

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de **03/03/2023**.

AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COMO
INIBIDORES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
PEROXIRREDOXINAS 2-CYS TÍPICAS (AhpC) EM
BACTÉRIAS

MELINA CARDOSO DOS SANTOS

SÃO VICENTE – SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COMO
INIBIDORES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
PEROXIRREDOXINAS 2-CYS TÍPICAS (AhpC) EM
BACTÉRIAS

MELINA CARDOSO DOS SANTOS
PROF. DR. MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE - SP
2021

S237a

Santos, Melina Cardoso dos

Avaliação de moléculas bioativas como inibidores do sistema antioxidante de peroxirredoxinas 2-Cys típicas (AhpC) em bactérias / Melina Cardoso dos Santos. -- São Vicente, 2021

317 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Marcos Antonio de Oliveira

1. Biologia molecular. 2. Antibióticos. 3. Peroxirredoxinas. 4. Inibição enzimática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



Dedico este trabalho aos meus pais, Neuza e Adilson.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora, por participarem da avaliação do meu trabalho, contribuindo para a qualidade da análise dos meus resultados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos n° 2017/06263-4 e 2017/19942-7) e ao Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) Redoxoma (Processo n° 2013/07937-8), pelo suporte financeiro para a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista (São Vicente), pela formação e pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

À Universidade Estadual Paulista – Campus do Litoral Paulista, por ceder a estrutura para a execução deste trabalho, e a todos os funcionários e professores.

Ao Prof. Dr. Marcos Toyama, por permitir utilizar as facilidades do Laboratório de Biologia Molecular de Proteínas e Peptídeos, e às doutorandas Mariana e Carol, pelo imenso auxílio nos experimentos de análises estruturais, e também pela amizade e parceria.

Ao Prof. Dr. Denis Abessa e a toda a sua equipe por me permitir utilizar a estrutura do Laboratório do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática, em especial à doutoranda Guacira pela amizade de longa data.

Ao Prof. Dr. João Lago e à doutoranda Deborah Sessa pelo fornecimento dos compostos naturais utilizados neste trabalho. Agradeço ainda ao Prof. Dr. João pelas muitas discussões e sugestões sempre pertinentes.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi e à Dra. Ana Cauz, por me acompanharem durante os experimentos com bactérias e por todas as discussões e sugestões muito proveitosas.

Ao Prof. Dr. Luís Netto, pelas inúmeras discussões, sugestões e contribuições para este trabalho, bem como por ter disponibilizado a estrutura de seu laboratório. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Oxidantes e Radicais Livres. Em especial, agradeço à Dra. Renata pela amizade e apoio toda vez que eu ficava perdida no laboratório. Ao Me. Alegria pela ajuda em diversos experimentos e ao Dr. Fernando pelo auxílio com os experimentos de *western blotting*. Ao Dr. Carlos Tairum, por todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica,

pelas incontáveis ajudas durante esses nove anos de parceria e por ser um grande profissional e amigo.

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, aos que ainda permanecem e aos que já seguiram outros caminhos. Agradeço pela ajuda com os experimentos, pela constante troca de ideias e pelo companheirismo. Em especial, agradeço às mestrandas Ana, Vitória e Gabriella, pela amizade, conversas, conselhos e tardes com bolo. Ao Dr. Leonardo e Dr. Breyer por toda colaboração, ajuda e paciência de sempre. À Luciana, pela competência e organização. Às minhas co-orientadas Beatriz, Heloisa e Camila, agradeço por me auxiliarem nos experimentos, me permitirem participar do trabalho de vocês, passando um pouco do que aprendi, e por terem me ensinado tantas outras coisas.

À Prof^a Dr^a Gisele Monteiro, por ser um exemplo de profissional e uma pessoa admirável.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, por me orientar desde o meu primeiro ano de graduação, sendo um grande exemplo de profissionalismo, competência e amor pela ciência. Você é uma grande inspiração para mim, Marcão, e tem toda a minha admiração e respeito. Muito obrigada por todo o apoio!

Aos meus pais, Neuza e Adilson, pelo apoio incondicional, por serem a minha base e o meu porto seguro, ao meu irmão Felipe e minha cunhada Cláudia, pelo companheirismo e por aturar minhas muitas visitas, e também à Penélope, Laila e Tina, por conseguirem me alegrar até nos dias mais difíceis.

Ao Daniel, por ter compartilhado grande parte dessa jornada comigo e ter estado ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Por fim, agradeço a todos que dedicam sua vida à ciência e enfrentam tantas adversidades na busca e difusão do conhecimento.

RESUMO

O aumento da resistência aos antibióticos por microrganismos tem crescido vertiginosamente e especialistas têm alertado quanto à rápida ineficácia dos medicamentos frente a linhagens de bactérias super-resistentes. A resistência de bactérias aos antibióticos pode estar diretamente relacionada ao estresse oxidativo, pois antibióticos distintos possuem a capacidade convergente de produzir espécies reativas de oxigênio, que causam danos às macromoléculas, em especial ao DNA, acentuando as taxas de mutação o que pode contribuir para o aparecimento de linhagens super-resistentes. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também são produzidas pelo sistema imunológico de hospedeiros para combater patógenos e estudos indicam que a inibição da expressão de enzimas antioxidantes de patógenos é capaz de gerar um aumento intracelular significativo dessas espécies, o que interfere de forma substancial na sua sobrevivência. Recentemente foi demonstrado que um composto natural denominado adenantina (Adn) é capaz de inibir a atividade peroxidásica de peroxirredoxinas (Prx) 2-Cys típicas de humanos (PrxI e PrxII), resultando na mortalidade de células tumorais, mas apresentando baixa toxicidade para células normais. As Prx 2-Cys são capazes de decompor hidroperóxidos utilizando um resíduo de cisteína (Cys_p) e sua alta reatividade sobre diferentes tipos de hidroperóxido é alcançada por interações com os resíduos de Thr/Ser e Arg, absolutamente conservados entre as Prx 2-Cys. Em conjunto, Cys_p, Thr/Ser e Arg, recebem o nome de tríade catalítica (TC). As Prx 2-Cys típicas também estão presentes em bactérias e são denominadas de AhpCs, sendo consideradas como uma das frentes de defesa oxidativas fundamentais para o patógeno. Em projeto anterior, avaliamos os efeitos da presença do resíduo de Thr ou Ser na TC de duas Prx-2 Cys típicas de levedura sobre a atividade inibitória de Adn. Demonstramos então que Adn possui maior afinidade por enzimas contendo Ser na TC e que a presença da Ser nesta posição existe essencialmente em procariotos, sobretudo em bactérias. No presente estudo, dando continuidade a este trabalho, verificamos que AhpCs contendo uma Ser na TC são mais resistentes à superoxidação e apresentariam ainda uma atividade de holdase em situações de estresse térmico mais acentuada do que AhpCs contendo uma Thr nessa posição. Uma vez que o estresse oxidativo e térmico são barreiras impostas à infecção por bactérias pelo organismo hospedeiro, a inibição desse sistema de defesa poderia constituir uma estratégia de importância no combate a esses patógenos. Nesse sentido, avaliamos a capacidade inibitória de Adn sobre AhpCs e verificamos que Adn apresenta maior afinidade por AhpC de *Escherichia coli* (EcAhpC), independente da presença de Thr ou Ser na TC (EcAhpC^{WT} e EcAhpC^{T44S}) do que para as isoformas de humanos, apresentando um valor de IC₅₀ ≈ 5 e 50 vezes inferior do que para PrxI e PrxII, respectivamente. Adicionalmente, observamos que Adn também inibiu a atividade de Trx de *E. coli* (EcTrx1) com maior eficiência que a Trx de humanos. Verificamos ainda que Adn mostrou-se tóxica para bactérias Gram-positivas, apresentando valores de IC₅₀ na faixa de 110-140 μM, e para Gram-negativa (*E. coli*) quando tratadas com polimixina B nonapeptídeo (PMBN). Uma vez que PMBN também apresenta atividade antibiótica, sua utilização em associação com Adn pode representar uma potencial nova terapia antimicrobiana. Adicionalmente, realizamos uma triagem de compostos naturais oriundos da biota florística do Estado de São Paulo e identificamos uma molécula capaz de inibir a atividade peroxidásica de EcAhpC com eficiência semelhante à Adn, além de inibir também EcTrx1 com menor eficiência. Este composto representa o primeiro inibidor de Prx da classe das lactonas sesquiterpênicas, além de ser também o primeiro inibidor proveniente da biodiversidade brasileira. Por fim caracterizamos uma nova tiól proteína de *X. fastidiosa* e demonstramos que ela é capaz de proteger as células bacterianas contra o cianeto e o estresse oxidativo gerado por H₂O₂. Coletivamente os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a descoberta de novas abordagens de combate a bactérias patogênicas.

