invasor, levando-o à morte [8,5].

O complexo multimérico da NADPH oxidase é responsável por reduzir O_2 ao $O_2^{\bullet-}$ que, por sua vez, dismuta-se ao H_2O_2 espontaneamente ou mediado pela superóxido dismutase (SOD) [9,10]. A MPO amplifica o potencial oxidativo de seu co-substrato H_2O_2 ao formar HOCl ou radicais livres (ex. tirosila, ascorbila, glutacionila, $\bullet NO_2$, etc) através dos ciclos clorinante e peroxidásico, respectivamente. Apesar de serem extremamente importantes para a defesa imune inata mediada por neutrófilos, essas espécies podem modificar as biomoléculas do hospedeiro na inflamação sustentada e contribuir com o dano tecidual associado à diversas doenças inflamatórias [11,6].

Em condições fisiológicas, as células dispõem de mecanismos antioxidantes para contrabalancear os efeitos deletérios de ROS produzidos endogenamente, os quais podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. O aparato enzimático é composto principalmente pelas enzimas SOD, catalase, peroxirredoxinas (Prx), glutaciona peroxidase, glutaciona redutase,

dentre muitas outras. Entre os principais antioxidantes endógenos não enzimáticos extracelulares estão proteínas/peptídeos com grupamento tiol (800-1000 μM), sendo a albumina a principal representante; ácido úrico (150-400 μM); ácido ascórbico (30-150 μM); tocoferol (20-50 μM) e carotenoides (0,08-3 μM) [12,13]. Destes, o ácido úrico é um importante antioxidante fisiológico derivado do metabolismo das purinas com grande versatilidade além da alta concentração relativa no plasma [14].

A ação protetora do ácido úrico ainda é um paradoxo uma vez que seus benefícios dependem da concentração plasmática e do ambiente onde está localizado. Durante o processo inflamatório, a MPO pode oxidar o ácido úrico ao hidroperóxido de urato (HOOU) na presença de H_2O_2 , sendo um mediador em potencial da aterogênese [15,16]. Além disso, dados recentes demonstraram que o ácido úrico desvia o ciclo clorinante da MPO para a formação de HOOU, ao passo que protegeu uma cepa altamente virulenta de *P. aeruginosa* (linhagem PA14) contra a morte causada por neutrófilos de cultura (dHL-60) [17]. Esses achados corroboram com o estudo de Akbar e colaboradores [18] que apontam maior risco de sepse em pacientes hiperuricêmicos.

Os mecanismos pelos quais *P. aeruginosa* subverte o efeito oxidante do HOOU e de HOCl ainda não são compreendidos. Por exemplo, a linhagem PA14 foi capaz de sobreviver à exposição ao H_2O_2 por expressar a Prx LsfA [19]. Uma vez que as Prx são enzimas antioxidantes ubiquamente distribuídas na natureza e possuem uma série de substratos já descritos [20,21], sugere-se que as Prx da PA14 possam conferir resistência à bactéria contra ambos oxidantes. Assim, a elucidação dos mecanismos moleculares e bioquímicos relacionados à virulência da PA14 poderá contribuir futuramente no desenvolvimento de novas moléculas com propriedades antibacterianas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a relação da enzima AhpC1 de *P. aeruginosa* com a sobrevivência bacteriana frente ao *burst* oxidativo inflamatório.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade bactericida do HOCl contra as linhagens selvagem e mutantes de *P. aeruginosa* (PA14) para os genes *ahpc1*, *ohr*, *ahpc2*, *lsfa*, *gpx* e *ohrR*;

-

- Avaliar o efeito do ácido úrico sobre a atividade bactericida de neutrófilos contra as linhagens selvagem e mutante para o gene *ahpc1* de PA14;

- Avaliar a atividade bactericida do HOOU sobre as linhagens selvagem e mutante para o gene *ahpc1* de PA14 *in vitro*;

- Determinar a cinética da reação da proteína recombinante AhpC de *Xylella fastidiosa* com HOOU e HOCl, H₂O₂;

- Investigar a susceptibilidade de camundongos às cepas selvagem e mutante para o gene *ahpc1* num modelo animal de pneumonia aguda;

- Determinar a concentração de biomarcadores oxidativos e inflamatórios no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar dos animais infectados pelas cepas selvagem e mutante para o gene *ahpc1* de PA14;

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 CAPÍTULO 01: REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1 Resposta imune inata

A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos físicos, químicos e mecânicos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato. Os leucócitos são recrutados no processo inflamatório e participam ativamente da defesa do organismo através do reconhecimento e destruição de micro-organismos. Esses patógenos são reconhecidos por meio de receptores do tipo *toll* e outros receptores de reconhecimento padrão expressos na superfície celular (ex. padrões moleculares associados ao patógeno) além de induzirem a ativação da cascata do complemento [22].

Os leucócitos podem ser de maneira geral divididos em fagócitos e linfócitos, sendo os últimos associados essencialmente com a resposta imune adquirida. Os fagócitos profissionais se encarregam de eliminar os agentes invasores através da fagocitose, destruição enzimática, formação de radicais livres e oxidantes, e pela liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos ou NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*) [23]. Os fagócitos são compreendidos por monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, sendo os últimos relevantes em infecções bacterianas e demais processos agudos por serem as primeiras células a alcançar o sítio inflamatório além da sua abundância relativa [24,6].

Os neutrófilos quando ativados aumentam o consumo de O_2 durante o processo denominado *burst* oxidativo. As subunidades regulatórias $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p60^{phox}$ e $p67^{phox}$; [10,25] da enzima multimérica NADPH oxidase deslocam-se para a membrana do neutrófilo e, às custas do NADPH formado na via das pentoses, reduzem o O_2 ao $O_2^{\bullet-}$, que se dismuta espontaneamente, ou pela ação da SOD, em H_2O_2 e O_2 [9]. Esses produtos iniciais conduzem à formação de outros derivados do O_2 (OH^{\bullet} , NO_2^{\bullet} , peroxinitrila, intermediários ferrila), genericamente denominados de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Além da ativação da NADPH oxidase, a produção dessas espécies reativas depende de outras enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e as peroxidases presentes em macrófagos e neutrófilos [10,8].

3.1.2 Mieloperoxidase

As peroxidases compreendem um grupo de oxidorreductases que utilizam os peróxidos como aceptores de elétrons e podem ser do tipo hemeperoxidases ou tiolperoxidases de acordo com a presença do grupo heme ou tiois no sítio ativo, respectivamente. Dentre as hemeperoxidases, a MPO é particularmente importante devido sua abundância em grânulos azurofílicos de neutrófilos e por constituir cerca de 6% do peso dessas células [26,8]. A MPO amplifica o potencial oxidante do H_2O_2 através dos intermediários reativos MPO-I e MPO-II. Ao retornar para o estado nativo, a MPO pode fazê-lo por um passo de dois elétrons ou dois passos de um elétron cada às custas da oxidação de substratos endógenos, em vias chamadas de clorinante e peroxidásica, respectivamente [8].

No ciclo clorinante o cloreto e demais haletos são oxidados pela MPO ao respectivo ácido de halogênio, enquanto que no ciclo peroxidásico, pequenos substratos como aminoácidos, ascorbato e glutatona são convertidos em derivados radicalres. Há várias décadas o HOCl, formado a partir da oxidação do cloreto no ciclo clorinante, é uma das moléculas mais estudadas por ser considerado um produto específico da enzima e um potente agente oxidante [11,27,5]. É importante destacar que a MPO produz outras moléculas oxidantes além do HOCl em sistemas biológicos, e que também contribuem com o dano tecidual, como radicais tirosila, tiíla, oxigênio singlete (1O_2) e $\bullet NO_2$ [8,28].

O HOCl gerado durante o *burst* oxidativo é responsável por oxidar ampla gama de substratos [29]. Devido a alta reatividade, qualquer grupo oxidável no micro-organismo, como grupos sulfidrilas, centros ferro-enxofre, grupos heme e ácidos graxos insaturados são passíveis de serem oxidados pelo HOCl. As consequências desse processo incluem modificações e perda de função de biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, levando a desarranjos na estrutura e fisiologia celular, perda da integridade e capacidade de transporte da membrana, interrupção da cadeia transportadora de elétrons, supressão na replicação do material genético, dentre outros [30,31,32,33].

O papel da MPO como componente básico da defesa imune mediada por neutrófilos é inquestionável. No entanto, em condições de inflamação persistente, os produtos oriundos da catálise da MPO podem causar danos às biomoléculas do hospedeiro, o desempenha um papel importante em doenças inflamatórias crônicas [34]. Há relatos na literatura associando o aumento sérico de MPO e disfunção endotelial [35], Alzheimer e Parkinson [36], aterosclerose [37,38] e infarto agudo do miocárdio [39,40]. Por exemplo, a MPO limita a disponibilidade de NO^\bullet o que acarreta na progressão da aterogênese [41], enquanto que em

doenças neurodegenerativas a MPO pode ativar diretamente a microglia, o que resulta na secreção de TNF- α e intensificação do processo inflamatório [36].

3.1.3 Ácido úrico

A susceptibilidade do tecido ao dano oxidativo gerado pelo processo inflamatório persistente relaciona-se com o balanço entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao oxidante, previnem, retardam, minimizam ou reparam a oxidação de substratos susceptíveis [12,27]. Os antioxidantes podem ser oriundos da dieta como carotenoides, ácido ascórbico, tocoferóis e polifenóis e endógenos, que se subdividem em enzimáticos e não enzimáticos [12]. Os antioxidantes de natureza enzimática catalisam a redução de ROS e espécies reativas de nitrogênio a produtos pouco ativos. Esses compreendem a SOD, catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), tioredoxinas (Trx) e Prx. Não obstante, outros compostos endógenos não enzimáticos também possuem atividade antioxidante e atuam sinergicamente com o sistema enzimático, com destaque para a albumina, glutathione, coenzima Q, ácido lipoico e ácido úrico [27,42].

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das bases púricas e sua síntese é resultado de sucessivas reações de oxidação da base nitrogenada pela xantina oxidase (ou xantina desidrogenase) tendo o NAD⁺ ou o oxigênio como acceptor final de elétrons [43], neste último caso, há formação de O₂^{•-} e H₂O₂. O ácido úrico é um ácido fraco (pKa 5,3) e, portanto, em pH fisiológico do ambiente extracelular (pH = 7,35-7,45) apresenta-se predominantemente desprotonado como ânion urato, sendo que a concentração plasmática dessa molécula depende do balanço entre ingestão de bases púricas, síntese, excreção e reabsorção nos túbulos renais [44].

O ácido úrico não é apenas um mero produto de excreção, mas também atua como um versátil antioxidante, sendo capaz de reagir rapidamente com ¹O₂, radical hidroxila ([•]OH), radical alcóxila (RO[•]) e HOCl ($k = 2,3 \times 10^6$, $9,5 \times 10^9$, $1,1 \times 10^7$ e 2×10^5 M⁻¹s⁻¹, respectivamente) [45,46], além de reparar proteínas oxidadas, complexar metais de transição e inibir a cascata de peroxidação [47,48]. Inúmeros estudos epidemiológicos demonstraram a importância dos efeitos antioxidantes dessa molécula, particularmente no sistema nervoso central [49], sugerindo seu papel neuroprotetor contra doenças como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla [50,51].

Em altas concentrações o ácido úrico por outro lado apresenta propriedades pró-inflamatórias e pró-oxidantes, podendo precipitar na forma de cristais monossódicos de urato e ativar o inflamassoma NALP3 e, conseqüentemente, induzir a secreção de citocinas, dentre elas IL-1 β , promovendo a ativação de linfócitos e o recrutamento de fagócitos [52,53,54]. Além disso, os cristais de ácido úrico podem ativar NADPH oxidase e proporcionar formação das chamadas NETs, ao passo que aumenta o potencial oxidativo e bactericida dos neutrófilos [13,55].

Durante o *burst* oxidativo, a MPO parece ter um papel decisivo no metabolismo do ácido úrico, uma vez que o oxida ao radical de urato na presença de H₂O₂. Dois radicais de urato podem dismutar, produzindo alantoína e o ácido úrico original. Alternativamente, o radical de urato pode reagir com O₂^{•-}, presente em altas concentrações no ambiente inflamatório, para originar o HOOU [16], agente oxidante que, diferentemente do H₂O₂, reage com a glutatona na ausência de catálise enzimática [56]. Os radicais derivados do metabolismo oxidativo do ácido úrico também podem formar adutos com aminoácidos e proteínas, sendo encontrado, inclusive, em plasma e líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide [57]. Sobretudo, por ser um substrato fisiológico para a MPO, cuja constante de reação é da ordem de 10⁵ para o composto I da enzima [16], o urato compete com os íons cloreto para a formação do HOOU, o que interfere na síntese do HOCl, principal molécula oxidante de neutrófilos com atividade microbicida [17].

3.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A sepse severa constitui-se uma das principais causas de mortalidade hospitalar em pacientes críticos, sendo letal em cerca de 46% dos casos, resultante de uma série de alterações fisiológicas em resposta à disseminação de um agente agressor, geralmente de origem bacteriana, pelo organismo. A incidência da sepse tem aumentado drasticamente nos últimos anos como resultado de múltiplos fatores tais como idade avançada, uso contínuo de fármacos imunossupressores e infecção por micro-organismos multirresistentes, com destaque às bactérias gram-negativas *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas mallei* e *P. aeruginosa* [58,59].

P. aeruginosa é um bacilo gram-negativo que merece atenção especial por sua associação com infecções de caráter oportunista e processos sépticos de difícil controle, o que gera elevadas taxas de mortalidade hospitalar [60,61]. Essa associação se deve pela capacidade da bactéria de expressar inúmeros fatores de virulência como formação de biofilme pelo mecanismo de *quorum sensing*, secreção de moléculas citotóxicas e de

aderência, capacidade de locomoção celular, evasão do sistema complemento, síntese de enzimas antioxidantes, bem como pela resistência a terapêutica antibiótica [62].

A resistência ao tratamento antibacteriano convencional é uma característica intrínseca da *P. aeruginosa*, em virtude da baixa permeabilidade membranar além da versatilidade metabólica para suportar condições microambientais variadas (baixa disponibilidade de nutrientes, variações de temperatura e pH), o que justifica sua capacidade de adaptar-se a meios adversos [63]. Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que algumas cepas de *P. aeruginosa* expressam enzimas antioxidantes (ex., SOD, catalase e Prx), as quais contribuem com a alta virulência da bactéria por reduzir a concentração de ROS oriundos dos fagócitos [64,65,19].

Entre as cepas de importância clínica destaca-se *P. aeruginosa* PA14 por se tratar de uma estirpe altamente virulenta e de ampla distribuição global sendo a cepa de *P. aeruginosa* mais comumente encontrada em todo o mundo [66]. Além dos fatores de virulência supracitados, PA14 ainda é capaz de expressar genes de patogenicidade que codificam exotoxinas [67] e a peroxirredoxina LsfA [19] que possui importante papel na detoxificação do peróxido de hidrogênio e combate ao ambiente oxidativo hostil para a bactéria.

3.1.5 Peroxirredoxinas

As Prxs pertencem à família de tiol-peroxidases e estão ubiquamente distribuídas na natureza. Além das propriedades antioxidantes, elas podem atuar como verdadeiros sensores celulares devido a sua abundância (na ordem de micromolar dentro das células), alta sensibilidade e reatividade com os mais diversos peróxidos [68]. Elas estão presentes desde o citosol até em organelas celulares reduzindo H_2O_2 , peroxinitrito ($ONOO^-$) e vários outros peróxidos orgânicos em produtos inertes, além de serem bem descritos como mediadores da sinalização redox [20,69,70,71,72,73,74].

Estruturalmente as Prx são classificadas de acordo ao número de cisteínas envolvidas na catálise, sendo divididas em duas classes principais: 1-Cys Prx e 2-Cys Prx, contendo um e dois resíduos de cisteínas envolvidos na catálise, respectivamente [69,21]. Todas as Prxs possuem obrigatoriamente um resíduo de cisteína conservado na extremidade N-terminal denominado cisteína peroxidásica (Cys-P) que reage com peróxidos formando ácido sulfênico e o respectivo álcool. Além do resíduo de Cys-P, a 2-Cys Prx contém uma segunda cisteína conservada em C-terminal denominada cisteína de resolução (Cys-R) [68]. Com base na localização ou ausência da Cys-R, a Prx pode ser dividida em três subgrupos: 1-Cys Prx, 2-Cys Prx típicas e 2-Cys Prx atípicas [75].

A dinâmica de reações entre a Prx e os peróxidos inicia-se com o ataque ao resíduo Cys-P da enzima, tendo como resultado a oxidação do ânion tiolato da cisteína (Cys-S⁻) ao ácido sulfênico (Cys-SOH). As 2-Cys Prx típicas e atípicas, após sofrerem oxidação pelos compostos reativos, são reduzidas ao seu estado original pela ação de oxirredutases de dissulfeto como a tioredoxina, completando o ciclo catalítico. Apesar de ambas possuírem o mesmo mecanismo de catálise, elas se diferenciam pela forma como a ponte dissulfeto se forma: as 2-Cys Prx típicas apresentam-se como homodímeros com dissulfetos intersubunidades, enquanto as 2-Cys Prx atípicas apresentam-se como monômeros funcionais com Cys-P e Cys-R na mesma cadeia polipeptídica, o que resulta em ligação dissulfeto intramolecular. Quanto à redução da 1-Cys Prx oxidada, esta pode ser mediada por compostos antioxidantes não-enzimáticos como glutationa, ácido lipoico, ciclofilinas e ácido ascórbico [76,77,75].

As 1-Cys Prx e 2-Cys Prx são consideradas importantes antioxidantes citosólicos devido a sua abundância e alta reatividade com diferentes hidroperóxidos [78,79]. Recentemente foi demonstrado que HOOH também pode reagir com as 2-Cys Prx, Prx1 e Prx2 humanas, com alta constante de velocidade (10^5 a 10^6 M⁻¹s⁻¹), sendo um evento potencialmente importante em sítios inflamatórios celulares [72]. Estudos anteriores também sugerem que Prx2 humana reage com HOCl na ordem de 10^6 M⁻¹s⁻¹ [80] e com H₂O₂ na ordem de 10^8 M⁻¹s⁻¹ [81]. Assim, é razoável hipotetizar que HOOH, HOCl e H₂O₂ devem ser reduzidos por Prxs bacterianas, limitando um possível efeito bactericida dos oxidantes.

O papel das Prx na virulência de bactérias já foi estabelecido para inúmeras bactérias incluindo *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* e *P. aeruginosa* [20,82,19]. *P. aeruginosa* apresenta pelo menos dez genes que codificam Prx em seu genoma, incluindo genes que codificam as enzimas alquil hidroperóxido redutase (AhpC) e tioredoxina peroxidase, já descritas por sua relação com a virulência de outras bactérias [82,83]. Contudo, ainda existem poucos estudos cinéticos, fisiológicos e bioquímicos relacionados à atividade das Prx na virulência de *P. aeruginosa*.

Kaihami e colaboradores [19] demonstraram que a 1-Cys Prx LsfA é importante na sobrevivência da linhagem PA14 contra o H₂O₂ em macrófagos isolados e num modelo murino de pneumonia aguda. A AhpC, que se trata de 2-Cys Prx, é requerida para a sobrevivência e colonização de *Staphylococcus aureus* [84] e *Helicobacter cinaedi* [85] *in vitro*. Outra subclasse de Prx denominada de proteína de resistência aos hidroperóxidos orgânicos (Ohr) também foi associada à sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* [86] e *P. aeruginosa* [87,88,89] expostas a diferentes hidroperóxidos orgânicos e

peroxinitrito. Em conjunto, esses trabalhos evidenciam o papel crucial dessas enzimas na progressão de infecções de difícil controle.

3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO A SER SUBMETIDO NA *Free Radical Biology and Medicine*

Envolvimento da peroxirredoxina AhpC1 na sobrevivência de *P. aeruginosa* à oxidantes gerados no processo inflamatório

Leonardo Silva Rocha^a, Railmara Pereira da Silva^b, Thiago Macêdo Lopes Correia^c, Rafael Pereira de Paula^{a,c}, Flavia Carla Meotti^b, Raphael Ferreira Queiroz^{a,d*}

^aPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ^cPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista, Brasil; ^dDepartamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil.

*Autor correspondente: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz, Departamento de Ciências Naturais, Estrada do Bem Querer, km 4, Caixa Postal 95, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45031-900, Vitória da Conquista, Brasil. E-mail: rfqueiroz@uesb.edu.br

Guia ao Autor: <https://www.elsevier.com/journals/free-radical-biology-and-medicine/0891-5849/guide-for-authors>

Resumo:

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo oportunista que se adapta rapidamente aos mecanismos de defesa do hospedeiro ao produzir uma série de enzimas antioxidantes subvertem os efeitos nocivos dos oxidantes gerados pelos neutrófilos. Dentre essas, destacam-se as peroxirredoxinas, proteínas tiolicas, abundantes e altamente reativas com diferentes peróxidos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento da peroxirredoxina AhpC1 de *P. aeruginosa* na defesa contra o ácido hipocloroso (HOCl) e o hidroperóxido de urato (HOOU) *in vitro*, em neutrófilos e *in vivo*. Inicialmente, observou-se que a cepa Δ ahpC1 foi sete vezes mais sensível ao HOCl quando comparada com a linhagem selvagem. Também, o HOOU em até 20 μ M causou a morte de 50% da Δ ahpC1 ao passo que não interferiu na sobrevivência da cepa selvagem em concentrações até 100 μ M. A cepa mutante opsonizada também foi mais sensível aos neutrófilos humanos quando comparados com as bactérias selvagens. As vias dependentes da NADPH oxidase foram responsáveis por

aproximadamente 36 e 44% da morte das bactérias selvagens e $\Delta ahpc1$, respectivamente, de acordo com os experimentos empregando-se apocinina (1 mM). A adição do antioxidante e substrato da mieloperoxidase, ácido úrico, aumentou a sobrevivência da cepa selvagem, todavia, inesperadamente reduziu a sobrevivência da bactéria mutante na enzima AhpC1, o que pode estar associado com a formação do HOOU. Os experimentos de cinética rápida confirmaram que a AhpC de *Xylella fastidiosa*, que possui 61% de identidade com AhpC1 de PA14, reagiu com H₂O₂ e HOOU em altas constantes de velocidade de segunda ordem ($k = 1,54 \pm 0,07 \times 10^8$ e $2,26 \pm 0,09 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), sugerindo o papel da enzima no consumo desses oxidantes. No modelo animal de pneumonia aguda, a cepa mutante na AhpC1 também foi mais susceptível à resposta imune do animal com menor número de colônias recuperadas nos tecidos pulmonar, esplênico e hepático, menor indução de citocinas, infiltrado leucocitário, peroxidação de lipídios e produção de nitrito e nitrato quando comparada com a cepa selvagem. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez o papel central da enzima AhpC1 na sobrevivência e virulência de PA14 *in vitro*, em modelo celular e *in vivo*. Dessa forma, a enzima AhpC1 de *P. aeruginosa* pode ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novas moléculas direcionadas ao tratamento de infecções causadas por essa bactéria.

Palavras-chave: peroxirredoxinas, *Pseudomonas aeruginosa*, ácido hipocloroso, hidroperóxido de urato, neutrófilos.

3.2.1 Introdução

A sepsé infecciosa é uma condição clínica relevante no contexto da saúde pública, sendo responsável por altas taxas de mortalidade em pacientes críticos [90]. Esse panorama está comumente associado ao surgimento de micro-organismos multirresistentes, com destaque para as bactérias gram-negativas *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas mallei* e *Pseudomonas aeruginosa* [59]. Esta última bactéria é um bacilo que merece atenção especial por sua associação com infecções de caráter oportunista e processos sépticos de difícil controle, o que se deve à capacidade de expressar inúmeros fatores de virulência com destaque para a síntese de enzimas antioxidantes que subvertem às oxidações mediadas pelo sistema imune do hospedeiro [88,91,19,60,61].

Os neutrófilos desempenham papel crucial em processos agudos por constituírem a primeira linha de defesa contra bactérias, além de serem as células mais abundantes na corrente sanguínea. Na fase oxidativa, o complexo multimérico da nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) reduz uma grande quantidade de O_2 , num processo denominado *burst* oxidativo, ao $O_2^{\bullet-}$ [10]. O $O_2^{\bullet-}$ pode se dismutar espontaneamente ou catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) ao H_2O_2 . Essa molécula é utilizada como co-substrato para a mieloperoxidase (MPO), que amplifica o potencial oxidativo dos neutrófilos ao formar principalmente ácido hipocloroso (HOCl) e/ou radicais livres através dos ciclos clorinante e peroxidásico, respectivamente [92,8,5].

Além de formar HOCl, a MPO pode oxidar outros substratos biológicos como tirosina, glutationa, ascorbato e ácido úrico [8,16]. Anteriormente foi demonstrado que o ácido úrico pode ser oxidado pela MPO em taxas de velocidade relativamente altas ($4,6 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, para o composto I e II da enzima, respectivamente) [16], ao passo que produz radical de urato. Esse radical reage com $O_2^{\bullet-}$ [93] originando o hidroperóxido de urato (HOOU), que eventualmente atuaria como coadjuvante nos processos oxidativos [16,56,94]. Além disso, os derivados radiculares do ácido úrico podem formar adutos colvantes com peptídeos e proteínas do hospedeiro durante o curso da inflamação [57].

Na oxidação do ácido úrico, o ciclo clorinante da MPO é desviado devido a competição entre esse substrato e o cloreto pelo composto I [16]. Apesar de ocorrer a síntese do HOOU nesse processo, um estudo recente demonstrou que o ácido úrico protegeu uma cepa altamente virulenta de *P. aeruginosa* (linhagem PA14) contra a morte pela HL-60 diferenciada em neutrófilos (*dHL-60*), por inibir o ciclo clorinante [17]. Assim, o estado de hiperuricemia parece ser prejudicial à defesa imune inata mediada por neutrófilos, o que

corroborar os achados clínicos de que pacientes hiperuricêmicos têm maior susceptibilidade à sepse [18].

Os mecanismos pelos quais a *P. aeruginosa* subverte os efeitos dos oxidantes formados na inflamação aguda ainda não são completamente compreendidos. A hipótese é que as peroxirredoxinas (Prxs) bem como outras enzimas antioxidantes sejam cruciais para sobrevivência bacteriana durante o *burst* oxidativo, devido a sua distribuição ubíqua e a gama de substratos que podem ser reduzidos por ela [20,21]. Recentemente, foi demonstrado que a Prx LsfA aumentou a sobrevivência da cepa PA14 exposta ao H₂O₂, paraquat e *tert*-butilhidroperóxido, bem como em modelo de pneumonia *in vivo* [19].

A alquil hidroperóxido redutase (AhpC), uma 2-Cys Prx, também é uma Prx importante para a defesa bacteriana contra diversos oxidantes, incluindo H₂O₂, peróxidos orgânicos e peroxinitrito (ONOO⁻) [70]. As cepas de *Legionella pneumophila* mutantes para as enzimas AhpC1 e AhpC2 se mostraram duas a oito vezes mais sensíveis que a linhagem selvagem quando expostas à H₂O₂, paraquat, *tert*-butilhidroperóxido e peróxido de cumeno [82]. Dentre elas, a cepa Δ *ahpC1* se mostrou duas vezes mais sensível que a Δ *ahpC2*, o que sugere maior abundância e/ou reatividade da AhpC1 para remoção de peróxidos [82].

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel da AhpC1 na sobrevivência da cepa de *P. aeruginosa* PA14 quando desafiada com HOCl e HOOU *in vitro*, durante o *burst* oxidativo de neutrófilos na presença ou não de ácido úrico e em modelo animal de pneumonia aguda.

3.2.2 Materiais e Métodos

3.2.2.1 Materiais e reagentes

Cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monopotássico, sulfato de amônio, ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido úrico, acetato de amônio, acetonitrila, riboflavina, Chelex, caldo Luria Bertani (LB), ampicilina, ágar Mueller Hinton (MH), Triton X-100, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), H₂O₂, ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH), apocinina, albumina de soro fetal bovino, 4,4'-ditiodipiridina, hidroxitolueno butilado, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dimetilsulfóxido (DMSO), coquetel com inibidores de proteases (S8820), triptona, extrato de levedura, glicerol, glicose anidra, Histopaque 1077 e 1119 foram obtidos da Sigma-Aldrich. O ácido hipocloroso foi obtido a partir de preparação comercial de água sanitária com o uso de NaOH (0,01M) e sua concentração determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{290\text{nm}} = 3,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [95]. O

meio mínimo continha fosfato monobásico de sódio (31 mM), fosfato dibásico de sódio (39 mM), sulfato de amônio (18 mM), cloreto de cálcio (100 µM), cloreto de magnésio (2 mM), DTPA (100 µM), glicose anidra (2%), pH 7,4. O PBS-glicose continha fosfato dibásico de sódio (10 mM), fosfato monopotássico (1,8 mM), cloreto de sódio (137 mM), cloreto de potássio (2,7 mM), glicose anidra (1%), pH 7,4. O ágar MH, caldo LB, salina, PBS-glicose e meio mínimo foram esterelizados por autoclavagem.

3.2.2.2 Obtenção da linhagem mutante de PA14

As cepas $\Delta ahpc1$, Δohr , $\Delta ahpc2$, $\Delta lsfa$, Δgpx e $\Delta ohrR$ foram produzidas pelo método de mutagênese dirigida por oligonucleotídeos de acordo com Kong e colaboradores [96], no qual o amplicon resultante foi clonado em um vetor pNPTS138 e introduzido na *P. aeruginosa*, linhagem PA14. As cepas selvagem (WT) e mutantes fazem parte da biblioteca de mutantes do laboratório da Prof^a. Dr^a. Regina Baldini, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, as quais foram gentilmente cedidas para a pesquisa.

3.2.2.3 Avaliação da atividade bactericida do HOCl

As cepas selvagem (WT), $\Delta ahpc1$, Δohr , $\Delta ahpc2$, $\Delta lsfa$, Δgpx e $\Delta ohrR$ foram crescidas em meio caldo LB, por 18 h, a 37°C numa incubadora bacteriológica sob agitação de 350 rpm em *termoshaker*. Em seguida as células foram diluídas para OD_{625 nm} = 0,1 em caldo LB e incubadas novamente por 5 h, diluídas em meio mínimo (1x10⁶ UFC/mL) e desafiadas com HOCl por 30 min a 37°C, nas concentrações de 5 a 50 µM. Em seguida, o meio reacional foi diluído 200 vezes em caldo LB para capturar qualquer HOCl residual, e 10 µL foram estriados em placas contendo ágar MH. As placas foram incubadas a 30°C por 18 h e a atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [17].

3.2.2.4 Isolamento de neutrófilos do sangue humano periférico

As amostras de sangue humano foram obtidas de doadores voluntários, saudáveis, não fumantes, através de punção venosa periférica por protocolos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia sob parecer de número CAAE 46135315.4.0000.0055. O isolamento de granulócitos foi realizado como descrito por English & Andersen [97] com adaptações, no qual o sangue foi inicialmente coletado em tubos plásticos estéreis contendo heparina sódica e homogeneizado por inversão. Em seguida, 2 mL de Histopaque 1077 foi cuidadosamente vertido em 3 mL de

Histopaque 1119 em um tubo cônico estéril de 15 mL, em temperatura ambiente, seguido da adição de 4 mL do sangue coletado. Após centrifugação a 700g (Fanem 206-LB, São Paulo - Brasil) por 30 min à temperatura ambiente, o material sobrenadante foi descartado e a camada de granulócitos, localizada entre os dois gradientes, aspirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, lavada com 10 mL de salina estéril (0,9%) e novamente centrifugada a 300g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o infranadante foi submetido à hemólise hipotônica, pela adição de 5 mL de água destilada gelada, para eliminar quaisquer resquícios de eritrócitos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 300g por 10 min, o sobrenadante descartado e o infranadante ressuspensionado em 2 mL de tampão PBS-glicose. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer (Sigma-Aldrich, MA, EUA) e a viabilidade celular confirmada pelo método de exclusão por azul de tripan a 0,2% [98].