PALAVRAS CHAVE: Peroxirredoxinas, antibióticos, inibidores, adenantina.

ABSTRACT

The increase in resistance to antibiotics by microorganisms has grown dramatically and experts have warned of the rapid ineffectiveness of drugs against super-resistant bacteria strains. The bacterial resistance to antibiotics can be directly related to oxidative stress, since different antibiotics have the convergent capacity to produce reactive oxygen species, which cause damage to macromolecules, especially to DNA, increasing mutation rates, which can contribute to appearance of super-resistant strains. Reactive oxygen and nitrogen species are also produced by the host immune system to combat pathogens and studies indicate that inhibition of the expression of pathogen antioxidant enzymes is able to generate a significant intracellular increase in these species, which significantly interferes in their survival. It has recently been demonstrated that a natural compound named adenanthin (Adn) is able to inhibit the peroxidase activity of typical 2-Cys peroxyredoxins (Prx) from humans (PrxI and PrxII), resulting in the mortality of tumor cells, but presenting low toxicity to normal cells. 2-Cys Prx are capable of decomposing hydroperoxides using a cysteine residue (Cys_p) and their high reactivity over different types of hydroperoxide is achieved by interactions with Thr/Ser and Arg residues, absolutely conserved between 2-Cys Prx. Together, Cys_p, Thr / Ser and Arg, are called catalytic triad (CT). Typical 2-Cys Prx are also present in bacteria and are named AhpC, being considered one of the fundamental oxidative defense fronts for the pathogen. In a previous project, we have evaluated the effects of the presence of the Thr or Ser residue on the TC of two yeast typical 2-Cys Prx on the inhibitory activity of Adn. We then demonstrated that Adn has higher affinity for enzymes containing Ser on TC and that the presence of Ser in this position exists essentially in prokaryotes, especially in bacteria. In the present study, continuing this work, we have found that AhpCs containing a Ser on TC are more resistant to overoxidation and would have higher holdase activity during thermal stress than AhpCs containing a Thr in that position. Since oxidative and thermal stress are barriers imposed to bacteria infection by the host organism, the inhibition of this defense system could be an important strategy in the fight against these pathogens. So, we have evaluated the inhibitory capacity of Adn over AhpCs and found that Adn has a higher affinity for AhpC of *Escherichia coli* (EcAhpC), regardless of the presence of Thr or Ser on TC (EcAhpC^{WT} and EcAhpC^{T44S}), than for human isoforms, presenting an IC₅₀ value \approx 5 and 50 times lower than for PrxI and PrxII, respectively. Additionally, we observed that Adn also inhibited *E. coli* Trx activity (EcTrx1) with higher efficiency than human Trx. We also found that Adn was toxic to Gram-positive bacteria, with IC₅₀ values in the range of 110-140 μ M, and to Gram-negative (*E. coli*) when treated with polymyxin B nonapeptide (PMBN). Since PMBN also has antibiotic activity, its use in association with Adn may represent a potential new antimicrobial therapy. Additionally, we carry out a screening of natural compounds from the floristic biota of the State of São Paulo and identified a molecule capable of inhibiting the peroxidase activity of EcAhpC with similar efficiency to Adn, besides inhibiting EcTrx1 with less efficiency. This compound represents the first Prx inhibitor in the sesquiterpene lactone class, in addition to being the first inhibitor derived from Brazilian biodiversity. Finally, we have characterized a new thiol protein from *Xylella fastidiosa* and demonstrated that it is able to protect bacterial cells against cyanide and oxidative stress generated by H₂O₂. Collectively, the results obtained in this work contribute to the discovery of new approaches to combat pathogenic bacteria

KEYWORDS: Peroxiredoxins, antibiotics, inhibitors, adenanthin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das reações de Fenton e de Harber-Weiss.	16
Figura 2: Substituição de Thr (presente em eucariotos) por Ser (presente em procariotos) na TC das Prx.	23
Figura 3: Ciclos de oxirredução envolvidos na redução de hidroperóxidos por Prx 2-Cys típicas de eucariotos e bactérias.....	25
Figura 4: Comparação entre estruturas de Trx e TrxR de bactéria e de humanos e AhpF de bactérias.	26
Figura 5: Resultados das purificações das AhpCs contendo Thr ou Ser como parte da TC.	37
Figura 6: Avaliação da inibição da atividade de AhpC contendo Thr na TC e mutantes Thr→Ser através do ensaio de oxidação de DTT.....	38
Figura 7: Avaliação da inibição da atividade de AhpC contendo Ser na TC e mutantes Ser→Thr através do ensaio de oxidação de DTT.....	39
Figura 8: Ensaio acoplado de oxidação de NADPH e resultado de expressão e purificação de EcTrx1 e EcTrxR.	42
Figura 9: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC ^{WT} e EcAhpC ^{T44S} por Adn.....	44
Figura 10: Ensaio de inibição do sistema redutor de Tsa1 por Adn.....	46
Figura 11: Avaliação de inibição de sistemas redutores de AhpC por Adn.	47
Figura 12: Ensaio de oxidação de NADPH com o sistema Trx de <i>S. cerevisiae</i> pré-tratado com Adn.	48
Figura 13: Superfícies moleculares de AhpC e de enzimas de sistemas redutores e quantificação de cisteínas livres em EcTrxR e ScTrxR.	50
Figura 14: Viabilidade celular de <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. typhimurium</i> após tratamento com Adn.....	52
Figura 15: Avaliação da toxicidade de EDTA combinado a ampicilina e Adn sobre <i>E. coli</i> :.....	54
Figura 16: Avaliação da toxicidade de Adn associada a PMBN sobre <i>E. coli</i>	56
Figura 17: Estruturas químicas de inibidores de Prx2 2-Cys típicas.....	57
Figura 18: Estrutura dos compostos naturais, isolados da biota florística de São Paulo, selecionados para o desenvolvimento do estudo.	58
Figura 19: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC ^{WT}	59
Figura 20: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC ^{T44S}	59

Figura 21: Avaliação da inibição da formação de dissulfeto intermolecular em EcAhpC.	60
Figura 22: Inibição da formação de dissulfeto intermolecular e atividade peroxidásica de EcAhpC ^{WT} e EcAhpC ^{T44S} por C-3.....	62
Figura 23: Avaliação de inibição da atividade de EcTrx1.....	63
Figura 24: Avaliação de inibição da atividade peroxidásica de EcTrxR.....	64
Figura 25: Avaliação de inibição da atividade oxidoreductase de EcAhpF.....	64
Figura 26: Viabilidade celular de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. epidermidis</i> após tratamento com C-3.....	66
Figura 27: Ensaio de oxidação NADPH para avaliação da superoxidação AhpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. epidermidis</i> utilizando o sistema Trx heterólogo <i>E. coli</i>	67
Figura 28: Estruturas químicas de inibidores de identificados para AhpC e de hidroperóxidos orgânicos.	68
Figura 29: Desenvolvimento térmico de PaAhpC, SeAhpC e mutantes monitorado por fluorimetria de varredura diferencial.....	69
Figura 30: Proteção comparativa de PaAhpC e SeAhpC contra a agregação da citrato sintase (CS) induzida por estresse térmico.	70
Figura 31: Envolvimento de resíduos de cisteína na atividade de sulfotransferase de GLP.....	72
Figura 32: A expressão heteróloga de GLP confere alta resistência ao cianeto em <i>E. coli</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem dos genes	30
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para as mutações Thr/Ser nos genes <i>ahpC</i>	31
Tabela 3: Velocidade inicial (v_0) de enzimas AhpCs contendo Thr ou Ser como parte da TC de diferentes espécies de bactérias tratadas (Adn+) ou não (Adn-) com o inibidor Adn	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Adn	Adenantina
AhpC	Alquil hidroperóxido redutase subunidade C
AhpF	Alquil hidroperóxido redutase subunidade F
C-3	Composto 3
Cat	Catalase
CHP	Hidroperóxido de cumeno
Cys _P	Cisteína peroxidásica
Cys _R	Cisteína de resolução
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FF	<i>Fully folded</i> (totalmente enovelado)
IAA	2-iodoacetamida
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósideo
LU	<i>Locally unfolded</i> (parcialmente desenovelado)
MDR	Resistente a múltiplas drogas
ME	Membrana externa
MIC	Concentração inibitória mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2-fosfato reduzido
NTD	Domínio N-terminal
PMBN	Polimixina B nonapeptídeo
Prx	Peroxirredoxina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
Sod	Superóxido dismutase
TC	Tríade catalítica
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
Tsa 1/2	<i>Thiol-specific antioxidant 1/2</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos	14
1.2 A letalidade de antibióticos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	16
1.3 Defesas oxidativas do organismo hospedeiro na infecção por patógenos	17
1.4 Peroxirredoxinas e sua importância em bactérias patogênicas	18
1.5 Inibição de Prx2-Cys típicas por Adenantina (Adn).....	22
1.6 Diferenças entre Prx 2-Cys de eucariotos e procariotos	23
1.7 Presença de Ser na TC é mais comum em Prx 2-Cys típicas bacterianas	24
1.8 Efeitos da Adn sobre o sistema redutor das Prx 2-Cys típicas	25
2. OBJETIVOS	28
3. JUSTIFICATIVA	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Reagentes	29
4.2 Meios de cultura para bactérias.....	29
4.3 Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas recombinantes	29
4.4 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo.....	29
4.5 Mutações sítio dirigidas	31
4.6 Expressão e purificação em bactérias de proteínas selvagens e mutantes	31
4.7 Quantificação de proteínas.....	32
4.8 Tratamento das proteínas com os compostos	32
4.9 Verificação da ligação dos compostos ao sítio ativo das AhpC por SDS-PAGE.	33
4.10 Ensaio de oxidação de DTT	33
4.11 Análise da inibição dos compostos sobre a atividade de AhpC e sistema Trx ...	33
4.12 Análise da inibição dos compostos sobre a atividade de AhpF.....	34
4.13 Quantificação das Cys livres de EcTrxR e ScTrxR	34
4.14 Avaliação do meio de cultura	34
4.15 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	35
4.16 Permeabilização da membrana externa (ME) de <i>E. coli</i>	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Inibição de AhpC contendo Thr ou Ser na TC por Adn	36
5.1.1 Obtenção de AhpC selvagens e contendo a mutação Thr \rightleftharpoons Ser	36
5.1.2 Avaliação da inibição de AhpC por Adn através de ensaio de oxidação de DTT	38