3.2.2.5 Avaliação da atividade bactericida de neutrófilos

Após expansão das bactérias por 18 h, as cepas WT e $\Delta ahpc1$ foram diluídas em caldo LB para $OD_{625\text{ nm}} = 0,1$ e incubadas novamente por 5 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1700g (Fanem 3400, São Paulo - Brasil) durante 10 min, ressuspensionadas em volume apropriado de tampão PBS-glicose e opsonizadas em banho maria a 37°C por 20 min com 10% de soro humano inativado. Em seguida, os neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram desafiados com as bactérias (1×10^7 UFC/mL) sob multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1, previamente opsonizadas com soro autólogo inativado em banho-maria por 20 min a 37°C, em PBS-glicose na ausência ou presença de ácido úrico (200 e 400 μM), ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH) (50 μM), inibidor da MPO [99,100] ou apocinina (APO) (1 mM), inibidor da NADPH oxidase [101,102]. Após 1 h, Triton X-100 (10%) foi adicionado, a mistura reacional homogeneizada e mantida em gelo por 10 min para lise total dos neutrófilos. Em seguida, o homogeneizado total foi diluído 10^4 vezes em PBS-glicose, 10 μL foram coletados, pipetados e estriados em placas contendo ágar MH. As placas foram incubadas a 30°C por 18 h. A atividade bactericida foi estimada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa [67,17].

3.2.2.6 Síntese química e quantificação do HOOU

A síntese do hidróperóxido de urato foi realizada de acordo com o método proposto por [103,56]. Resumidamente, foram preparadas as soluções de urato (20 mM) em NaOH (40 mM), e riboflavina (500 μM) em tampão fosfato (20 mM; pH = 6). A reação entre urato (1,5 mM) e riboflavina (0,01 mM) foi realizada em um volume de 4 mL em placa para cultura de

células com 6 poços contendo tampão fosfato (20 mM; pH = 6,8) exposta à radiação UV-A (365 nm; irradiador UV-A com 6 lâmpadas; 15 e 2,2 mW/cm², Novatecnica Campinas-Brasil) a 20°C sob agitação contínua por 10 min. Antes de iniciar a síntese, as soluções foram agitadas com Chelex por pelo menos 1 h para remoção de metais-traço.

A separação e identificação do HOOU foi realizada utilizando um sistema de CLAE (Shimadzu, Tóquio - Japão) com duas bombas LC-6AD, injetor manual CTO-10A, detector de absorvância UV SPD-20A, controlador de sistema CBM-20A conectado a um computador com LC Software Solution. A coluna preparativa TSK-Gel amida-80 (21,5 mm x 30 cm, 10 µm de tamanho de partícula; Tosoh Bioscience; Tóquio, Japão) foi usada como fase estacionária. A fase móvel foi acetato de amônio (10 mM), pH 6,8 (solvente A) e acetonitrila (solvente B) e a separação foi realizada em modo isocrático utilizando 60% de solvente B por 30 min com fluxo de 4,0 mL/min. Imediatamente antes da injeção, a reação foi diluída (40% de reação e 60% de acetonitrila) e 7 mL foram injetados no sistema de CLAE. Aproximadamente 4 mL de HOOU (tempo de retenção = 18 min) foram coletados e expostos ao argônio para evaporar a acetonitrila. Por fim, para garantir máxima remoção do solvente orgânico, utilizou-se um balão kitasato conectado a uma bomba a vácuo por mais 5 min. O HOOU foi quantificado espectrofotometricamente a 308 nm ($\epsilon = 6.537 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [56], e a concentração foi confirmada pela reação do alaranjado de xilenol utilizando H₂O₂ como padrão [104].

3.2.2.7. Avaliação da atividade bactericida do HOOU

As cepas WT e ΔahpC1 foram crescidas em meio caldo LB, por 18 h, a 37°C em uma incubadora bacteriológica sob agitação de 350 rpm. Em seguida, as células foram diluídas para OD_{625 nm} = 0,1 em caldo LB e incubadas novamente por 5 h. As bactérias foram, então, diluídas em meio mínimo (1x10⁶ UFC/mL) e desafiadas com HOOU por 30 min, nas concentrações de 5 a 100 µM. Em seguida, o meio reacional foi diluído 200 vezes em caldo LB, 10 µL coletados, pipetados e estriados em placas contendo ágar LB. As placas foram incubadas a 30°C por 18 h. A atividade bactericida foi determinada pela contagem do número de colônias residuais sobre a placa.

3.2.2.8 Análise da homologia entre a AhpC1 de *P. aeruginosa* e AhpC de *Xylella fastidiosa*

Análises *in silico* foram realizadas buscando identificar a similaridade entre a AhpC1 de *P. aeruginosa* e AhpC de *X. fastidiosa*. As sequências foram obtidas através do banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org>) e alinhadas com o auxílio da ferramenta *Basic Local*

Alignment Search Tool (BLAST) disponível no site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foi encontrada 61% de identidade entre a AhpC1 de *P. aeruginosa* (Q02UU0) e AhpC de *X. fastidiosa* (Q87DE0) (Fig. 1). Embora haja apenas 61% de identidade entre as proteínas, o sítio ativo de ambas permanece conservado no resíduo de cisteína da posição 47.

```

Q02UUO 1  MSLINTQVQPFKVNAFHNGKFIETTESLKGKWSVLIEMPAAFTFNCPTTEIEDAANNYGE 60
Q87DE0 1  MSVLNTEILSFKATAYKNGQFVEVSEAVFKGKWAVFVFPADFTFVCPTTELEDLADHYEE 60

Q02UUO 61  FQKAGAEVYIVTTDTHFSHKVWHETSPAVGKAQFPLIGDPTHQLTNAFGVHIPEEGLALR 120
Q87DE0 61  FQKYGVEIYSVSTDTHFSHKAWHDI SPAIGKIKYAMIGDPTHEISRNEENVLRPS-GLADR 119

Q87DE0 121  GTFVINPEGVIKTVEIHSNEIARDVGETVRRLKAAQYTAHPGEVCPAKWKEGEKTLAPS 180
Q02UUO 120  GTFIIDFQGVIQSVEITAEGIGRDAKELLRKVKAAIYVANHPGEVCPAKWEEGGKTLAPS 179

Q87DE0 181  LDLVGKI 187
Q02UUO 180  LDLVGKI 186

```

Fig. 1. Alinhamento entre os aminoácidos das proteínas AhpC1 de PA14 (Q02UU0) e AhpC de *X. fastidiosa* (Q87DE0). Os destaques em azul representam a identidade entre as sequências das proteínas enquanto o destaque em vermelho indica a posição do sítio ativo (C47).

3.2.2.9 Expressão da proteína recombinante

O gene Δ *ahpC1* foi amplificado, a partir de cosmídeos contendo genes de *Xylella fastidiosa* que foram disponibilizados pelo Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*, por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos. Para a execução de todas as reações descritas foi utilizado o termociclador *Perkin-Elmer 9700* (*Applied Biosystems*) e a enzima Taq DNA polimerase. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. O produto de PCR referente ao gene de interesse e o vetor de expressão pET15b foram simultaneamente digeridos com as enzimas de restrição adequadas. Ao final da digestão, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e os fragmentos correspondentes extraídos utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system* (*Promega Corporation*), conforme orientações do fabricante. Após a extração, o gene e o vetor de expressão foram ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase e o produto inserido na bactéria *Escherichia coli* DH5 α por eletroporação. Após o crescimento em meio sólido seletivo LB/Amp (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1% e ágar 2%, com ampicilina 50 μ g/mL), algumas

colônias foram selecionadas para confirmação do inserto por PCR seguido por eletroforese em gel de agarose. Após confirmação as colônias foram crescidas em meio líquido LB/Amp e o vetor ligado com o gene foi isolado utilizando o *Perfectprep-Plasmid mini* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), segundo as orientações do fabricante. A presença do vetor com o gene foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. O vetor foi então inserido em linhagens bacterianas de expressão por eletroporação para expressão do produto gênico. Todas as linhagens transformadas foram estocadas em glicerol 20% a -70°C . As linhagens transgênicas foram inoculadas em 50 mL de LB/Amp e crescidas *overnight* a 37°C . No dia seguinte, as células foram diluídas em 1 L de meio LB/Amp para a $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,2$. Quando atingiram a $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$, o meio foi suplementado com IPTG (1 mM, concentração final) e deixado por mais 3 h sob agitação para indução da expressão do gene clonado. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm, lavadas com água fria e congeladas a -80°C [105].

3.2.2.10 Purificação da proteína recombinante

O pellet de bactérias foi ressuspendido em tampão de lise celular (tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, glicerol 10% e 500 μL de inibidor de protease livre de EDTA) (SigmaFAST, uma pastilha dissolvida em 2 mL), num volume de 20 mL. As células foram então submetidas a diversos ciclos de sonicação por 20 s no aparelho *Branson Digital Sonifier 450* (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA), seguidos de 60 s de descanso em gelo com amplitude de 30% e tempo total de 5 minutos. Após lise, adicionou-se, sob agitação em banho de gelo, sulfato de estreptomicina a 1%. Após 20 min, as células foram centrifugadas a 15000 rpm por 30 min a 4°C . Em seguida o extrato protéico solúvel foi filtrado em membrana de 0,22 μm (Milipore) e utilizado para purificação da proteína de interesse. A proteína foi purificada através da cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna HiTrap™ Talon crude (GE Healthcare). A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão A (Tris.HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM e glicerol 10%) e o extrato protéico foi injetado sob um fluxo de 5 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com 100 mL do tampão A contendo 5 mM de imidazol sob um fluxo de 8 mL/min. A eluição da proteína de interesse foi realizada com tampão de eluição (Tris.HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, glicerol 10% e imidazol 400 mM) sob um fluxo de 5 mL/min, coletando-se o eluente em frações de 2 mL. A qualidade da purificação foi verificada por SDS-PAGE das frações eluídas. As frações contendo bandas com massa molecular aproximada de 22,7 kDa foram reunidas, concentradas através da ultrafiltração em filtro Amicon Ultra 10 kDa e quantificadas através

espectrofotometricamente ($\epsilon_{280\text{nm}} = 27055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Em seguida, as amostras foram estocadas a -80°C para ensaios posteriores [105].

3.2.2.11 Redução e quantificação do tiol da proteína

A enzima foi reduzida com DTT (5 vezes em excesso) em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,4, e DTPA 100 μM) tratado com catalase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 2 h a 37°C . O excesso de DTT foi removido por ultrafiltração em filtro Amicon Ultra 10 kDa. A enzima foi estocada sob atmosfera livre de oxigênio. A determinação dos tiois livres foi realizada com 5 μL da amostra e 50 μL de 4,4'-ditiodipiridina (DTPY, 1 mM) em 100 μL de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,4, e DTPA 100 μM) pré-tratado com catalase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A catalase foi removida do tampão utilizando filtro Amicon 10 kDa. As amostras foram incubadas com o DTPY por 5 min a temperatura ambiente e os tiois foram quantificados através do coeficiente de extinção molar em 324 nm ($\epsilon_{324\text{nm}} = 21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [106,107]. As proteínas foram utilizadas apenas quando mais de 80% dos tiois encontravam-se reduzidos.

3.2.2.12 Determinação da cinética de reação

A oxidação da enzima foi acompanhada pela mudança da fluorescência intrínseca da proteína [79,108,109,110]. As reações foram feitas em tampão fosfato de sódio (5 mM); pH 7,4 e DTPA (100 μM), previamente pré-tratado com catalase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A catalase foi removida do tampão utilizando filtro Amicon 10 kDa antes da reação. A reação entre a enzima pré-reduzida (1 μM) e concentrações crescentes de H₂O₂ foi acompanhada em um espectrofotômetro de fluxo interrompido a 25°C (*Applied Photophysics SX18MV*), sob excitação em 280 nm e emissão acima de 320 nm. Um excesso de pelo menos vinte vezes do H₂O₂ foi utilizado para garantir condições de pseudo-primeira ordem. O valor da constante de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) da diminuição da fluorescência foi determinada pelo ajuste exponencial dos dados. Os valores de k_{obs} foram plotados *versus* a concentração de H₂O₂ e a constante de segunda ordem foi obtida a partir do ajuste linear dos dados. Como controle, a constante de reação de H₂O₂ com AhpC também foi determinada usando 0,5 μM de AhpC e H₂O₂ de 0,5 a 1,5 μM , desde que as condições de análise estavam no limite de detecção do aparelho.

3.2.2.13 Modelo animal

Foram utilizados camundongos machos (n = 19) da linhagem C57BL/6, oito semanas de idade, adquiridos da Anilab (Paulinia, São Paulo) e acondicionados no biotério do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal da Bahia por 21 dias para ambientação, os quais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas e condições livres de patógeno, controle de temperatura ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) e livre acesso à água e ração padrão comercial (Pragsoluções, São Paulo). Todos os experimentos foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovada pela Comissão Ética no Uso de Animais da Universidade do Sudoeste da Bahia, sob o parecer de número 171/2018.

3.2.2.14 Infecção intranasal

As linhagens selvagem e a $\Delta ahpc1$ de PA14 foram cultivadas como descrito no item 3.2.2.3. Após atingirem a $\text{OD}_{625\text{nm}} = 0,1$, as bactérias foram centrifugadas a 4500g por 8 min, e o pellet ressuspenso em salina 0,9% estéril para a concentração de 6.7×10^7 bactérias/mL. Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg de peso corporal) e midazolam (1 mg/kg de peso corporal) [111]. Os animais (n = 8 para cada linhagem bacteriana) foram infectados com 30 μL da suspensão bacteriana por via intranasal conforme descrito por Aoki e colaboradores [112]. Os animais controle (*naïve*, n = 3) foram inoculados via intranasal com 30 μL de salina estéril.

3.2.2.15 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e órgãos

Após 24 h de infecção com a linhagem selvagem ou $\Delta ahpc1$, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (16 mg/kg) e em seguida foram submetidos à traqueostomia para canulação da traqueia com cateter de infusão (G22), e os pulmões foram lavados com 1,5 mL de solução PBS glicose (três lavagens de 500 μL) para coleta do LBA. As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento a fim de evitar lise celular. Os órgãos (pulmões, fígado e baço) foram coletados cirurgicamente por laparotomia mediana e estocados até o processamento de acordo com as exigências de cada análise. A carcaça foi armazenada em freezer -20°C para posterior incineração.

3.2.2.16 Análise do LBA

A contagem total de leucócitos no LBA foi realizada em câmara de Neubauer posteriormente a lise total das hemácias com solução de Turk (NewProv, Brasil). Em seguida, 50 µL do LBA foram citocentrifugados a 4500g (Presvac, Brasil) durante 7 min e as lâminas foram coradas com kit Panótico rápido (NewProv, Brasil) através de um banho de imersão em três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Um total de 100 células por lâmina foram contadas por dois analistas treinados utilizando os critérios morfológicos padrões [113]. O restante do LBA foi centrifugado a 1500g por 10 min a 4°C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), e o sobrenadante coletado e acondicionado a -80°C para as análises posteriores.

3.2.2.17 Determinação dos níveis de nitrito no LBA

O nitrito do LBA foi dosado pelo método de Griess [114]. O sobrenadante do lavado (50 µL) foi incubado com 50 µL de solução de naftiletlenodiamina (0.1%) e 50 µL de solução de sulfanilamida (1%) por 10 min a 25°C, a absorbância foi determinada a 540 nm e interpolada numa curva padrão de nitrito (1,65 a 100 µM).

3.2.2.18 Contagem das unidades formadoras de colônias nos tecidos

Os órgãos (pulmão direito, fígado e baço) foram imediatamente homogeneizados em tampão PBS na concentração de 100 mg/mL, com auxílio do sistema *TissueRuptor* (Qiagen, EUA) [115]. Uma alíquota de 10 µL do homogeneizado de cada órgão macerado foram semeados em placas ágar MH e incubadas *overnight* a 30°C para contagem do número de colônias residuais [19]. As unidades formadoras de colônicas foram expressas em UFC/g de tecido.

3.2.2.19 Análises histológicas

O pulmão esquerdo foi removido e imerso numa solução fixadora de Methacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) durante um período de 24 h e depois o fixador foi substituído por álcool etílico hidratado 70%. O tecido pulmonar foi então parafinado, cortado em secções de 4 µm de espessura em micrótomo (Leica RM2125RTS, China) e corados com hematoxilina e eosina (HE). O infiltrado neutrofílico foi avaliado em 30 campos aleatórios das secções pulmonares coradas com HE e microfotografadas em microscópio óptico (BX51, Olympus, Japão) acoplado a câmera fotográfica (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) sob aumento de 400x. A quantificação em duplo-cego

do número de neutrófilos por campo foi feita por operadores treinados e com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

3.2.2.20 Determinação das concentrações de proteínas nas amostras

A concentração de proteínas total nas amostras do homogenizado do tecido pulmonar foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford a 595 nm [116]. A curva de calibração foi feita empregando-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) (0 a 1,4 mg/mL).

3.2.2.21 Atividade peroxidásica nas amostras dos pulmões dos camundongos

O ensaio da atividade peroxidásica com o 3,3',5,5' – Tetrametilbenzidina (TMB) foi realizado como descrito anteriormente [117,118]. Resumidamente, o tecido pulmonar foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, na proporção de 100 mg/mL e em seguida centrifugado (10.000g) por 10 min a 4°C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha). Brometo de Cetil Trimetilamonio (CTAB, 0,5%) foi adicionado ao sobrenadante. Em seguida, o homogenato (10 µL) foi misturado com 110 µL da solução de TMB (TMB 2,9 mM em DMSO 14%, e tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 5,4) e 80 µL de H₂O₂ (0,75 mM) foi adicionado para iniciar a reação. A oxidação do TMB foi acompanhada a cada 30 s, à temperatura ambiente, por 5 min em 450 nm ($\epsilon_{450\text{ nm}} = 5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Um grupo infectado com a cepa WT contendo ABAH (100 µM) foi utilizado como controle para avaliar o envolvimento da MPO na oxidação do TMB [99,100]. Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína), onde uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de TMB oxidado por min.

3.2.2.22 Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica no homogenato do tecido pulmonar foi estimada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), de acordo com o método proposto por Draper e colaboradores [119]. O tecido pulmonar esquerdo (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), pH 8,0, contendo hidroxitolueno butilado (0,02%) para evitar oxidações espúrias. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1600g por 10 min a 4°C para coleta do sobrenadante. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído a 50% no tampão Tris.HCl, num volume final de 100 µL, acrescido de 100 µL de ácido tricloroacético 10%, e 800 µL de ácido tiobarbitúrico (530 mg dissolvidos em 100 mL de ácido acético 20%). A mistura reacional foi incubada por 1 h a 95°C, seguido do resfriamento em gelo por 10 min a fim de cessar a reação. As amostras

foram novamente centrifugadas (1600g, 10 min a 4°C) e a absorbância medida a 535 nm (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). A concentração de TBARS no tecido pulmonar foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (0-50 µM), normalizada pela concentração de proteínas e expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína.

3.2.2.23 Avaliação do nível de transcrição de citocinas

As amostras dos tecidos pulmonares foram homogeneizadas em reagente de lise *TRIzol*TM (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante com o auxílio do sistema *TissueRuptor* (Qiagen, EUA). Durante o processo de purificação, o RNA foi tratado com *TURBO DNA-free*TM (Invitrogen, EUA) para digestão de possíveis contaminações por ácido desoxirribonucléico (DNA) de acordo com as orientações do fabricante. As amostras foram acondicionadas a -80°C até o momento da transcrição reversa.

A concentração (ng/µL) e pureza (A260/A230 e A260/A280) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDropTM 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa *High-Capacity RNA-to-cDNA*TM (AppliedBiosystem, EUA), segundo as instruções do fabricante, e acondicionado a -80°C até o momento da realização da qPCR.

Os níveis de expressão do TNF-α, interleucina-6 e GAPDH (gene de referência), cujas sequências dos primers estão representadas na Tabela 1, foram quantificados por PCR de tempo real utilizando o sistema *SYBR Green Mastermix* (AppliedBiosystem, EUA). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante e a termociclagem realizada com o auxílio do termociclador *StepOne Plus* (AppliedBiosystem, EUA) [120].

Tabela 1. Sequência de bases nitrogenadas utilizadas para a construção dos *primers*.

Gene	Primers (5' - 3')	Referência
GAPDH	Forward: ATGACATCAAGAAGGTGGTG Reverse: CATACCAGGAAATGAGCTTG	[121]
IL-6	Forward: TGATGCTGGTGACAACCACG Reverse: CAGAATTGCCATTGCACAACCTC	[122]
TNF-α	Forward: CCCGAAGCGGACTACTATGC Reverse: TAGATGGCGTTGTTGCGGT	[122]

3.2.2.24 Análise estatística

Os resultados obtidos com HOCl foram referentes à triplicata de três experimentos independentes e expressos como $IC_{50} \pm$ erro padrão, que representa a concentração necessária para reduzir a população bacteriana em 50%, e aqueles obtidos com células e com H₂O₂ foram expressos como média do percentual de sobrevivência \pm desvio padrão calculado a partir do controle negativo. Já os dados obtidos *in vivo* foram expressos em média \pm erro padrão de cada grupo. Os dados foram analisados por *One-way* ANOVA seguidos pelo *post-test* de Newman-Keuls, quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad-Prism. Para triagem com o HOCl foi realizado duplicata de dois experimentos independentes, conforme destacado na figura.

3.2.3 Resultados

Em experimentos preliminares observamos que a cepa com deleção para o gene *ahpC1* foi a mais sensível ao HOCl dentre todas as cepas testadas (Tabela 2). O valor de IC_{50} para o HOCl incubado com a cepa Δ *ahpC1* foi sete vezes menor que aquele determinado para a cepa selvagem ($2,8 \pm 1,08$ versus $21,5 \pm 0,73$ μ M, respectivamente; $p = 0,0058$) (Fig. 2).

Tabela 2. Determinação do IC_{50} para o HOCl incubado com as bactérias selvagem e mutantes.

Cepas	IC_{50} HOCl (μ M)*
WT	21,5 \pm 0,7
Δ <i>ahpC1</i>	2,8 \pm 1,1
Δ <i>ahpC2</i>	10,0 \pm 0,1
Δ <i>ohr</i>	13,7 \pm 0,4
Δ <i>ohrR</i>	10,1 \pm 0,7
Δ <i>lsfa</i>	10,4 \pm 0,4
Δ <i>gpx</i>	6,7 \pm 0,2

WT: selvagem. *Dados expressos em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes. As bactérias (1×10^6 UFC/mL) foram incubadas com HOCl por 30 min a 37°C em meio mínimo. Posteriormente, o meio reacional foi diluído 200 vezes em caldo LB e a suspensão bacteriana estriada sobre placa contendo ágar MH para a contagem das colônias remanescentes após 24 h a 30°C.

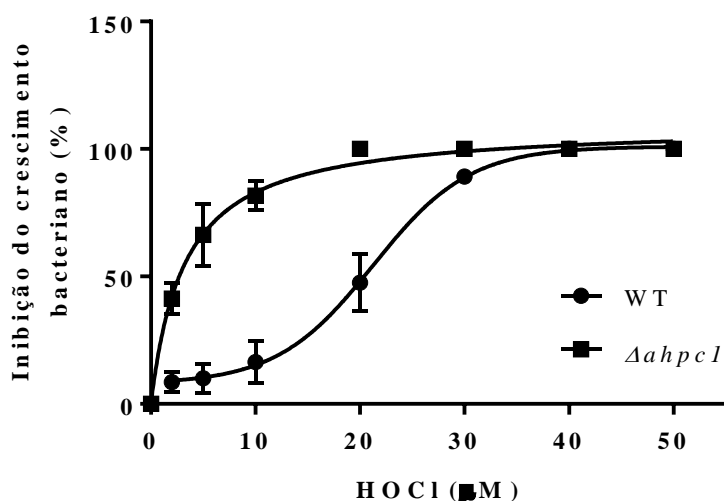


Fig. 2. Curva de inibição de crescimento das cepas WT e $\Delta ahpC1$ de PA14 na presença de HOCl. As bactérias (1×10^6 UFC/mL) foram incubadas com HOCl por 30 min a 37°C em meio mínimo. Posteriormente, o meio reacional foi diluído 200 vezes em caldo LB e a suspensão bacteriana estriada sobre placa contendo ágar MH para a contagem das colônias remanescentes após 24 h a 30°C. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média das triplicatas de três experimentos independentes. Os dados foram ajustados nas equações hiperbólica e sigmoide para as cepas $\Delta ahpC1$ e WT, respectivamente, com auxílio do software GraphPad Prism 5.0.

Em seguida, as cepas WT e $\Delta ahpC1$ foram opsonizadas com soro autólogo e incubadas com neutrófilos humanos por 1 h a 37°C. Aproximadamente metade das bactérias selvagens sobreviveram ao *burst* oxidativo, enquanto que a cepa $\Delta ahpC1$ foi estatisticamente mais sensível à morte pelos neutrófilos quando comparada com a linhagem WT (% de sobrevivência = 50 *versus* 36, respectivamente, $p=0,0093$, por test *t-student*). A adição de ácido úrico, um reconhecido antioxidante endógeno [123,48] e substrato da MPO [16], nas concentrações fisiológicas de 200 e 400 μ M aumentou a sobrevivência da cepa WT de 50% para 73% ($p<0,0002$) e 80% ($p<0,0002$), respectivamente (Fig. 3A). Surpreendentemente, esse composto diminuiu a sobrevivência da cepa $\Delta ahpC1$ de 36% para 22% ($p<0,01$) ou 26% ($p<0,01$), nas concentrações de 200 e 400 μ M, respectivamente (Fig. 3B). Além disso, ABAH (50 μ M) restaurou a sobrevivência das bactérias selvagem (Fig. 3A) e mutante (Fig. 3B) para 70% ($p=0,002$) e 78% ($p=0,0001$), respectivamente. APO (1 mM) também restaurou a sobrevivência da WT e $\Delta ahpC1$ (Fig. 3) para 85% ($p=0,00011$) e 79% ($p=0,0001$), respectivamente. Em neutrófilos incubados com a cepa WT, cerca de 16% da morte foi decorrente exclusivamente ao H_2O_2 , conforme observado pela diferença na sobrevivência entre as incubações contendo APO e ABAH ($p=0,01$) (Fig. 3A).

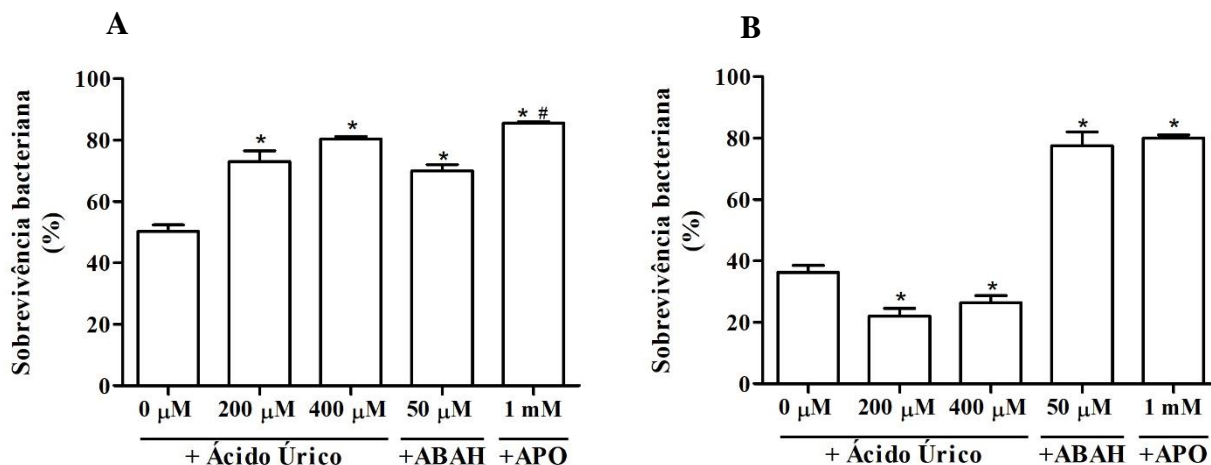


Fig. 3. Sobrevivência bacteriana ao *burst* oxidativo de neutrófilos e efeito do ácido úrico na sobrevivência das cepas WT (A) e $\Delta ahpc1$ (B) de PA14. As bactérias (1×10^7 UFC/mL) opsonizadas foram incubadas com neutrófilos (1×10^6 células/mL) por 1 h, na presença de ácido úrico nas concentrações de 200 e 400 μ M, ABAH (50 μ M) e APO (1 mM). Posteriormente, o meio reacional foi acrescido de Triton X-100 (10%) e incubado por 10 min no gelo. Em seguida, o meio foi diluído 10^4 vezes em PBS-glicose e a suspensão bacteriana foi estriada sobre placa contendo ágar a 30°C *overnight*. Os dados foram expressos em médias \pm erro padrão das triplicatas de três experimentos independentes, com exceção dos controles contendo ABAH e APO que foram em triplicata de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o grupo sem ácido úrico; # $p < 0,05$ comparado o grupo APO com ABAH, conforme ANOVA *one-way* seguido do *post-test* de Newman-Keuls.

Os resultados acima sugerem que o HOOU formado pelos neutrófilos (Silva et al., 2018) pode ser o responsável pela morte acentuada da cepa $\Delta ahpc1$. Por essa razão, decidimos investigar o efeito do HOOU sobre a sobrevivência bacteriana *in vitro*. HOOU nas concentrações de 5 a 100 μ M não causou a morte da cepa WT quando incubados por 30 min a 37°C (Fig. 4A). Por outro lado, HOOU em até 20 μ M matou aproximadamente 50% das bactérias mutantes no gene *ahpc1*, enquanto que concentrações mais altas restaurou o padrão de crescimento bacteriano (Fig. 4B). Destaca-se que a fase móvel utilizada na purificação do HOOU por HPLC (em até 40 μ L), contendo acetato de amônio residual, não interferiu na sobrevivência de ambas bactérias selvagem e mutante.