5.1.3 Avaliação de inibição de AhpC por Adn pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH	41
5.1.4 Determinação do IC ₅₀ aparente pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH	43
5.1.5 Avaliação de inibição de Adn sobre proteínas do sistema redutor de EcAhpC (EcTrx1, EcTrxR e EcAhpF)	46
5.1.6 Avaliação da toxicidade de Adn sobre células bacterianas.....	51
5.1.7 A influência da membrana externa de bactérias Gram-negativas sobre a toxicidade de Adn.....	52
5.2 Avaliação de compostos naturais oriundos da biota florística de São Paulo sobre AhpC e seu sistema redutor	56
5.2.1 Avaliação da atividade inibitória dos compostos naturais sobre AhpC de E. coli por meio do ensaio de oxidação de NADPH.....	56
5.2.2 Determinação do IC ₅₀ aparente de C-3 para EcAhpC ^{WT} e EcAhpC ^{T44S}	61
5.2.3 Avaliação da atividade inibitória dos compostos naturais sobre sistemas redutores de AhpC.....	63
5.2.4 Avaliação da toxicidade de C-3 sobre células bacterianas.....	65
5.3 A importância da presença de Thr ou Ser na TC das AhpC na suscetibilidade à superoxidação	66
5.4 Caracterização de uma nova enzima antioxidante presente somente em bactérias envolvidas na resistência ao estresse por cianeto e oxidativo	71
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7. PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos

Os antibióticos revolucionaram a medicina humana e veterinária e são considerados um dos maiores avanços da medicina do século XX. O período que compreende os anos 1950 e 1970 foi o auge das descobertas de novas classes de antibióticos (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008). Entretanto, após este período, o número de novos antibióticos se tornou muito escasso e a principal abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos para combater a resistência emergente e re-emergente de patógenos a antibióticos tem sido, em sua grande maioria, baseada na modificação dos antibióticos existentes, inclusive por razões econômicas (Chopra *et al.*, 2002; Docquier & Mangani, 2018; Fernandes *et al.*, 2017; Mendes, *et al.* 2014). Este decréscimo no desenvolvimento de novos fármacos ocorre devido a obstáculos econômicos e regulatórios bem como fusões empresariais que reduziram substancialmente o número de pesquisas. Das 18 maiores empresas farmacêuticas, 15 abandonaram a produção de antibióticos (Bartlett *et al.*, 2013; Piddock, 2012).

Por outro lado, as taxas de mortalidade relacionadas às infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas (Multi Drug Resistance - MDR) têm se tornado cada vez mais elevadas, o que constitui um grave problema de saúde em todo o mundo e a Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta para os impactos desastrosos do aumento da resistência a antimicrobianos em um futuro próximo. A resistência de microorganismos a antibióticos de segunda e terceira geração, os quais constituem as últimas linhas de defesa contra infecções comuns, deve dobrar entre os anos de 2005 e 2030 e as mortes provocadas anualmente em todo o mundo por essas doenças passariam das centenas de milhares para dezenas de milhões até 2050 (WHO/IACG, 2019). Na União Europeia (UE), mais de 33 mil pacientes morrem por ano em decorrência de infecções ocasionadas por 16 bactérias MDR (Cassini *et al.*, 2019). Nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 63.000 pacientes morrem anualmente como consequência de infecções hospitalares ocasionadas por bactérias MDR (Ventola *et al.*, 2015). Os custos econômicos estimados na UE revelam que os gastos para o sistema de saúde em conjunto com a perda de produtividade dos pacientes geraram um prejuízo aproximado de 1.5 bilhão de euros por ano (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009; Dadgostar *et al.*, 2019). Em período similar, o custo anual do tratamento de infecções hospitalares nos EUA de apenas seis espécies de bactérias MDR foi estimado em aproximadamente

1.9 bilhão de dólares (Ventola *et al.*, 2015). Em 2013, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) dos EUA declarou que estamos na "era pós-antibiótica" e esta declaração está alinhada com a OMS que, em 2014, alertou que a crise de resistência aos antibióticos está se tornando alarmante uma vez que o percentual de bactérias MDR aumenta ano a ano (Michael *et al.*, 2014; Reardon, 2015). No Brasil, infelizmente, esses dados não são claros, mas a preocupação com os danos provocados pela crescente resistência de organismos antimicrobianos levou à elaboração do "Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única", com vigência de 2018 a 2022 (PAN-BR) (Ministério da Saúde, 2018). Nesse sentido, novas abordagens voltadas para o tratamento dessas das infecciosas causadas por esses agentes seriam de grande importância tanto clínica quanto financeira.

Entre os patógenos Gram-positivos, a maior ameaça para uma pandemia global é representada por bactérias como *Staphylococcus aureus* e o gênero *Enterococcus* (CDC, 2013; Rossolini, 2014). De fato, ainda na década de 1960 já foram descritos isolados de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, denominados de MRSA (para Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Nessa época, para o tratamento das infecções causadas por este agente etiológico, foi utilizada a vancomicina. Entretanto, duas décadas mais tarde, foram identificadas linhagens resistentes à vancomicina e atualmente as MRSA representam uma grande ameaça à saúde pública mundial (Ventola *et al.*, 2015). De fato, somente nos EUA, a MRSA é responsável por mais mortes todos os anos do que AIDS, doença de Parkinson, enfisema e homicídio juntos (CDC, 2013). Apesar da resistência aos antibióticos anti-MRSA geralmente ocorrer através de mutações, existem estudos que demonstram a transferência de genes de resistência aos antibióticos linezolida (oxazolidinonas) e glicopeptídeos, aspecto de grande gravidade (Chen *et al.*, 2020; Rossolini *et al.*, 2014). Bactérias Gram-negativas também trazem preocupação porque estão se tornando resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis (Eichenberger e Thaden, 2019; Golkar *et al.*, 2014; Rossolini *et al.*, 2014). O surgimento de bacilos Gram-negativos MDR tem tido grande impacto na medicina, e as infecções mais graves ocorrem em ambientes hospitalares sendo as mais comuns causadas por Enterobacteriaceae (principalmente *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* (CDC, 2013; Feretzakis *et al.*, 2019; Rossolini *et al.*, 2014). Bactérias patogênicas Gram-negativas MDR como *Escherichia*

coli e *Neisseria gonorrhoeae* também estão se tornando cada vez mais prevalentes em ambientes hospitalares, e já foi demonstrado que diversas linhagens produzem β -lactamases capazes de inibir a ação de antibióticos β -lactâmicos (Dryden, 2018; Ventola, 2015).

1.2 A letalidade de antibióticos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Diversos estudos indicam que diferentes classes de antibióticos, independentemente das suas interações fármaco-alvo, geram níveis variáveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribuem significativamente para a morte celular dos patógenos (Bizzini *et al.*, 2009; Breidenstein *et al.*, 2008; Brynildsen *et al.*, 2013; Calhoun *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2009; Dryden, 2018; Foti *et al.*, 2012; Girgis *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2012; Gusarov *et al.*, 2009; Jee *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2012; Kohanski *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2011; Shatalin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Yeom *et al.*, 2010). Apesar de existir ainda grande debate sobre a relação de antibióticos, geração de EROs e letalidade em patógenos, trabalhos recentes utilizando as mais distintas abordagens reforçam as conclusões obtidas pelos diferentes grupos de pesquisa (van Acker *et al.*, 2016; Dwyer *et al.*, 2014; Ibacache-Quiroga *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020). Neste contexto, foi demonstrado que as três principais classes de drogas bactericidas utilizam um mecanismo comum que estimula a produção de radicais hidroxila (HO^\bullet) por meio de reações químicas de Fenton (Figura 1A). De fato, a administração de quelantes de ferro (Fe) atenua a morte por fármacos bactericidas, sugerindo que os radicais hidroxila contribuem para a morte das bactérias tratadas com antibióticos. Neste contexto é importante salientar que a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da dismutação efetuada pela enzima superóxido dismutase (Sod) também pode favorecer a formação de HO^\bullet . Além disso, o H_2O_2 juntamente com o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) também é capaz de produzir HO^\bullet por meio da reação de Harber-Weiss (Figura 1) (Halliwell & Gutteridge, 2010).

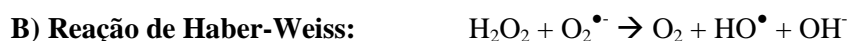
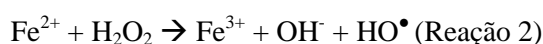
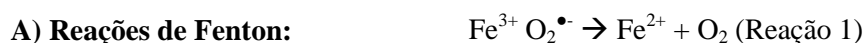


Figura 1: Representação das reações de Fenton e de Harber-Weiss. (A) A Reações de Fenton ocorre entre uma molécula de Fe^{3+} e molécula de radical ânion superóxido e resulta na formação de Fe^{2+} que, ao

reagir com peróxido de hidrogênio, produz o radical hidroxila. **(B)** Representação da reação de Haber Weiss, originando radical hidroxila a partir da reação entre o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido.

Ponto de importância reside no fato que, apesar dos diferentes fármacos bactericidas (β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) terem diferentes alvos biológicos (proteínas de ligação à penicilina, ribossomo e topoisomerase, respectivamente), todos eles convergem em uma via comum. Essa via é baseada na produção de oxidantes através de resposta metabólica envolvendo o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (tricarboxylic acid cycle – TCA) que induz a rápida depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), resultando em uma hiperativação da cadeia de transporte de elétrons, o que aumenta a produção de produtos secundários como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kohanski *et al.*, 2010). O $O_2^{\cdot-}$ pode atacar grupamentos ferro-enxofre (Fe-S) presentes em diversas proteínas podendo levar à disponibilização de Fe ferroso (Fe^{2+}) que participa da reação de Fenton, resultando em formação de HO^{\cdot} , o que auxilia na morte celular (Kohanski *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que o H_2O_2 também é capaz de danificar grupos Fe-S levando à disponibilização de Fe^{2+} (Imlay, 2008; Jang *et al.*, 2010), o que deve maximizar este processo e levar a mais danos celulares. É importante salientar que, apesar de baixas doses de antibióticos estarem associadas ao aparecimento de bactérias resistentes em função das mutações provocadas no DNA, altas concentrações ou concentrações apropriadas de antibióticos levam a sérios danos em biomoléculas, o que impossibilita ou decresce fortemente as taxas de sobrevivência do patógeno (Dryden, 2018; Giguère *et al.*, 2007).

1.3 Defesas oxidativas do organismo hospedeiro na infecção por patógenos

Quando um patógeno invade um hospedeiro, um dos mecanismos de defesa mais estudados é denominado de explosão respiratória (respiratory burst), o qual se caracteriza pela geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). A geração de EROs é devida à ativação de uma multicomponente oxidase (NADPH oxidase, também denominado de fagócito oxidase), que oxida o NADPH e, no processo, reduz o oxigênio a $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell & Gutteridge, 2015). Em neutrófilos, essa reação oxidativa é disparada pelos sinais de ativação e acompanha a fagocitose (Babior, 2004). Quando o radical $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação, produz

H₂O₂, o qual é altamente difusível no organismo e capaz de desencadear mecanismos potencialmente tóxicos para as células (Gordon, 2016; Halliwell e Gutteridge, 2015; Underhill e Ozinsky, 2002). O H₂O₂, por si só, não é capaz de destruir eficientemente o patógeno, entretanto, ao ser convertido em HO[•], pode atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015). Outra forma de eliminar os organismos invasores é através da produção do radical óxido nítrico (NO[•]). O NO[•] é gerado quando ocorre a oxidação da arginina na presença da molécula de oxigênio, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Fritzsche *et al.*, 2010; Prolo *et al.*, 2013). O NO[•], por sua vez, pode levar à formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um potente agente oxidante cujos derivados são capazes de causar danos ao DNA e oxidação lipídica (Calcerrada *et al.*, 2011; Niles *et al.*, 2006; Radi, 2018).

Se por um lado os organismos hospedeiros produzem EROs e ERNs como defesa oxidativa, os organismos patogênicos dispõem de enzimas antioxidantes capazes defendê-los dos efeitos tóxicos dessas espécies reativas e ajudá-los a superar a barreira oxidante imposta pelo hospedeiro, possibilitando assim a infecção, manutenção e crescimento. As enzimas antioxidantes utilizadas pelos patógenos para metabolizar as EROs e ERNs em produtos menos tóxicos ou atóxicos são representadas principalmente por enzimas como as superóxido dismutases (Sod), as catalases (Cat) e as peroxirredoxinas (Prx). Portanto, uma alternativa lógica seria a utilização de inibidores de enzimas antioxidantes em terapias antimicrobianas (Birben *et al.*, 2012). No entanto, os hospedeiros, incluindo os humanos, possuem enzimas extremamente semelhantes às dos patógenos, principalmente quando se trata da Sod e Cat e os inibidores acabam por ser tóxicos também para as células dos hospedeiros (Benov e Fridovich, 1994; Brennan *et al.*, 2015; Discola *et al.*, 2005; Heikkila *et al.*, 1977; Lu *et al.*, 1998; Mishra e Imlay 2012; Roberts e Hirst, 1996; Sugadev *et al.*, 2011). Neste contexto, um importante alvo seria a família das Prx, em razão de sua diversidade.

1.4 Peroxirredoxinas e sua importância em bactérias patogênicas

As Prx constituem a última grande família de peroxidases a ser descoberta. Diferentemente da Sod e Cat, estas enzimas não possuem grupos prostéticos e utilizam um resíduo de cisteína (cisteína peroxidásica - Cys_p) altamente reativa para decompor hidroperóxidos (Jacobson *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1988; Netto *et al.*, 1996). Quando se

analisa as estruturas quaternárias destas enzimas, observa-se que a Cys_P se encontra em grande proximidade com uma Thr (ou Ser, em alguns casos) e com uma arginina (Arg), a qual é totalmente conservada em todas as Prx já descritas até o momento. Estes três resíduos de aminoácidos (Cys_P, Thr/Ser e Arg) formam a tríade catalítica (TC) e todos apresentam importância na catálise, visto que a desprotonação e a manutenção de Cys_P na forma de tiolato (S⁻) é dependente da integridade da TC (Tairum *et al.*, 2016).

Apesar de todas as Prx possuírem Cys_P, elas constituem uma família de enzimas bastante heterogênea e diversas classificações já foram propostas, sendo que a mais utilizada subdivide essas proteínas em três grandes grupos (Prx 1-Cys, Prx 2-Cys típicas e Prx 2-Cys atípicas) de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína envolvidos no processo de redução do hidroperóxido (Wood *et al.*, 2003). As Prx 1-Cys são proteínas homodiméricas que apresentam apenas um resíduo de cisteína (Cys_P) envolvido no ciclo catalítico localizado na região N-terminal. Já as Prx 2-Cys utilizam dois resíduos de cisteína, um na região N-terminal (Cys_P) e outro na C-terminal, denominado de cisteína de resolução (Cys_R), que durante o ciclo catalítico formam um dissulfeto Cys_P - Cys_R. As Prx 2-Cys típicas apresentam-se em homodímeros e a formação do dissulfeto Cys_P - Cys_R é intermolecular, ao passo que as Prx 2-Cys atípicas apresentam-se como monômeros ou homodímeros e formam um dissulfeto Cys_P - Cys_R intramolecular (Wood *et al.*, 2003). Após sua oxidação, as Prx são geralmente reduzidas pelo sistema Trx, composto pelas enzimas tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza elétrons provenientes do NADPH *via* uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo). A redução pelo sistema Trx restaura a atividade peroxidásica das Prx, tornando-as aptas à decomposição de uma nova molécula de hidroperóxido. Entretanto, apesar das Prx 2-Cys de eucariotos serem reduzidas principalmente pelo sistema Trx, as Prx 2-Cys típicas de procariotos, denominadas AhpC (para alquil hidroperóxido redutase C), também possuem um sistema redutor adicional composto por enzimas denominadas AhpF (alquil hidroperóxido redutase F) que utilizam NADH como redutor (Jaeger *et al.*, 2006; Jönsson *et al.*, 2007).