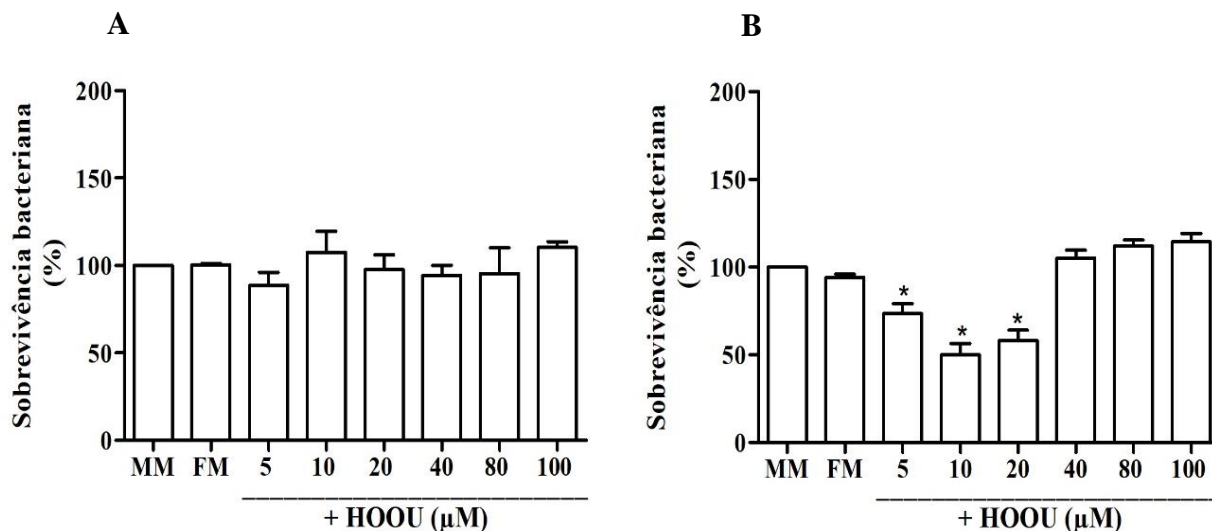


Fig. 4. Sobrevivência bacteriana ao H₂O₂ em cepas PA14 WT (A) e PA14 Δ ahpC1 (B) *in vitro*. As bactérias (1×10^6 UFC/mL) foram incubadas com H₂O₂ por 30 min em meio mínimo (MM) a 37°C. Posteriormente, o meio reacional foi diluído 200 vezes em caldo LB e a suspensão bacteriana estriada sobre placa contendo ágar LB. Após 24 h a 30°C, as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) residuais foram contadas. FM: fase móvel (40 μ L). Os dados foram expressos em médias \pm erro padrão das triplicatas de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com as bactérias incubadas em MM, conforme ANOVA *one-way* seguido do *post-test* de Newman-Keuls.

Em seguida, investigamos a taxa de oxidação de AhpC1 de *X. fastidiosa* por H₂O₂ (Figs. 5A e 5B) e H₂O₂ (Figs. 5C e 5D) em experimentos de cinética rápida com o intuito de verificar a velocidade da reação entre a enzima e os oxidantes. A intensidade da fluorescência decaiu rapidamente na presença de ambos oxidantes (Figs. 5A e 5C), sugerindo a oxidação do tiol à ácido sulfênico. As constantes de velocidade observadas foram linearmente dependentes da concentração de H₂O₂ (Fig. 5B) e H₂O₂ (Fig. 5D) e as constantes de velocidade de segunda ordem, correspondentes à inclinação da reta, foram $1,54 \pm 0,07 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $2,26 \pm 0,09 \times 10^6$ para H₂O₂ e H₂O₂, respectivamente.

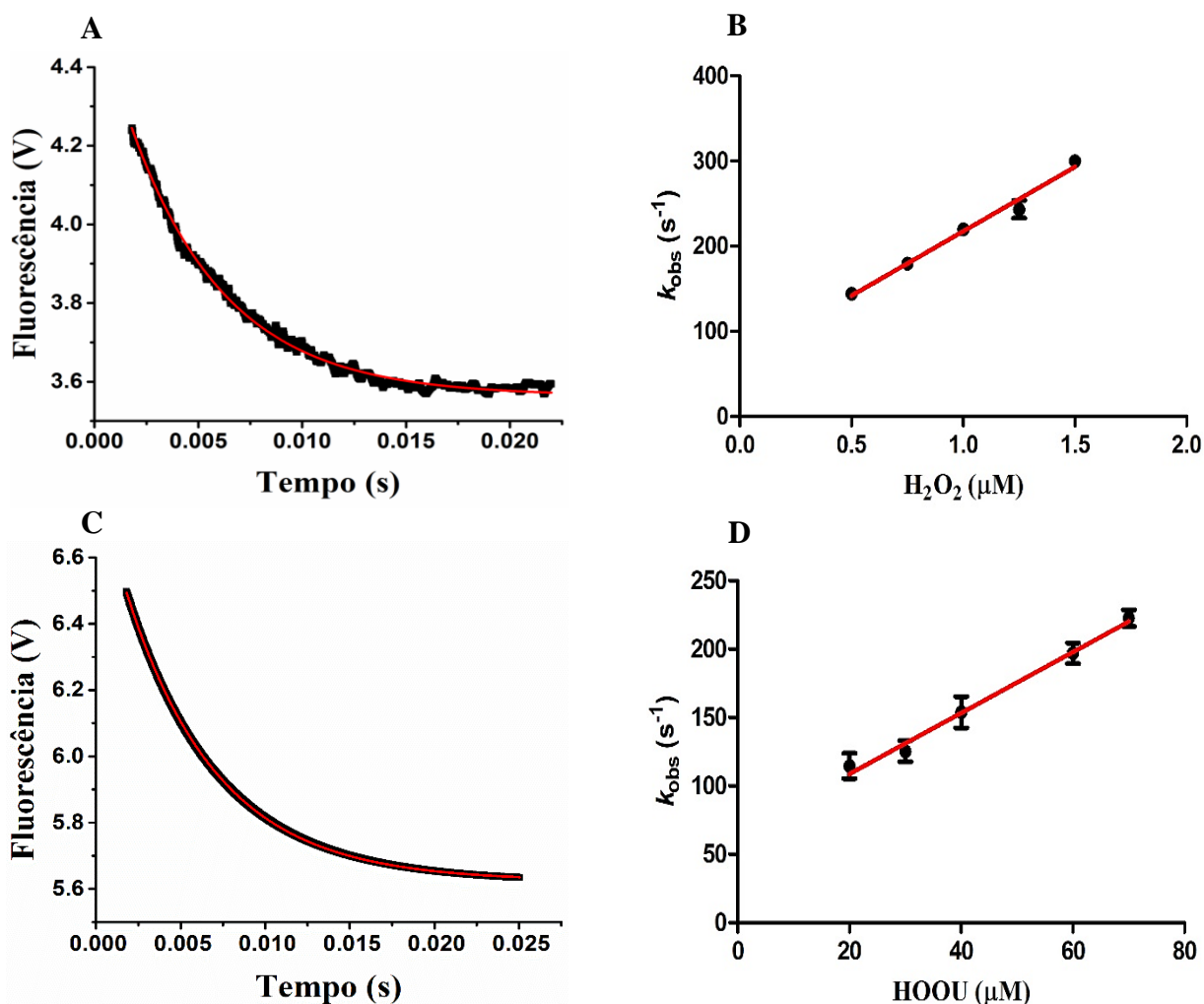


Fig. 5. Cinética de oxidação da AhpC1 pelo H_2O_2 (A e B) e HOOH (C e D). Em (A), a 0,5 μM da AhpC1 pré-reduzida foi incubada com 1 μM de H_2O_2 e em (C) 1 μM da enzima foi incubada com 60 μM de HOOH. As reações foram feitas em tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7,4, 25°C) e monitoradas ao longo do tempo pela variação da fluorescência intrínseca da proteína ($\lambda_{ex} = 280$ nm, filtro de emissão > 320 nm) em fluorímetro de fluxo interrompido. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas pelo decaimento exponencial simples (traço vermelho). (B e D) k_{obs} versus a concentração de H_2O_2 e HOOH, respectivamente. A constante de velocidade da segunda ordem foi calculada a partir desta inclinação (traço vermelho). V: voltagem.

No intuito de verificar se a AhpC1 também é importante na sobrevivência da PA14 *in vivo*, nós infectamos camundongos com as cepas selvagem e $\Delta ahpc1$, via intranasal, para induzir pneumonia aguda. Após 24 h da infecção, o pulmão, baço e fígado foram coletados e o número de UFC foi estimado. Os dados mostraram que os animais infectados com a cepa $\Delta ahpc1$ apresentaram menor carga bacteriana no órgão primário de infecção (Fig. 6), quando comparada à cepa WT ($1,8 \times 10^3$ versus 1×10^4 UFC/g de tecido, respectivamente; $p < 0,0001$).

Além disso, a cepa WT revelou-se mais virulenta, sendo capaz de se disseminar por outros órgãos, como baço e fígado, após 24 h de infecção (Fig. 6).

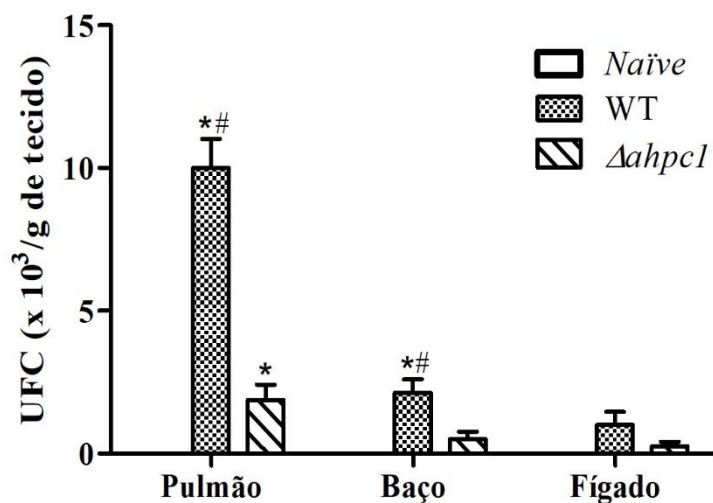


Fig. 6. A AhpC1 confere virulência a PA14 durante a infecção pulmonar. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 2×10^6 bactérias (30 μ L) das linhagens WT e $\Delta ahpC1$ por via intranasal. Após 24 h de infecção, os animais foram eutanaziados, os órgãos coletados e imediatamente macerados em PBS-g. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, diluído, estriado em placa contendo ágar MH e o número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de tecido) foi determinado. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão de 8 animais para os grupos infectados e 3 animais para o grupo controle. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo infectado por $\Delta ahpC1$, conforme ANOVA *one-way* seguido do *post-test* de Newman-Keuls.

A pneumonia induzida por *P. aeruginosa* foi associada ao aumento na contagem de leucócitos totais no LBA dos animais infectados com ambas cepas WT e $\Delta ahpC1$ (Fig. 7). O influxo de leucócitos foi aproximadamente oito vezes maior nos animais infectados com PA14 selvagem do que nos animais *naïve* ($p < 0,0001$) (Figs. 7A e D), sendo os neutrófilos o maior representante dentre os leucócitos totais (94%). Os camundongos infectados com $\Delta ahpC1$ apresentaram um infiltrado leucocitário (Figs. 7A e E) e, conseqüentemente, neutrofílico (Fig. 7B) cerca de 50 e 70% menor que a cepa WT, respectivamente ($p < 0,0001$ para ambos).

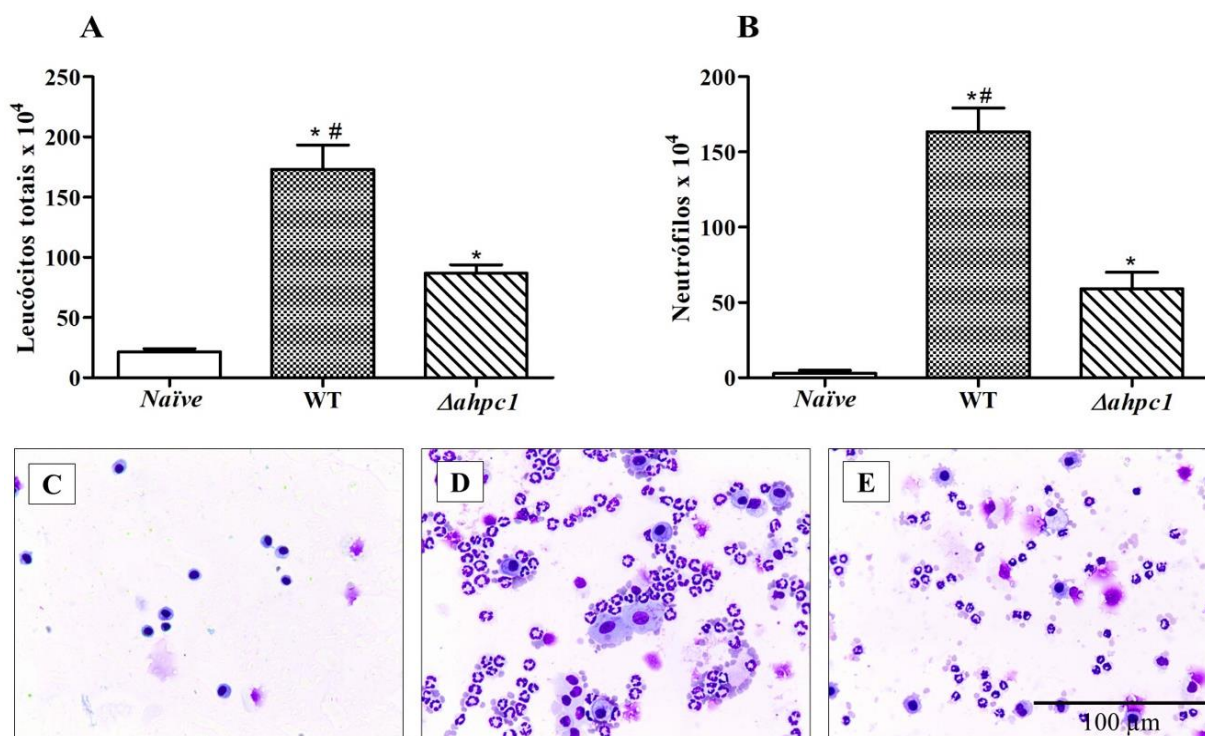


Fig. 7. Contagem de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) no LBA após 24 h de infecção intranasal com as cepas WT e $\Delta ahpc1$ (2×10^6 UFC). Após 24 h da inoculação das bactérias, o LBA foi coletado, as células foram diluídas em líquido de Turk e contadas em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada após citocentrifugação de 50 μ L da amostra, coloração pelo método Panótico rápido, e contagem de um total de 100 células. Fotomicrografias representativas da contagem de células no LBA de camundongos C57BL/6 naíve (C), inoculados com a cepa WT (D) ou $\Delta ahpc1$ (E). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão de 8 animais para os grupos infectados e 3 animais para o grupo controle (naíve). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo infectado por $\Delta ahpc1$, conforme ANOVA *one-way* seguido do *post-test* de Newman-Keuls.

Na avaliação histológica, os pulmões dos camundongos infectados com a cepa WT apresentaram um intenso infiltrado neutrofílico (~19 células/campo) ($p < 0,0001$) (Fig. 8A), enquanto que nos animais infectados pela cepa $\Delta ahpc1$ a quantidade de neutrófilos nesse tecido foi semelhante ao grupo *naíve* (~1,9 células/campo) (Fig. 8A). A presença dos neutrófilos foi confirmada pela determinação da atividade peroxidásica tecidual, que se mostrou duas vezes maior no tecido do animal inoculado com a cepa WT quando comparada com a linhagem $\Delta ahpc1$ ($p < 0,0001$) (Fig. 8B). O uso de ABAH (100 μ M) confirmou que a oxidação do TMB pelo homogeneizado do grupo infectado pela cepa WT foi decorrente quase que exclusivamente à presença dessa enzima (Fig. 8B).

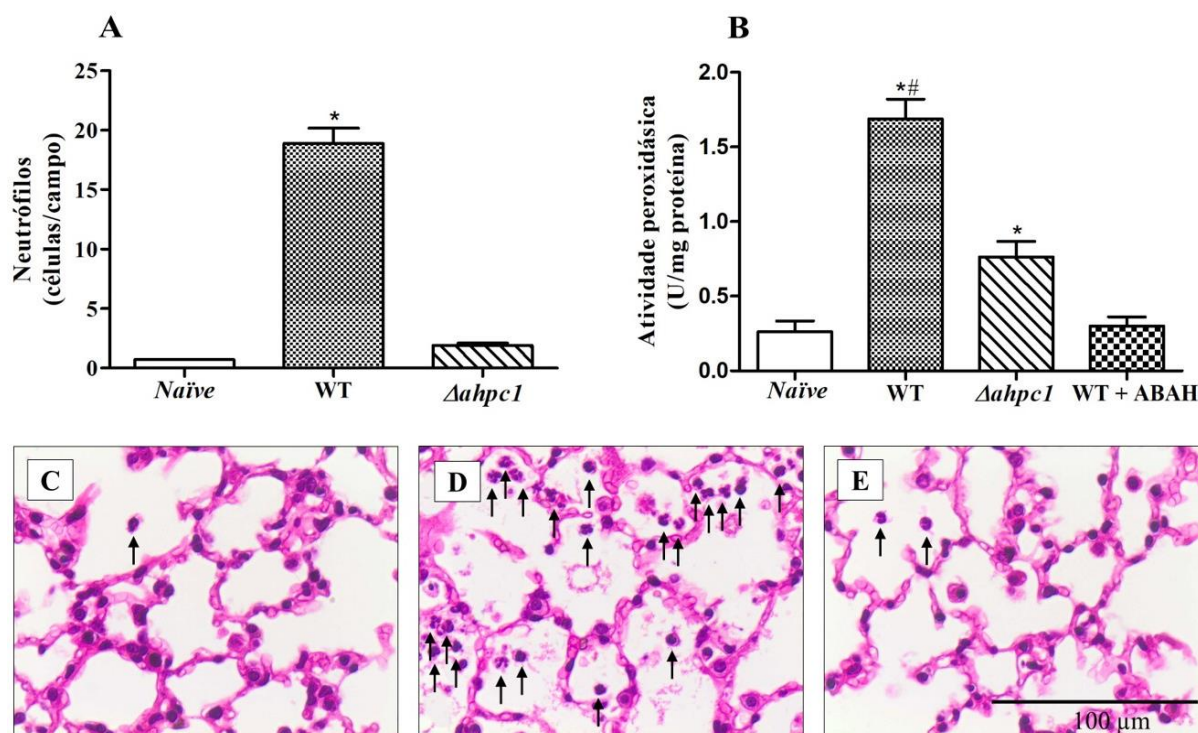


Fig. 8. Contagem de neutrófilos no tecido pulmonar após 24 h de infecção (A), atividade peroxidásica (B) e fotomicrografias representativas da contagem de neutrófilos (setas) nas lâminas do tecido pulmonar coradas com HE de um animal do grupo *naïve* (C), inoculado com a cepa WT (D) e $\Delta ahpc1$ (E) sob aumento de 400x. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 2×10^6 bactérias das linhagens WT e $\Delta ahpc1$ por via intranasal. Após 24 h de infecção, o tecido pulmonar foi coletado cirurgicamente por laparotomia mediana e corado com HE. Parte do tecido pulmonar também foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio e os homogenatos (10 μ L) foram misturados com H_2O_2 e uma solução de TMB. A oxidação do TMB foi acompanhada a 450 nm. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão de 8 animais para os grupos infectados e 3 animais para o grupo controle. * $p < 0,05$ comparado o grupo WT com os grupos controle e o infectado por $\Delta ahpc1$ (A); * $p < 0,05$ comparado WT e $\Delta ahpc1$ com os grupos *naïve* e WT+ABAH (B); # $p < 0,05$ comparado o grupo infectado por WT com $\Delta ahpc1$ (B). Todos os dados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido do *post-test* de Newman-Keuls.

Em seguida, os níveis de TBARS no tecido pulmonar (Fig. 9A) e de nitrito no LBA (Fig. 9B) foram avaliados na tentativa de determinar o estado redox preliminar do animal na infecção. Os dados demonstraram que ambos os parâmetros se apresentaram maiores nos camundongos infectados com a cepa selvagem quando comparados com aqueles inoculados com a cepa mutante ($p < 0,0001$ e $p < 0,0002$, respectivamente).

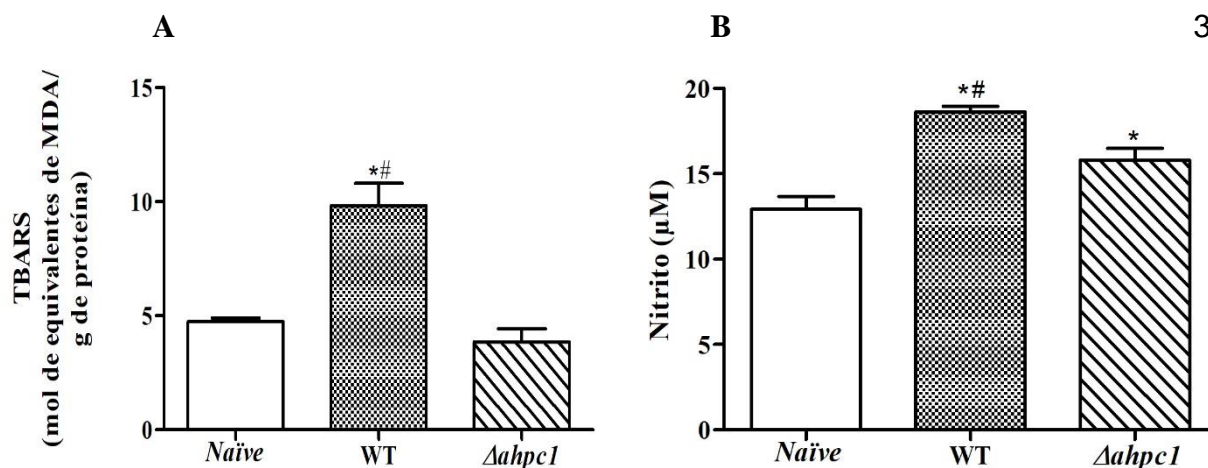


Fig. 9. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido pulmonar (A) e de nitrito no LBA (B), após 24 h de infecção. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 2×10^6 bactérias das linhagens WT e $\Delta ahpc1$ por via intranasal. O tecido pulmonar coletado foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM) e hidroxitolueno butilado na concentração de 100 mg/mL. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado, o sobrenadante coletado e diluído em tampão Tris HCl acrescido de ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico. O meio reacional foi então aquecido, centrifugado e o sobrenadante lido a 535 nm. A concentração de TBARS no tecido pulmonar foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído e expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína. Após 24 h de infecção, o LBA foi coletado e cada uma das amostras do lavado (50 μ L) reagiu com 50 μ L de solução de 0,1% de naftiletlenodiamina e com 50 μ L de solução de 1% de sulfanilamida. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão de 8 animais para os grupos infectados e 3 animais para o grupo controle. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo infectado por $\Delta ahpc1$, conforme ANOVA *one-way* seguido do *post-test* de Newman-Keuls.

Por fim, o tecido pulmonar dos animais foi avaliado quanto à expressão de mRNA IL-6 e mRNA TNF- α por qPCR com objetivo de investigar o perfil inflamatório do animal. Conforme pode ser observado na Tabela 3, apenas os camundongos infectados com a cepa WT apresentaram expressão de mRNA IL-6 e mRNA TNF- α , enquanto que nos grupos *naïve* e infectado com a cepa mutante para a enzima AhpC1 a expressão foi indetectável e, por esse motivo, os dados foram expressos apenas pelo *cycle threshold*.

Tabela 3. Expressão das citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar dos animais expostos as cepas WT e $\Delta ahpc1$ de PA14.

Gene	<i>Cycle threshold</i>		
	C -	WT	$\Delta ahpc1$
GAPDH (<i>housekeeping</i>)	24,80 \pm 1,46	24,22 \pm 1,61	31,85 \pm 5,74
IL-6	ND	30,70 \pm 0,51	ND
TNF- α	ND	27,78 \pm 1,52	ND

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente de lise *TRIzol*, conforme protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μ g do RNA total por meio do kit de transcrição reversa *High-Capacity RNA-to-cDNA*. O sistema *SYBR Green Mastermix* foi utilizado no PCR *real-time*. Os resultados de expressão gênica foram obtidos a partir das

médias de *cycle threshold* de cada gene. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média de três animais para cada grupo. ND, não detectado.

3.2.4 Discussão

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez o papel da enzima AhpC1 na virulência de *P. aeruginosa*, linhagem PA14. As enzimas AhpC são descritas em bactérias como *Legionella pneumophila* [82], *Staphylococcus aureus* [84] e *Helicobacter cinaedi* [85], sendo relacionadas com a detoxificação e sobrevivência desses micro-organismos diante diversos oxidantes. Nossos resultados demonstraram que a AhpC1 de PA14 é essencial para sobrevivência da bactéria exposta ao HOCl, tanto *in vitro* (Fig. 2) quanto gerado por neutrófilos humanos (Fig. 3). O HOCl é um potente oxidante capaz tanto de modificar o DNA bacteriano [124] quanto de inibir sua síntese [125], além de reagir com proteínas e lipídeos [126], o que justifica seu potencial microbicida, o que indica que a enzima AhpC1 possa estar envolvida na eliminação do HOCl e consequente sobrevivência da bactéria.

O ácido úrico é reconhecido como um doador de elétrons acessível e que no contexto inflamatório pode ser rapidamente oxidado pela MPO através dos compostos I e II ($4,6 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente), gerando radical de urato [16]. O radical de urato, por sua vez, reage com $\text{O}_2^{\cdot -}$ para formar HOOU, um moderado oxidante [16,56] cujas propriedades biológicas ainda estão sob estudo. Além disso, o ácido úrico pode precipitar e formar de cristais responsáveis pela ativação do inflamassoma NALP3, estimular a secreção de IL-1 β , o recrutamento de neutrófilos [52,54], a atividade de NADPH oxidase e a formação de NETs [55], eventos esses que contribuem consideravelmente com a amplificação do potencial redox dos fagócitos [13].

Nossos dados revelaram que a exposição ao ácido úrico protegeu a cepa WT da morte por neutrófilos humanos (Fig. 3A), o que provavelmente se deve à redução da atividade clorinante da MPO. Por ser substrato para a MPO, o ácido úrico compete com o ânion Cl^- e reduz a produção de HOCl o que resulta em menor depuração bacteriana [17]. Além disso, o ácido úrico pode reagir diretamente com o HOCl e originar produtos estáveis de baixo potencial oxidativo [123]. Todavia, a cepa ΔahpC1 se mostrou mais sensível à morte por neutrófilos na presença de ácido úrico (Fig. 3B) quando comparada com a linhagem selvagem. Apesar da redução da atividade clorinante da mieloperoxidase pelo ácido úrico [17], o HOOU formado pode ser o responsável pela morte da cepa mutante em AhpC1, assim, hipotetizamos que essa enzima possa ter participação na depuração do HOOU. Dessa maneira, para comprovar que a morte bacteriana se devia prioritariamente por mecanismos

oxidativos dependentes da MPO, a adição do inibidor da enzima, ABAH [99,100], restaurou a sobrevivência de ambas cepas WT e $\Delta ahpc1$ incubadas com neutrófilos humanos, o que provou o envolvimento da MPO nesse processo.

Nós observamos em seguida que HOOU causou a morte da cepa $\Delta ahpc1$ *in vitro*, em concentrações até 20 μM (Fig. 4B), mas não afetou a sobrevivência da linhagem selvagem quando incubado em até 100 μM (Fig. 4A). Carvalho e colaboradores [17] demonstraram que o ácido úrico desviou o ciclo clorinante da MPO ao passo que produz HOOU em células dHL-60 desafiadas com PA14, aumentando a sobrevivência da bactéria. Além disso, estudos de cinética rápida demonstraram que o HOOU e H_2O_2 reagem com uma Prx humana do tipo 2-Cys, a Prx2, com altas constantes de velocidade ($4,90 \times 10^5$ e $1,00 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente) [72,81], o que corrobora com nossa hipótese de que a AhpC1, também uma Prx do tipo 2-Cys, deve estar envolvida com a redução do HOOU e H_2O_2 (e mesmo do HOCl) e, possivelmente, na resistência da PA14 ao *burst* oxidativo.

Estudos de cinética rápida foram então conduzidos para se determinar a constante de velocidade da reação entre HOOU e H_2O_2 com AhpC purificada de *X. fastidiosa*. Uma vez que a oxidação dos tiois peroxidásicos desta 2-Cys Prx causa o “quenching” da fluorescência intrínseca da proteína, monitoramos a queda desta fluorescência para fins do cálculo da velocidade da reação [109]. Conforme esperado, tanto HOOU (Figs. 5C e D) quanto H_2O_2 (Figs. 5A e B) oxidam a enzima com altas constantes de velocidade de segunda ordem ($k = 2,26 \pm 0,09 \times 10^6$ e $1,54 \pm 0,07 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente). De acordo com a reatividade e cinéticas descritas para o HOCl, também esperamos que a reação entre AhpC1 e esse oxidante seja na mesma ordem, embora esses estudos ainda estão sendo conduzidos. Parsonage e colaboradores [108] observaram que a AhpC de *Salmonella typhimurium*, cuja identidade com AhpC1 de PA14 é de 61%, reagiu com H_2O_2 com constantes de velocidade de segunda ordem também elevadas ($5,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A Ohr de PA14 também pertencente à família das Prx do tipo 2-Cys, reage com H_2O_2 com constante de velocidade na de $3,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ enquanto que com uma série de hidroperóxidos de lipídeos e peroxinitrito ambas na ordem de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [89]. Esses achados corroboram o envolvimento das enzimas do tipo 2-Cys, especialmente a classe AhpC, no consumo desses oxidantes e, conseqüentemente, conferindo resistência das bactérias aos neutrófilos.

P. aeruginosa é bem reconhecida pela associação com infecções e processos sépticos de difícil controle [60,61], sendo capaz de disseminar-se rapidamente *in vivo*, afetando todos os tecidos e especialmente os pulmões quando inalada [127]. No modelo animal de pneumonia aguda, a cepa WT de PA14 foi encontrada nos pulmões, baço e fígado com carga

bacteriana de 1×10^4 , 2×10^3 e 1×10^3 UFC/g de tecido, respectivamente (Fig. 6), conforme observado anteriormente [19]. A cepa mutante em AhpC1 também se disseminou para esses tecidos, contudo, a carga bacteriana foi menor ($p=0,0001$ e $p=0,0063$ para pulmão e baço, respectivamente) quando comparada com a linhagem WT (Fig. 6). Essa menor formação de UFC não se deve a uma alteração na taxa de crescimento da mutante, pois ambas as cepas $\Delta ahpc1$ e WT apresentaram curva de crescimento semelhante em meio LB (dado não mostrado), o que também foi observado em *Vibrio vulnificus* selvagem e mutada na AhpC1 [128]. Um estudo recente com modelo animal de pneumonia aguda por PA14 também demonstrou que a carga bacteriana foi menor nos tecidos dos camundongos infectados com uma cepa de PA14 mutada na Prx do tipo 1-Cys LsfA, em comparação à linhagem selvagem [19]. Em conjunto, esses resultados evidenciam a importância das Prx na virulência de *P. aeruginosa in vivo*.

No processo infeccioso, *P. aeruginosa* induz a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para os capilares pulmonares no espaço alveolar enquanto dissemina-se pelo trato respiratório inferior [129,130]. Assim, nós detectamos um maior influxo de leucócitos totais no LBA e no pulmão (Figs. 7A e 8A) nos animais infectados com a cepa WT, com predominância de neutrófilos (Figs. 7B e 8A), em comparação com os camundongos que receberam a cepa $\Delta ahpc1$. A migração neutrofílica causada pela cepa selvagem foi diretamente associada com o aumento na atividade peroxidásica no tecido pulmonar, em decorrência da presença da MPO (Fig. 8B) [131,8]. Similarmente ao observado para o infiltrado neutrofílico, a atividade da MPO também foi menor nos pulmões dos animais infectados com $\Delta ahpc1$ (Fig. 8B). Esses achados suportam a hipótese que a mutante para o gene *ahpc1* é mais sensível a resposta imune inata do hospedeiro quando comparada com a cepa WT, ao passo que não exige o aumento expressivo da infiltração leucocitária no curso da infecção.