Outra característica apresentada pelas Prx 2-Cys típicas é o processo de superoxidação de Cys_P que, após atacar a molécula e hidroperóxido e assumir sua forma de ácido sulfênico (Cys_P-SOH), pode reagir com mais uma ou duas moléculas de hidroperóxido, gerando como intermediários a cisteína ácido sulfínico (Cys_P-SO₂H) ou sulfônico (Cys_P-SO₃H) (Poole *et al.*, 2011). Nessas condições, Cys_P é incapaz de formar

o dissulfeto com Cys_R e, conseqüentemente, de ser reduzida por seus redutores endógenos e, portanto, a proteína perde sua atividade peroxidásica. A forma Cys_P-SO₂H pode ser reduzida eficientemente pela sulfirredoxina (Srx), uma proteína de baixo peso molecular dependente de ATP, Mg²⁺ e um Cys tiól que é capaz de restaurar a capacidade peroxidásica das Prx. Já para a forma Cys_P-SO₃H, até o momento, não foram encontrados redutores (Biteau *et al.*, 2003). Existe um consenso de que a superoxidação das Prx 2-Cys típica é facilitada pelo atraso na formação do dissulfeto entre Cys_P e Cys_R, o que deixaria Cys_P-SOH disponível por mais tempo para interagir com outras moléculas de hidroperóxido (Poole *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2003). Esse atraso tem sido atribuído à presença do motivo Gly-Gly-Leu-Gly e de um prolongamento na região C-terminal (contendo o motivo Tyr-Phe) o qual está localizado próximo ao sítio ativo em Prx 2-Cys típicas eucarióticas. Em seu estado reduzido, Cys_P encontra-se na extremidade do chamado Cys_P-loop a uma distância de aproximadamente 14Å de Cys_R, na conformação denominada FF (*fully folded* - totalmente enovelada). Para que ocorra a formação do dissulfeto com Cys_R, é necessário haver um desenovelamento parcial dessa região que culmina com a aproximação das duas cisteínas e, conseqüentemente, com a formação do dissulfeto, em uma conformação denominada LU (*locally unfolded* - parcialmente desenovelada). Entretanto, durante a transição FF-LU, a cauda C-terminal precisa sofrer um deslocamento e esse processo pode atrasar a formação do dissulfeto e favorecer a superoxidação. Tanto o motivo Gly-Gly-Leu-Gly quanto o prolongamento C-terminal não existem nas AhpC, o que as torna mais resistentes ao processo de superoxidação, sendo denominadas de proteínas "robustas", enquanto as proteínas eucarióticas são chamadas de "sensíveis" (Poole *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2003). Recentemente, foi proposto que aminoácidos presentes no Cys_P-loop também teriam participação no desencadeamento de eventos de superoxidação através de interações com a cauda C-terminal (Kamariah *et al.*, 2018), mas estudos mais aprofundados são necessários para se compreender como de fato essas interações acontecem.

No que concerne à atividade das peroxidases, enquanto a Cat é capaz de decompor somente H₂O₂, embora com alta eficiência, as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor uma grande variedade de hidroperóxidos, dentre eles hidroperóxidos de lipídeos (Lp-OOH) e peroxinitrito (NOO-), com constantes de segunda ordem de 10⁷⁻⁸ M⁻¹s⁻¹ (Condeles *et al.*, 2020, Ogusucu *et al.*, 2007; Parsonage *et al.*, 2005; Tairum *et*

al., 2016). Também foi demonstrado que as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor até mesmo peróxidos de proteínas e aminoácidos com eficiência moderada ($10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), o que revela sua grande versatilidade na decomposição de hidroperóxidos (Carvalho *et al.*, 2017; Peskin *et al.*, 2010). Adicionalmente, estas proteínas estão entre as mais abundantes em bactérias. Como exemplo, em *E. coli* as Prx estão entre as dez proteínas mais expressas (Link *et al.*, 1997).

Em bactérias patogênicas, a importância das Prx foi demonstrada em linhagens de *Helicobacter pylori* e *Helicobacter hepaticus*, agentes causadores de úlceras/gastrites estomacais e de hepatite crônica em mamíferos, respectivamente, os quais apresentam níveis elevados de hidroperóxidos de lipídeos quando o gene *ahpC* é deletado (Mehta *et al.*, 2007). Resultados similares foram descritos para *Campylobacter jejuni*, o agente etiológico de gastroenterites (Oh e Jeon, 2014). Em *Salmonella typhimurium*, patógeno responsável por moléstias gastrointestinais, febre tifóide e septicemia, foi demonstrado que linhagens deficientes de Prx apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida. O estudo também revelou que quando uma AhpC é superexpressa em células de *S. typhimurium* nocauteadas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos ($\Delta katE$, $\Delta katG$, $\Delta katN$, $\Delta ahpC$ e $\Delta tsaA$), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem (Hébrard *et al.*, 2009). Esses dados indicam que as Prx de *S. typhimurium* contribuem para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver às defesas do hospedeiro. Em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, a expressão de AhpC em isolados clínicos com a deleção de uma das isoformas de Cat ($\Delta katG$) é aumentada tanto no meio intracelular quanto no extracelular o que aparentemente é de importância para a manutenção da virulência de *M. tuberculosis* (Nieto *et al.*, 2016). No caso de *S. aureus*, o agente etiológico de diversas infecções hospitalares, AhpC juntamente com Cat possuem papéis compensatórios e são fundamentais na sobrevivência e colonização do trato respiratório (Cosgrove *et al.*, 2007). Estudos envolvendo metatranscriptoma de *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* revelaram que *ahpC* é altamente expresso no trato respiratório, sendo que sua expressão é ao menos três vezes maior nesse ambiente quando comparado com os microrganismos crescidos em meio de cultura ($\sim 1320 \text{ reads per million} \times \sim 540 \text{ rpm}$) (Chaves-moreno *et al.*, 2016). Com base nesses dados, podemos inferir que a inibição da atividade peroxidásica das Prx de patógenos consiste em uma abordagem promissora para o tratamento das doenças causadas por eles, pois

levaria a um aumento nos níveis intracelulares de hidroperóxidos nesses organismos o que pode contribuir com a diminuição das suas taxas de sobrevivência.

1.5 Inibição de Prx2-Cys típicas por Adenantina (Adn)

Os compostos extraídos de plantas despertam um interesse especial da indústria farmacêutica em função de seu potencial para o desenvolvimento de novas drogas. Entre esses compostos naturais encontram-se os diterpenóides, uma ampla classe de metabólitos secundários com significativa atividade biológica que vem sendo investigada quanto à sua eficácia no tratamento de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (Tirapelli *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a adenantina (Adn), um diterpenóide extraído das folhas de *Isodon adenantha*, possui propriedades antitumorais. Liu e colaboradores (2012) observaram que a Adn possui a capacidade de induzir a diferenciação de células de leucemia mieloide aguda (LMA) (Liu *et al.*, 2012) através da inibição da atividade peroxidásica das isoformas citosólicas Prx1 e Prx2, as quais são evolutivamente relacionadas e compartilham homologia na sequência de aminoácidos (78% de identidade e 91% de similaridade) (Lee, *et al.*, 2007). Também foi proposto um modelo de ligação em que a Adn interagiria com outros aminoácidos na região do sítio ativo, incluindo os resíduos da TC por meio de uma interação hidrofóbica com a Thr⁴⁹ e uma interação polar com a Arg¹²⁸, sendo também estabilizada também por interações de caráter hidrofóbico com outros aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima (Leu⁴⁶, Phe⁵⁰, Val⁵¹, Ile¹²⁵, Pro¹⁴⁸ e Cys_P). Conseqüentemente, a inibição da atividade peroxidásica dessas proteínas permitiria um acúmulo de H₂O₂ intracelular em níveis suficientes para a ativação das quinases reguladoras de sinal extracelular ERK1 e ERK2, levando ao aumento da expressão de proteínas β estimuladoras de ligação CCAAT (C/EBPβ), as quais conduziriam a diferenciação celular e conseqüente repressão do tumor (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Adicionalmente, Hou e colaboradores observaram que a inibição de Prx1 e Prx2 por Adn foi capaz de induzir a morte de células de hepatocarcinoma (CHC) com mais eficiência do que a de células normais imortalizadas, além de inibir significativamente o crescimento de tumores xenográficos sem efeitos tóxicos significativos (Hou *et al.*, 2014). Mais recentemente, também foi demonstrado que Adn é capaz de atuar sobre células tumorais pulmonares, causando apoptose e/ou promovendo a diferenciação de células leucêmicas (Mo *et al.*, 2019), além de promover

efetivamente a morte de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda precursora de células B (Fidyt *et al.*, 2019). Entretanto, apesar da Adn possuir importância por inibir as Prx humanas, pouco se sabe a respeito de sua atividade sobre enzimas de outros organismos.