Neutrófilos ativados podem oxidar biomoléculas no tecido do hospedeiro e originar produtos que podem ser utilizados como biomarcadores da intensidade do processo redox [132,133]. A peroxidação lipídica é uma consequência bastante conhecida da ativação neutrofílica [134,135] e aqui nós quantificamos uma maior concentração de substâncias oriundas da peroxidação lipídica nos tecidos dos animais infectados com a cepa WT (Fig. 9A). Além disso, em processos inflamatórios agudos, neutrófilos podem causar nitratação em proteínas do agente infeccioso através da formação de NO_2^\bullet pela MPO, principalmente [136]. Por ser um produto de degradação de substância nitrantes, o NO_2^- pode ser utilizado como marcador indireto da atividade da MPO [137]. Nossos dados demonstraram que a

concentração do nitrito também foi maior no LBA dos animais infectados pela cepa WT quando comparados com os infectados com $\Delta ahpc1$ (Fig. 9B).

O recrutamento desses neutrófilos para o sítio infeccioso acontece tanto por estímulo antigênico direto como também pela produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos e macrófagos, que estimulam a migração de mais células, cujas concentrações relacionam-se diretamente com a virulência da bactéria [138,129]. Nos pulmões dos camundongos infectados com PA14 a bactéria mutante na AhpC1 não detectamos a expressão do mRNA para as citocinas IL-6 e TNF- α (Tabela 3), ao contrário dos animais expostos à cepa selvagem. Esses fatos indicam mais uma vez a relevância da enzima não apenas na virulência bacteriana como também na intensidade do processo inflamatório associado.

Em conclusão, estes dados demonstram, pela primeira vez, o papel central da enzima AhpC1 na sobrevivência de PA14 *in vitro*, em neutrófilos humanos e *in vivo*. Estudos voltados à compreensão dos mecanismos de virulência bacteriana podem fornecer informações no desenvolvimento de moléculas antibacterianas novas e específicas, haja visto o crescimento dos casos de bactérias multiresistentes aos antibióticos convencionais. Nesse contexto, a enzima AhpC1 pode ser um alvo importante e ainda não explorado para o controle de infecções relacionadas com *P. aeruginosa*. Além disso, estudos clínicos podem fornecer subsídios necessários para a compreensão dos processos associados à virulência de PA14 e da defesa imune do hospedeiro diante de infecções causadas por bactérias virulentas, principalmente em condições envolvendo fatores agravantes como a hiperuricemia [62,65,18].

3.2.5 Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

3.2.6 Agradecimentos

Os autores agradecem a Prof^a Dr^a Regina Baldini, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, e Dr. Diogo de Abreu Meireles, Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo, pela concessão das cepas bacterianas selvagem e mutantes de PA14, ao Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, pelo auxílio na condução dos experimentos com animais e na expressão das citocinas inflamatórias, ao Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva, Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, pelo auxílio na análise histológica, ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto e Dr^a Simone Vidigal Alves, do Instituto

de Biologia da Universidade de São Paulo, pela concessão da *E.coli* transformada com plasmídeo contendo o gene para expressão de AhpC de *X. Fastidiosa*.

3.2.7 Fontes de financiamento

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) (RED038/2014), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (462401/2014-6), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) CEPID Redoxoma (2013/07937-8).

REFERÊNCIAS

- [1] WAGNER, VE.; IGLEWSKI, BH. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in CF infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 35, p. 124-134.
- [2] MITOV, I.; STRATEVA, T.; MARKOVA, B. 2010. Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 588-595.
- [3] VIDAL, F.; MENSA, J.; ALMELA, M.; MARTINEZ, JA.; MARCO, F.; CASALS, C.; GATELL, JM.; SORIANO, E.; ANTA, MTJ. 1996. Epidemiology and Outcome of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia, With Special Emphasis on the Influence of Antibiotic Treatment. *Archives of Internal Medicine*, v. 156, p. 2121-2126.
- [4] LYCZAK, JB.; CANNON, CL.; PIER, GB. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbs and Infection*, v. 2, p. 1051-1060.
- [5] WINTERBOURN, CC.; KETTLE, AJ.; HAMPTON, MB. 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review Biochemistry*, v. 14, n. 21, p. 15.1-15.28.
- [6] TENG, TS.; J, AL.; J, XY.; L, YZ. 2017. Neutrophil and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *Journal of Immunology Research*, p. 1-14.
- [7] BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; UHLEMANN, Y.; WEISS, DS.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535.
- [8] KLEBANOFF, SJ. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 5, p. 598-625.
- [9] MCCORD, JM.; FRIDOVICH, I. 1968. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 244, p. 6049-6055.

- [10] BABIOR, BM. 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, v. 16, p. 42-47.
- [11] PODREZ, EA.; ABU-SOUD, HM.; HAZEN, SL. 2000. Myeloperoxidase-Generated Oxidants And Atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 28, n.12, p. 1717-1725.
- [12] CERQUEIRA, FM.; MEDEIROS, MHG.; AUGUSTO, O. 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n. 2, p. 441-449.
- [13] HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press Inc.
- [14] SAUTIN, YY.; JONHSON, RJ. 2008. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, v. 27, n. 6, p. 608-619.
- [15] STOCKER, R. & KEANEY, JF. 2004. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiology Reviews*, v. 84, p. 1381-1478.
- [16] MEOTTI, FC.; JAMESON, GNL.; TURNER, F.; HARWOOLD, DT.; STOCKWELL, S.; REES, MD.; THOMAS, SR. & KETTLE, A. 2011. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for hyperuricemia and inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 15, p. 2901-2911.
- [17] CARVALHO, LAC.; LOPES, JPPB.; KAIHAMI, GH.; SILVA, RP.; BRUNICARDOSO, A.; BALDINI, RL.; MEOTTI, FC. 2018. Uric acid disrupts hypochlorous acid production and the bactericidal activity of HL-60 cells. *Redox Biology*, v. 16, p. 179-188.
- [18] AKBAR, SR.; LONG, DM.; HUSSAIN, K.; ALHAJHUSAIN, A.; AHMED, US.; IQBAL, HI.; ALI, AW.; LEONARD, R. & DALTON C. 2015. Hyperuricemia: and early marker for severity of illness in sepsis. *International Journal of Nephrology*, v. 2015, p. 1-8.
- [19] KAIHAMI, GI.; ALMEIDA, JRF.; SANTOS, SS.; NETTO, LES.; ALMEIDA, SR. & BALDINI, LR. 2014. Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *Plos Pathogens*, v. 10, n. 10, p. 1-10.

- [20] BRYK, R.; GRIFFIN, P.; NATHAN, C. 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, v. 407, p. 211-215.
- [21] NELSON, KJ.; KNUTSON, ST.; SOITO, L.; KLOMSIRI, C.; POOLE, LB. & FETROW, JS. 2011. Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins*, v. 79, n. 3, p. 947-964.
- [22] BRUBAKER, SW.; BONHAM, KS.; ZANONI, I.; KAGAN, JC. 2015. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual Review of Immunology*, v. 33, p. 257-290.
- [23] URBAN, CF.; ERMERT, D.; SCHMID, M.; ABU-ABED, U.; GOOSMANN, C.; NACKEN, W.; BRINKMANN, V.; JUNGBLUT, PR.; ZYCHLINSKY. 2009. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *Plos One Pathogens*, v. 5, n. 10, p. 1-18.
- [24] DALE, DC.; BOXER, L.; LILES, WC. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood Journal*, v. 112, n. 4, p. 935-945.
- [25] BEDARD, K. & KRAUSE, KH. 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 87, p. 245-313.
- [26] BOS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. 1987. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 525, p. 37-44.
- [27] WINTERBOURN, CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 5, p. 278-286.
- [28] MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, HJ. 2003. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney International*, v. 64. p. 1956-1967.
- [29] REMINGTON & TRIMBLE. 1928. The oxidation potentials of some hypochlorite solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 3, n. 33, p. 424-434.

- [30] ALBRICH, JM.; GILBAUGH, JH.; CALLAHAN, KB.; HURST, JK. 1986. Effects of the Putative Neutrophil-generated Toxin, Hypochlorous Acid, on Membrane Permeability and Transport Systems of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 78, p. 177-184.
- [31] RAKITA, RM.; MICHEL, BR.; ROSEN, H. 1990. Differential Inactivation of *Escherichia coli* Membrane Dehydrogenases by a Myeloperoxidase-Mediated Antimicrobial System. *Biochemistry*, v. 29, p. 1075-1080.
- [32] ROSEN, H.; ORMAN, J.; RAKITA, RM.; MICHEL, BR.; VANDEVANTER, DR. 1990. Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, p. 10048-10052.
- [33] WINTERBOURN, CC. 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*, p. 223–227.
- [34] DAVIES, M. 2011. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 48, n. 1, p. 8-19.
- [35] NICHOLLS, SJ.; HAZEN, SL. 2005. Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 25, p. 1102-1111.
- [36] LEFKOWWITZ, DL.; LEFKOWWITZ, SS. 2008. Microglia and myeloperoxidase: A deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 45, p. 726-731.
- [37] WONG, ND.; GRANSAR H.; NARULA, J.; SHAW, L.; MOON, JH.; MIRANDA-PEATS, R.; ROZANSKI, A.; HAYES, SW.; THOMSON, LEJ.; FRIEDMAN, JD. & BERMAN, DS. 2009. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JAAC: Cardiovascular imaging*, v. 2, n. 9, p. 1093-1099.

[38] RASHID, I.; MAGHZAL, GJ.; CHEN, YC.; CHENG, D.; TALIB, J.; NEWINGTON, D.; REN, M.; VAJANDAR, SK.; SEARLE, A.; MALUENDA, A.; LINDSTEDT, EL.; JABBOUR, A.; KETTLE, AJ.; BONGERS, A.; POWER, C.; MICHAELSSON, E.; PETER, C.; STOCKER, R. 2018. Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque. *European Heart Journal*, v. 39, p. 1-10.

[39] BALDUS, S.; HEESCHEN, C.; MEINERTZ, T.; ZEHER, AM.; EISERICH, JP.; MUNZEL, T.; SIMOONS, ML.; HAMM, CW. 2003. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, p. 1440-1447.

[40] MOCATTA, TJ.; PILBROWL, AP.; CAMERON, VA.; SENTHILMOHAN, R.; FRAMPTON, CM.; RICHARDS, AM.; WINTERBOURN, CC. 2007. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 49, n. 20, p. 1993-2000.

[41] VITA, JA.; BRENNAN, ML.; GOKCE, N.; MANN, AS.; GOORMASTIC, M.; SHISHEHBOR, MH.; PENN, MS.; KEANEY, JF.; HAZEN, SL. 2004. Serum Myeloperoxidase Levels Independently Predict Endothelial Dysfunction in Humans. *Circulation*, v. 110, n.9, p. 1134-1139.

[42] NIMSE, SB. & PAL, D. 2015. Free Radicals, Natural Antioxidants, and their Reaction Mechanisms. *Royal Society of Chemistry*, v. 1, n. 35, p. 1-36.

[43] MAIUOLO, J.; OPPEDISANO, F.; GRATTERI, S.; MUSCOLI, C.; MOLLACE, V. 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion, v. 213, p. 8-14.

[44] HYNDMAN, D.; LIU, S. & MINER, JN. 2016. Urate handling in the human body. *Current Rheumatology Reports*, v. 18, n. 34, p. 1-9.

[45] WINTERBOURN, CC. 1985. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 840, n. 1985, p. 204-210.

[46] SUEISHI, Y.; HORI, M.; ISHIKAWA, M.; MATSU-URA, K.; KAMONGAWA, E.; HONDA, Y.; KITA, M.; OHARA, K. 2014. Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 54, n. 2, p. 67-74.

[47] AMES, BN.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOSHSTEIN, P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 78, n. 11, p. 6858-6862.

[48] DOMAZOU, AS.; ZHU, H.; KOPPENOL, WH. 2012. Fast repair of protein radicals by urate. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, p. 1929–1936.

[49] KUTZING, MK. & FIRESTEIN, BL. 2008. Altered uric acid levels and disease states. *Perspectives in Pharmacology*, v. 324, n. 1, p. 1-7.

[50] CIPRIANI, S.; CHEN, X. & SCHWARZSCHILD, MA. 2010. Urate: a novel biomark of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomarkers in Medicine*, v. 4, n. 5, p. 701-712.

[51] ASHTARI, F.; BAHAD, M.; AGHAEI, M. & ZAHED, A. 2013. Serum uric acid level in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 20, p. 676-678.

[52] MARTINON, F.; PÉTRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, v. 440, p. 237-241.

[53] DINARELLO, CA. 2009. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 519-550.

[54] SHI, Y. 2010. Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 6, p. 1809-1811.

- [55] ARAI, Y.; NISHINAKA, Y.; ARAI, T.; MORITA, M.; MIZUGISHI, K.; ADACHI, S.; TAKAORI-KONDO, A.; WATANABE, T.; YAMASHITA, K. 2014. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 443, p. 556–561.
- [56] PATRICIO, ES.; PRADO, FM.; SILVA, RP.; CARVALHO, LAC.; PRATES, MVC.; DADAMOS, T.; BERTOTTI, M.; MASCIO, P.; KETTLE, AJ.; MEOTTI, FC. 2015. Chemical Characterization of Urate Hydroperoxide, A Pro-oxidant Intermediate Generated by Urate Oxidation in Inflammatory and Photoinduced Processes. *Chemical Research in Toxicology*, v.28, p. 1556-1566.
- [57] TURNER, F.; BRENNAN, SO.; ASHBY, LB.; DICKERHOF, N.; HAMZAH, MR.; PEARSON, JF.; STAMP, LK.; KETTLE, A. 2018. Conjugation of urate-derived electrophiles to proteins during normal metabolism and inflammation. *Journal Biological Chemistry*, v. 293, n. 51, p. 19886-19898.
- [58] CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Sepsis: um problema de saúde pública. 2015. Instituto Latino Americano Para Estudos da Sepsis (ILAS). 90 p.
- [59] LOHO, T. & DHARMAYANTI, A. 2015. Colistin: an Antibiotic and Its Role in Multiresistant *Gram-negative* Infections. *Acta Medica Indonesiana*, v. 47, n. 2, p. 157-168.
- [60] CHATTERJEE, M.; ANJU, CP.; BISWAS, L.; KUMAR, VA.; MOHAN, CG. & BISWAS, R. 2015. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 306, n. 1, p. 48-58.
- [61] BERUBE, BJ.; RANGEL, SM.; HAUSER, AR. 2016. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Current Genetics*, v. 62, n. 1, p. 109-113.
- [62] BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H. & MATHEE, K. 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, p. 1-20.

- [63] MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; ELDERE, J.; GLUPCZINSKI, Y.; LAETHEM, Y.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, PM. & BAMBEKE, F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection Diseases*, v. 13, p. 560-578.
- [64] LEE, JS.; HEO, YJ.; LEE, JK.; CHO, YH. 2005. KatA, the Major Catalase, Is Critical for Osmoprotection and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infection and Immunity*, v.73, n.7, p. 4399-4403.
- [65] IYAMA, K.; CHIEDA, Y.; LEE, JM.; KUSAKABE, T.; AOKI, CY.; SHIMIZU, S. 2007. Effect of Superoxide Dismutase Gene Inactivation on Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the Silkworm, *Bombyx mori*. *Environmental Microbiology*, v. 73, n. 5, p. 1569-1575.
- [66] WIEHLMANN, L.; WAGNER, G.; CRAMER, N.; SIEBERT, B.; GUDOWIUS, P.; MORALES, G.; KÖHLER, T.; VAN DELDEN, C.; WEINEL, C.; SLICKERS, P.; TÜMMLER, B. 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 19, p. 8101-8106.
- [67] VAREECHON, C.; ZMINA, SE.; KARMAKAR, M.; PEARLMAN, E.; RIETSCH, A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell Host & Microbe*, v. 21, p. 611-618.
- [68] RHEE, SG. & KIL, S. 2017. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annual Review Biochemistry*, v. 13, n.16, p. 5.1-5.27.
- [69] RHEE, SG.; KANG, SW.; CHANG, TS.; JEONG, W.; KIM, K. 2001. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life*, v. 52, p. 35-41.
- [70] HOFMANN, B.; HECHT, HJ.; FLOHE, L. 2002. Peroxiredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 383, p. 347-364.