1.6 Diferenças entre Prx 2-Cys de eucariotos e procariotos

Conforme mencionado anteriormente, uma diferença marcante entre as Prx 2-Cys típicas de procariotos e eucariotos reside na existência de um prolongamento C-terminal que insere uma α hélice nas enzimas de eucariotos e está relacionada com sua sensibilidade a superoxidação (Wood *et al.*, 2003). Outra diferença existente entre as 2-Cys típicas de eucariotos e procariotos reside na ocorrência de Thr ou Ser na TC (Figura 2A e 2B). De fato, nas Prx 2-Cys típicas identificadas em mamíferos e, de forma geral, nos eucariotos (com exceção poucos organismos, o que será abordado posteriormente) possuem uma Thr como parte da TC ao passo que algumas bactérias possuem uma Ser.

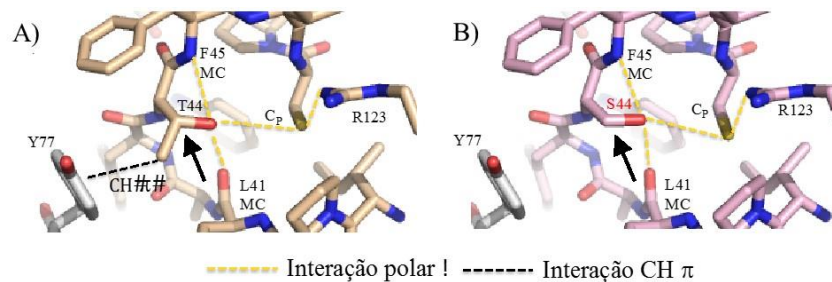


Figura 2: Substituição de Thr (presente em eucariotos) por Ser (presente em procariotos) na TC das Prx. (A) Estrutura cristalográfica de Tsa1 (1SBC) e (B) modelo teórico de Tsa1^{T44S} mostrando a rede de interações polares entre aminoácidos da TC (Cys_P, Thr/Ser e Arg). As estruturas estão representadas em sticks e coloridas em CPK (N=azul, O= vermelho e S=laranja claro). Os carbonos em Tsa1 estão representados em bege e cinza claro e de Tsa1^{T44S} em rosa e cinza claro.

Nosso grupo de pesquisa explorou estas diferenças em um trabalho anterior utilizando a Prx Tsa1 de *S. cerevisiae* como modelo biológico para a compreensão da interação de Adn com as Prx 2-Cys típicas. Com o objetivo de mimetizar as Prx 2-Cys típicas de procariotos, realizamos o truncamento do prolongamento C-terminal (do aminoácido 176 ao 196) e geramos o mutante Tsa1^{175 Δ CT}. Entretanto, essa proteína mutante não apresentou diferenças na interação com Adn em relação à proteína selvagem. Adicionalmente, assim como as proteínas encontradas em mamíferos, Tsa1 possui uma Thr como parte da TC. Para avaliar os efeitos da substituição de Thr por Ser, utilizamos a proteína mutante Tsa1^{T44S}. Nossos resultados revelaram que o resíduo de Thr/Ser está relacionado à manutenção da estrutura decamérica de Tsa1, uma vez que

a Tsa1 selvagem transita entre decâmeros (pentâmeros de dímeros do tipo $[\alpha_2]_5$) quando reduzida, e dímeros, oligômeros de massa molecular intermediária e decâmeros quando oxidada, enquanto que o mutante Tsa1^{T44S} se apresenta como um decâmero constitutivo independente do estado redox (Tairum *et al.*, 2016). *S. cerevisiae* também possui uma segunda Prx 2-Cys típica denominada de Tsa2, a qual guarda grande similaridade em relação à estrutura primária com Tsa1 (86% de identidade e 96% de similaridade). No entanto, curiosamente, esta enzima difere de Tsa1, e também das enzimas de mamíferos, por possuir naturalmente uma Ser como parte da TC.

Ensaio de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), cromatografia de exclusão molecular (SEC) e oxidação de NADPH, realizados por nosso grupo de pesquisa, revelaram que Adn é capaz de ligar-se ao sítio ativo de Tsa1 e Tsa2, provocando alterações nas estruturas secundária e quaternária, além de inibir parcialmente a atividade peroxidásica dessas proteínas. Entretanto, as análises revelaram que Adn promoveu maiores alterações na estrutura e atividade peroxidásica da mutante Tsa1^{T44S} e de Tsa2^{WT} do que de Tsa1^{WT}, indicando que a presença da Ser na TC poderia promover uma maior afinidade de Adn ao sítio ativo dessas proteínas (Apêndice B).

1.7 Presença de Ser na TC é mais comum em Prx 2-Cys típicas bacterianas

Segundo dados da base GenBank do NCBI, quase a totalidade dos organismos eucariotos sequenciados até o momento possuem Prx 2-Cys com uma Thr na TC. Por outro lado, a TC contendo uma Ser é um evento mais comum em Prx de procaríotos, especialmente em bactérias (dados apresentados no Apêndice E). Dentre os organismos que possuem Ser na TC das Prx, existe uma série de bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* como *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus castoreus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus gallolyticus*, *Staphylococcus equi* e *Staphylococcus pyogenes* que são agentes etiológicos de várias doenças humanas como endocardite, septicemia, periodontite, infecções agudas do trato urinário, infecções de pele, dentre outros. Também foi identificada esta mutação nos patógenos *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Algumas das doenças causadas por estes agentes constituem um sério problema de saúde pública uma vez ocorrem geralmente em ambiente hospitalar, podendo acometer pacientes imunocomprometidos e, em alguns casos, diversos

antibióticos não são capazes de eliminar estas bactérias pois são MDR (Egan *et al.*, 2109; Oteo *et al.*, 2015; Purrello *et al.*, 2016). Neste contexto, a presença da Ser na TC das Prx 2-Cys de determinadas espécies de bactérias colocam a Adn como uma representante promissora de um novo fármaco antimicrobiano. Adicionalmente elaboramos uma revisão sobre peroxirredoxinas de microrganismos patogênicos que foi submetido ao periódico Applied Microbiology and Biotechnology (Apêndice D).

1.8 Efeitos da Adn sobre o sistema redutor das Prx 2-Cys típicas

Soethoudt e colaboradores (2014) relataram que a Adn é capaz de se ligar em ambas as cisteínas das Prx de humanos (Cys_P e Cys_R) além de inibir também as enzimas do sistema Trx (hTrx e hTrxR). De fato, os autores demonstraram que, entre as enzimas analisadas, a hTrxR é a que sofre maior inibição pela Adn. Neste contexto, como mencionado anteriormente, o sistema redutor de 2-Cys eucarióticas difere significativamente do encontrado para a redução de AhpC. Enquanto em eucariotos o sistema é composto pela enzima Trx e pela flavoenzima TrxR e os equivalentes redutores são oriundos do NADPH (Figura 3A), em procariotos o sistema redutor é composto apenas pela flavoenzima AhpF que utiliza hidretos do NADH no processo de redução (Figura 3B).

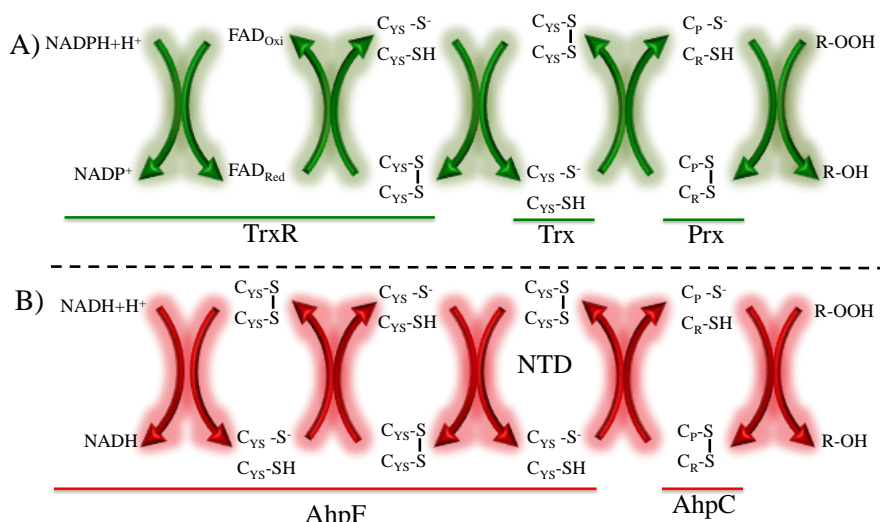


Figura 3: Ciclos de oxirredução envolvidos na redução de hidroperóxidos por Prx 2-Cys típicas de eucariotos e bactérias. A) As Prx 2-Cys típicas de células eucarióticas são reduzidas pelo sistema Trx que compreende as enzimas tioredoxina, tioredoxina redutase, uma flavoenzima, e NADPH. B) Em células procarióticas, as Prx 2-Cys típicas (AhpC) são reduzidas pela flavoenzima AhpF, que utiliza elétrons oriundos do NADH.

De fato, em eucariotos inferiores também existe o sistema redutor Trx-TrxR. No entanto, estas enzimas normalmente estão associadas a diversos processos de

oxirredução centrais como síntese de desoxirribonucleotídeos, reparação de proteínas danificadas oxidativamente, enovelamento de proteínas, metabolismo do enxofre, ativação de fatores de transcrição, entre outros (Lu e Holmgren, 2014; Vignols *et al.*, 2005). Neste contexto, quando se analisa as estruturas de TrxR de procariotos e eucariotos, é possível perceber que as enzimas possuem estruturas muito distintas (Figura 4A e 4B, respectivamente). Apesar de ambas serem homodímeros, a enzima de bactérias é menor (~70kDa) quando comparada com a de eucariotos multicelulares (~100kDa). Adicionalmente, os motivos que contém as cisteínas catalíticas diferem de forma significativa tanto em sua composição quanto na localização. Nas TrxR de eucariotos inferiores o motivo (Cys-X-X-Cys) está inserido no domínio de ligação ao NADPH ao passo que nas enzimas de eucariotos multicelulares o motivo (Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys) está inserido no domínio de ligação ao FAD e podem possuir um terceiro resíduo de Cys ou de selenocisteína (Sec) na porção C-terminal (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010). Por outro lado, a enzima Trx é bastante conservada estruturalmente entre procariotos e eucariotos (Collet *et al.*, 2010) (Figura 4C e 4D).

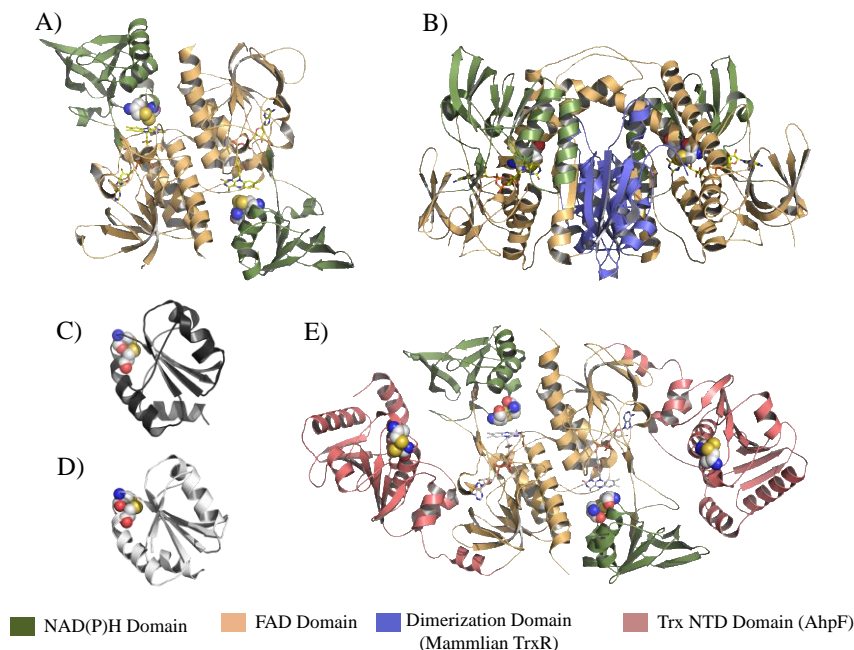


Figura 4: Comparação entre estruturas de Trx e TrxR de bactéria e de humanos e AhpF de bactérias. Todas as estruturas estão apresentadas em *cartoon* de acordo com a unidade biológica (representada por monômeros para Trx e dímeros para TrxR e AhpF). **A)** TrxR de *E. coli* (pdb: 3ITJ). **B)** TrxR1 de *H. sapiens* (pdb: 2J3N). **C)** e **D)** Trx de *E. coli* e de humanos, respectivamente. **E)** AhpF de *S. typhimurium* (pdb: 1HYU). As representações gráficas foram geradas com auxílio do *software* Pymol.

A AhpF também é uma proteína homodimérica com massa molecular aproximada de 220kDa e que possui, além de dos domínios de ligação para FAD e NADH (o que contrasta com as TrxR), um terceiro domínio denominado de NTD (para

N-terminal domain) formado por duas moléculas contíguas de Trx (Figura 4E). Essas moléculas de Trx contém duas cisteínas envolvidas na reação inicial de redução de AhpC. Dessa forma, uma vez que AhpF representa um sistema acoplado Trx-TrxR a ligação de um inibidor em um dos centros redox impossibilitaria a redução de AhpC.

Adicionalmente, trabalhos indicam que os efeitos dos antibióticos de induzir depleção do NADH, promovendo uma maior abundância de NAD⁺ na célula, resultam em uma hiperativação de TCA e da cadeia de transporte de elétrons, o que aumenta a produção de produtos secundários como O₂^{•-} e H₂O₂ (van Acker *et al.*, 2016; Dwyer *et al.*, 2014; Kohanski *et al.*, 2010). Nesse sentido, outros estudos demonstraram que, em condições aeróbicas, a limitação na concentração de AhpC induz AhpF a produzir H₂O₂ a partir do oxigênio molecular (O₂). Nesse processo, AhpF consome NADH e produz NAD⁺, contribuindo para a hiperativação da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, para a produção de mais espécies reativas de oxigênio (Poole & Ellis, 1996; Niimura *et al.*, 1995). Nesse sentido, a inibição de AhpC contribuiria para morte de patógenos ao acentuar os efeitos oxidativos observados na administração de antibióticos.

Com base nos dados apresentados acima, as investigações envolvendo a atividade inibitória de Adn sobre as Prx é de grande importância e apresenta grande potencial para a caracterização de um novo fármaco antimicrobiano. Vale salientar que, até o presente momento, nenhum trabalho havia atentado para avaliar a inibição de Adn sobre as Prx 2-Cys de bactérias ou mesmo sobre os sistemas redutores bacterianos. Neste contexto, a análise dos efeitos de Adn sobre bactérias patogênicas pode ampliar o campo de utilização dessa molécula, podendo resultar em novas formas de terapias para as doenças causadas por elas. Adicionalmente, além do diterpenóide Adn, o qual pertence a família dos *ent*-cauranos, existem compostos similares que podem ser obtidos de plantas da biota brasileira (Dutra *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2016; Vandresen *et al.* 2010) o que representa uma forma bastante importante de prospecção direcionada a nossa biodiversidade, mas novamente nenhum trabalho até o presente momento atentou para esta investigação.

REFERÊNCIAS

- van Acker, H.; Gielis, J.; Acke, M.; Cools, F.; Cos, P.; Coenye, T. 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria. *PLoS One*, 11(7) e0159837.
- Alegria, T. G. P.; Meireles, D. A.; Cussiol, J. R. R.; Hugo, M.; Trujillo, M.; de Oliveira, M. A.; Miyamoto, S.; Queiroz, R. F.; Valadares, N. F.; Garratt, R. C.; Radi, R.; Di Mascio, P.; Augusto, O.; Netto, L. E. S. 2016. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 114(2):E132-E141.
- Aminov, R. I. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134.
- Ayres, H.; Furr, J. R.; Russell, A. D. 1993. A rapid method of evaluating permeabilizing activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Biology*, 17(4):149-151.
- Ayres, H.; Furr, J. R.; Russell, A. D. 1999. Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Biology*, 28(1):13-16.
- Babior, B. M. 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16:42-47.
- Bartlett, J. G.; Gilbert, D. N. & Spellberg, B. 2013. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(10): 1445-1450.
- Benov, L. T. & Fridovich, I. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. 1994. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41): 25310-25314.
- Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S. & Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9-19.
- Biteau, B.; Labarre, J. & Toledano, M. B. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 425, 980-984.
- Bizzini, A.; Zhao, C.; Auffray, Y. & Hartke, A. 2009. The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6): 1196-1202.
- Breidenstein, E. B. M.; Khaira, B. K.; Wiegand, I.; Overhage, J.; Robert E W Hancock, R. E. W. 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12):4486-4491.
- Brennan, R. E.; Kiss, K.; Baalman, R. & Samuel, J. E. 2015. Cloning, expression, and characterization of a *Coxiella burnetii* Cu/Zn Superoxide dismutase. *BMC Microbiology*, 15:99.
- Brynildsen, M. P.; Winkler, J. A.; Spina, C. S.; MacDonald, C.; Collins, J. J. 2013. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nature Biotechnology*, 31(2):160-165.
- Calcerrada, P.; Peluffo, G. & Radi, R. 2011. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxyxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current Pharmaceutical Design*, 17(35):3905-3932.
- Calhoun, L. N. & Kwon, Y. M. 2011. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(3):261-265.