[71] WOOD, ZA.; SCHRODER, E.; HARRIS, JR.; POOLE, LB. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, v. 28, n. 1, p. 32-40.

[72] CARVALHO, LAC.; TRUZZI, DR.; FALLANI, TS.; ALVES, SV.; TPLEDO, JC.; AUGUSTO, O.; NETTO, LES.; MEOTTI, FC. 2017. Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *The journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 21, p. 8705-8715.

[73] STOCKER, S.; LAER, KV.; MIJUSKOVIC, A.; DICK, TP. 2018. The conundrum of H₂O₂ signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 28, n. 7, p. 558-573.

[74] KANG, D.; RHEE, SG.; WOO, HAE. 2018. The Role of Peroxiredoxins in the Transduction of H₂O₂ Signals. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 28, n. 7, p. 537-557.

[75] RHEE, SG.; WOO, HA.; KIL, IS.; BAE, SH. 2012. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *The Journal of Biological chemistry*, v. 287, n. 7, p. 4403-4410.

[76] MONTEIRO, G.; HORTA, BB.; PIMENTA, DC.; AUGUSTO, O. & NETTO, LES. 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 Science*, v. 104, n. 12, p. 4886-4891.

[77] RALAT, LA.; MISQUITTA, SA.; MANEVICH, Y.; FISCHER, AB. & COLMAN, RF. 2008. Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and 1-cysteine peroxiredoxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 474, n. 1, p. 109-118.

[78] PESKIN, AV.; LOW, FM.; PATON, LN.; MAGHZAL, GJ.; HAMPTON, MB.; WINTERBOURN, CC. 2007. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n.16, p. 11885-11892.

- [79] TRUJILLO, M.; CLIPPE, A.; MANTA, B.; FERRER-SUETA, G.; SMEETS, A.; DECLERCQ, JP.; KNOOPS, B.; RADI, R. 2007. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 467, p. 95-106.
- [80] STACEY, MM; PESKIN, AV; VISSERS, MC; WINTERBOURN, CC. 2009. Chloramines and hypochlorous acid oxidize erythrocyte peroxiredoxin 2. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47(10), p. 1468-1476.
- [81] MANTA, B.; HUGO, M.; ORTIZ, C.; FERRER-SUETA, G.; TRUJILLO, M.; DENICOLA, A. 2009. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 484, p. 146-154.
- [82] LEBLANC, JJ.; DAVIDSON, RJ.; HOFFMAN, PS. 2006. Compensatory Functions of Two Alkyl Hydroperoxide Reductases in the Oxidative Defense System of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 17, p. 6235-6244.
- [83] HU, Y. & COATES, ARM. 2009. Acute and Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Infections Depend on the Thiol Peroxidase TPX. *PLOS ONE*, v. 4, n. 4, p. 1-10.
- [84] COSGROVE, K.; COUTTS, G.; JONSSON, IM.; TARKOWSKI, A.; KUN, JFK.; MOND, JJ.; FOSTER, SJ. 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*, v. 189, n. 3, p. 1025-1035.
- [85] CHAROENLAP, N.; SHEN, Z.; MCBEE, ME.; MUTHUPALANI, S.; WOGAN, GN.; FOX, JG.; SCHAUER, DB. 2011. Alkyl Hydroperoxide Reductase Is Required for *Helicobacter cinaedi* Intestinal Colonization and Survival under Oxidative Stress in BALB/c and BALB/c Interleukin-10^{-/-} Mice. *Infection and Immunity*, p. 921-928.
- [86] MONGKOLSUK, S.; PRAITUAN, W.; LOPRASET, S.; FUONTHONG, M.; CHAMNONGPOL, S. 1998. Identification and Characterization of a New Organic Hydroperoxide Resistance (*ohr*) Gene with a Novel Pattern of Oxidative Stress Regulation

from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Journal of Bacteriology, v. 180, n. 10, p. 2636-2643.

[87] OCHSNER, A.; HASSETT, DJ.; VASIL, ML. 2001. Genetic and Physiological Characterization of *ohr*, Encoding a Protein Involved in Organic Hydroperoxide Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, v. 183, n. 2, p. 773-778.

[88] LESNIAK, J.; BARTON, WA.; NIKILOV, DB. 2002. Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. The EMBO Journal, v. 21, n. 24, p. 6649-6659.

[89] ALEGRIA, TGP.; MEIRELES, DA.; CUSSIOL, JRR.; HUGO, M.; TRUJILLO, M.; OLIVEIRA, MA.; MIYAMOTO, S.; QUEIROZ, RF.; VALADARES, NF.; GARRATT, RC.; RADI, R.; MASCIO, P.; AUGUSTO, O.; NETTO, LES. 2017. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyneutrite. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v. 114, n. 2, p. 132-141.

[90] RIBAS, VJ.; LOPEZ, JC.; RUIZ-SANMARTIN, A.; RELLO, J.; WOJDEL, A.; VELLIDO, A. 2011. Severe sepsis mortality prediction with relevance vector machines. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference, p. 100–103.

[91] ATICHARTPONGKUL, S.; FUANGTHONG, M.; VATTANAVIBOON, P.; MONGKOLSUK, S. 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, v. 192, p. 2093-2101.

[92] HAMPTON, MB.; KETTLE, AJ & WINTERBOURN, CC. 1998. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. Blood Journal, v. 92, n. 9, p. 3007-3017.

[93] SANTUS, R.; PATTERSON, LK.; FILIPE, P.; MORLIERE, P.; HUG, GL., FERNANDES, A.; MAZIERE, JC. 2001. Redox Reactions of the Urate Radical/Urate Couple

with the Superoxide Radical Anion, the Tryptophan Neutral Radical and Selected Flavonoids in Neutral Aqueous Solutions. *Free Radicals Research*, v. 38, p. 129-136.

[94] SILVA, RP.; CARVALHO, LAC.; PATRICIO, ES.; BONIFÁCIO, JPP.; CHAVES-FILHO, AB.; MIYAMOTO, S.; MEOTTI, FC. 2018. Identification of urate hydroperoxide in neutrophils: A novel pro-oxidant generated in inflammatory conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 126, p. 177-186.

[95] MORRIS, JC. 1966. The acid ionization constant of HClO from 5 to 35°. *Journal of Physical Chemistry*, v. 70, p. 3798-805.

[96] KONG, W.; CHEN, L.; ZHAO, J.; SHEN, T.; SURETTE, MG.; SHEN, L.; DUAN, K. 2013. Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Molecular Microbiology*, v. 88, n. 4, p. 784-797.

[97] ENGLISH, D. & ANDERSEN, BR. 1974. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of ficoll-hypaque. *Journal of Immunological Methods*, v. 5, p. 249-252.

[98] STROBER, W. 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, v. 21, p. A.3B.1-A.3B.2.

[99] KETTLE, AJ.; GEDYE, CA.; WINTERBOURN, CC. 1997. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochemical Journal*, v. 321, p. 503-508.

[100] QUEIROZ, RF.; JORDÃO, AK.; CUNHA, AC.; FERREIRA, VF.; BRIGAGÃO, MRPL.; MALVEZZI, A.; DO AMARAL, AT.; AUGUSTO, O. 2012. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, p. 1942-1953.

- [101] XIMENES, VF.; KANEGAE, MPP.; RISSATO, SR., GALHIANE, MS. 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 457, n. 1, p. 134-141.
- [102] TREVELIN, SC.; SANTOS, CX.; FERREIRA, RG.; LIMA, L.; SILVA, RL.; SCAVONE, C.; CURI, R.; ALVES-FILHO, JC.; CUNHA, TM.; ROXO-JÚNIOR, P.; CERVI, MC.; LAURINDO, FRM.; HOTHERSALL, JS.; COBB, AM.; ZHANG, M.; IVETIC, A.; SHAH, AM.; LOPES, L.R.; CUNHA, RQ. 2016. Apocynin and Nox2 regulate NF- κ B by modifying thioredoxin-1 redoxstate. *Scientific Reports*, v. 6, n. 34581, p. 1-12.
- [103] CLAUSEN, MR.; HUVAERE, K.; SKIBSTED, LH.; STAGSTED, J. 2010. Characterization of peroxides formed by riboflavin and light exposure of milk. Detection of urate hydroperoxide as a novel oxidation product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 1, p. 481-487.
- [104] WOLFF, SP. 1994. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 182-189.
- [105] HORTA, BB.; OLIVEIRA, MA.; DISCOLA, KF.; CUSSIOL, JRR.; NETTO, LES. 2010. Structural and Biochemical Characterization of Peroxiredoxin Q β from *Xylella fastidiosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 21, p. 16051–16065.
- [106] GRUBER, H.; RIENER, CK.; KADA, G. 2002. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 373, n. 1, p. 266-276.
- [107] PEIXOTO, AS.; GEYER, RR.; IQBAL, A.; TRUZZI, DR.; MORETTI, AIS.; LAURINDO, FRM.; AUGUSTO, O. 2018. Peroxynitrite preferentially oxidizes the dithiol redox motifs of protein-disulfide isomerase, v. 293, n. 4, p. 1450-1465.
- [108] PARSONAGE, D.; NELSON, KJ.; FERRER-SUETA, G.; ALLEY, S.; KARPLUS, PA.; FURDUI, CM.; POOLE, LB. 2015. Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC. *Biochemistry*, v. 54, p. 1567-1575.

- [109] TAIRUM, CA.; SANTOS, MC.; BREYER, CA.; GEYER, RR.; NIEVES, CJ.; PORTILLO-LEDESMA, S.; FERRER-SUETA, G.; TOLEDO, JCJr.; TOYAMA, MH.; AUGUSTO, O.; NETTO, LES.; OLIVEIRA, MA. 2016. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Scientific Reports*, v. 6, n. 33133, p. 1-12.
- [110] WINTERBOURN, CC. & PESKIN, AV. 2016. Kinetic Approaches to Measuring Peroxiredoxin Reactivity. *Molecules and Cells*, v.39, n.1, p. 26-30.
- [111] FILLOUX, A. & RAMOS, JL. 2014. *Pseudomonas: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, 800 p.
- [112] AOKI, N.; TATEDA, K.; KIKUCHI, Y.; KIMURA, S.; MIYAZAKI, C.; ISHII, Y.; TANABE, Y.; GEJYO, F.; YAMAGUCHI, K. 2009. Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 3, p. 534-542.
- [113] BEZERRA, FS.; VALENÇA, SS.; LANZETTI, M.; PIMENTA, WA.; CASTRO, P.; GONÇALVES, KVL.; PORTO, LC. 2006. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. *Nutrition*, v. 22, n. 11-12, p. 1192-1201.
- [114] GREEN, LC.; WAGNER, D.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, PL.; WISHNOK, JS.; TANNENBAUM, SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138.
- [115] SKERRETT, SJ.; WILSON, CB.; LIGGITT, HD.; HAJJAR, AM. 2007. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 292, p. L312-L322.
- [116] BRADFORD, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 7, n. 72, p. 248-254.

- [117] SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKURA, T. 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, v. 132, p. 345–352.
- [118] PULLI, B.; ALI, M.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; HSIEH, KLC.; WOJTKIEWICZ, G.; LINNOILA, JJ.; CHEN, JW. 2013. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *Plos One Pathogens*, v. 8, n. 7, p. 1-10.
- [119] DRAPER, H.; SQUIRES, EJ.; MAHMOODI, H.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 15, n. 4, p. 353-363.
- [120] BUSTIN, AS.; BENES, V.; GARSON, JA.; HELLEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, MW.; SHIPLEY, GL.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622.
- [121] LIU, Q.; WANG, B.; YIN, Y.; CHEN, G.; WANG, W.; GAO, X.; WANG, P.; ZHOU, H. 2015. Overexpressions of HO-1/HO-1G143H in C57/B6J mice affect melanoma B16F10 lung metastases rather than change the survival rate of mice-bearing tumours. *Experimental Biology and Medicine*, v. 238, p. 696-704.
- [122] SUN, C.; LI, S.; LI, D. 2016. Sulforaphane mitigates muscle fibrosis in mdx mice via Nrf2-mediated inhibition of TGF- β /Smad signaling. *Journal of Applied Physiology*, v. 120, p. 377-390.
- [123] BECKER, BF. 1993. Towards the Physiological Function of Uric Acid. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 14, p. 615-631.

- [124] DUKAN, S.; TOUATI, D. 1996. Hypochlorous Acid Stress in *Escherichia coli*: Resistance, DNA Damage, and Comparison with Hydrogen Peroxide Stress. *Journal of Bacteriology*, n. 21, v. 178, p. 6145-6150.
- [125] MACKENN, SM.; DAVIS, KJA. 1988. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, v. 254, n. 3, p. 685-692.
- [126] GRAY, MJ.; WHOLEY, WY.; JAKOB, U. 2013. Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annual Review of Microbiology*, v. 67, p. 141-160.
- [127] RAMPHAL, R.; BALLOY, V.; JYOT, J.; VERMA, A.; SI-TAHAR, M.; CHIGNARD, M. 2008. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *Journal of Immunology*, v. 181, n. 1, p. 586-592.
- [128] BAEK, WK.; LEE, HS.; OH, MH.; KOH, MJ.; KIM, KS.; CHOI, SH. 2009. Identification of the *Vibrio vulnificus ahpc1* gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence. *The Journal of Microbiology*, v. 47, n. 5, p. 624-632.
- [129] SCHULTZ, MJ.; RIJNEVELD, AW.; FLORQUINS, S.; SPEELMAN, P.; DEVENTER, SJHV.; POLL, TVD. 2001. Impairment of host defence by exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, p. 822-827.
- [130] PARKER, D.; AHN, D.; COHEN, T. & PRINCE, A. 2016. Innate immune signaling activated by MDR bacteria in the airway. *Physiological Reviews*, v. 96, p. 19-56.
- [131] BRADLEY, PP.; CHRISTENSEN, RD.; ROTHSTEIN G. 1982. Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Pyogenic Inflammation. *Blood Journal*, v. 60, p. 618-622.
- [132] NIKI, E. 2014. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 2014, p. 809-817.

[133] MARROCO, I.; ALTIERI, F.; PELUSO, I. 2017. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 1-32.

[134] CLASTER, S.; CHIU, DT.; QUINTANILHA, A.; LUBIN, B. 1984. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood Journal*, v. 64, n. 5, p. 1079-1084.

[135] WILKIE-GRANTHAM, RP.; MAGON, NJ.; HARWOOD, DT.; KETTLE, AJ.; VISSERS, MC.; WINTERBOURN, CC.; HAMPTON, MB. 2015. Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 15, p. 9896-9905.

[136] RADI, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 101, n. 12, p. 4003-4008.

[137] DAVIES, CA.; ROCKS, SA.; O'SHAUGHNESSY, MC.; PERRET, D.; WINYARD, PG. 2003. Analysis of Nitrite and Nitrate in the Study of Inflammation. *Methods in Molecular Biology*, v. 225, p. 305-320.

[138] AMURA, CR.; FONTAN, PA.; SANJUAN, N.; SORDELLI, DO. 1994. The effect of treatment with interleukin-1 and tumor necrosis factor on *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in a granulocytopenic mouse model. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 73, n. 2, p. 261-266.