- Carvalho, L. A. C.; Truzzi, D. R.; 1, Fallani, T. S.; Alves, S. V.; Toledo Jr, J. C.; Augusto, O.; Netto, L. E. S.; Meotti, F. C. 2017. Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(21):8705-8715.
- Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinac, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleesschauwer, B.; Cecchini, M.; Ouakrim, D. A.; Oliveira, T. C.; Struelens, M. J.; Suetens, C.; Monnet, D. L. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19: 56–66.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States.
- Chaves-Moreno, D.; Wos-Oxley, M. L.; Jáuregui, R.; Medina, E.; Oxley, A. P.; Pieper, D. H. 2016. Exploring the transcriptome of *Staphylococcus aureus* in its natural niche. *Scientific Reports*, 6:33174.
- Chen, E. & Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Research*, 21(9):2260.
- Chen; Chih-Jung; Yhu-Chering Huang; Shian-Sen Shie. 2020. Evolution of Multi-Resistance to Vancomycin, Daptomycin, and Linezolid in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Persistent Bacteremia. *Frontiers in microbiology*, 11: 1414.
- Chopra, I.; Hesse, L. & O'Neill, A. J. 2002. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1):4S–15S.
- Chuang, M. H.; Wu, M. S.; Lo, W. L.; Lin, J. T.; Wong, C. H.; Chiou, S. H. 2006. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 103:2552-2557.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Approved Standard, 10th Edition – Janeiro de 2015.
- Collet, J-F & Messens, J. 2010. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidant & Redox Signaling*, 13:1205-16.
- Condeles, A. L.; Gomes, F.; 2, de Oliveira, M. A.; Netto, L. E. S.; Toledo Junior, J. C. 2020. Thiol Peroxidases as Major Regulators of Intracellular Levels of Peroxynitrite in Live *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Antioxidants (Basel Switzerland)*, 9(5):434. doi: 10.3390/antiox9050434.
- Cosgrove, K.; Coutts, G.; Jonsson, I-M.; Tarkowski, A.; Kokai-Kun, J. F.; Mond, J. J.; Foster, S. J. 2007. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189:1025-35.
- Dadgostar, P. 2019. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect Drug Resist.*, 12:3903-3910. doi: 10.2147/IDR.S234610.
- Davies, B. W.; Kohanski, M. A.; Simmons, L. A.; Winkler, J. A.; Collins, J. J.; Walker, G. C. 2009. Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 36(5):845–860.
- Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5):808-16.

- Desbois, A. P.; Lawlor, K. C. 2013. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Mar Drugs*. 11(11):4544-57.
- Discola KF, Oliveira MA, Silva GM, Barcena JA, Porras P, Padilla A, Netto LE, Guimarães BG (2005). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 61:445-7.
- Docquier, J. D. & Mangani S. 2018. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resistance Updates*, 36:13-29.
- Dryden, M. 2018. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3):299-303.
- Dutra, L. M.; Bomfim, L. M.; Rocha, S. L. A.; Nepel, A.; 3, Soares, M. B. P.; Barison, A.; Costa, E. V.; Bezerra, D. P. 2014. *ent*-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24:3315-20.
- Dwyer, D. J.; Belenky, P. A.; Yang, J. H.; MacDonald, I. C.; Martell, J. D.; Takahashi, N.; Chan, C. T. Y.; Lobritz, M. A.; Braff, D.; Schwarz, E. G.; Ye, J. D.; Pati, M.; Vercruyse, M.; Ralifo, P. S.; Allison, K. R.; Khalil, A. S.; Ting, A. Y.; Walker, G. C.; Collins, J. J. 2014. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 111:E2100-9.
- ECDC/EMA (European Centre for Disease Prevention and Control/ European Medicines Evaluation Agency) Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. 2009.
- Egan, S. A.; Shore, A. C.; O'Connell, B.; Brennan, G. I.; Coleman, D. C. 2020. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75:1704-1711.
- Eichenberger, E. M.; Thaden, J. T. 2019. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 8(2), 37.
- Fernandes, P.; Martens, E. & Pereira, D. 2017. Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 70(5):527-533.
- Feretzakis, G.; Loupelis, E.; Sakagianni, A.; Skarmoutsou, N.; Michelidou, S.; Velentza, A.; Martsoukou, M.; Valakis, K.; Petropoulou, S.; Koutalas, E. 2019. A 2-Year Single-Centre Audit on Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from an Intensive Care Unit and Other Wards in a General Public Hospital in Greece. *Antibiotics*, 8(2):62.
- Fidyt, K.; Pastorzak, A.; Goral, A.; Szczygiel, K.; Fendler, W.; Muchowicz, A.; Bartłomiejczyk, M. A.; Madzio, J.; Cyran, J.; Graczyk-Jarzynka, A.; Jansen, E.; Patkowska, E.; Lech-Maranda, E.; Pal, D.; Blair, H.; Burdzinska, A.; Pedzisz, P.; Glodkowska-Mrowka, E.; Demkow, U.; Gawle-Krawczyk, K.; Matysiak, M.; Winiarska, M.; Juszczynski, P.; Mlynarski, W.; Heidenreich, O.; Golab, J.; Firczuk, M. 2019. Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Oncol*. (5):1180-1195. doi: 10.1002/1878-0261.12476. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30861284; PMCID: PMC6487705.

- Foti, J. J.; Devadoss, B.; Winkler, J. A.; Collins, J. J.; Walker, G. C. 2012. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, 336(6079):315–319.
- Fritzsche, C.; Schleicher, U. & Bogdan, C. 2010. Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology*, 215(9–10): 826–832.
- Giguère, S. P. J.; Baggot, J. D.; Walker, R. D.; Dowling, P.M. 2007. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4^o edição. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(7): 744.
- Girgis, H. S.; Hottes, A. K.; Tavazoie, S. 2009. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One*, 4(5):e5629.
- Golkar, Z.; Bagazra, O.; Pace, D. G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2):129–136.
- Gordon, S. 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44(3): 463–475.
- Grant, S. S.; 1, Kaufmann, B. B.; Chand, N. S.; Haseley, N.; Hung, D. T. 2012. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(30):12147–12152.
- Gusarov, I.; Shatalin, K.; Starodubtseva, M.; Nudler, E. 2009. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*, 325(5946):1380–1384.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. 2015. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, 5a Edição, 896p.
- Heikkila, R. E. & Cohen, G. 1977. The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. In: *Superoxide and Superoxide Dismutases*. London, UK: Academic Press, 367–373.
- Hébrard, M.; Viala, J. P. M.; Méresse, S.; Barras, F.; Aussel, L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *Journal of Bacteriology*, 191:4605–4614.
- Hou, J. K.; Huang, Y.; He, W.; Yan, Z. W.; Fan, L.; Liu, M. H.; Xiao, W. L.; Sun, H. D. & Chen, G. Q. 2014. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, 5: e1400.
- Ibacache-Quiroga, C.; Oliveros, J. C.; Couce, A.; Blázquez, J. 2018. Parallel Evolution of High-Level Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli* Under Low and High Mutation Supply Rates. *Frontiers in Microbiology*, 9:427. doi: 10.3389/fmicb.2018.00427.
- Imlay, J. A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77:755-76.
- Jacobson, F. S.; Morgan, R. W.; Christman, M. F.; Ames, B. N. 1989. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *J Biol Chem*, 264(3):1488-96.
- Jaeger, T.; Flohé, L. 2006. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors*, 27:109-20.
- Jang, S.; Imlay, J. A. 2010. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular Microbiology*, 78:1448-67.

- Jee, J.; Rasouly, A.; Shamovsky, I.; Akivis, Y.; Steinman, S. R.; Mishra, B.; Nudler, E. 2016. Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing. *Nature*, 534:693-6.
- Jiang, Q., E, F.; Tian, J.; Yang, J.; Zhang, J.; Cheng, Y. 2020. Light-excited antibiotics for potentiating bacterial killing via reactive oxygen species generation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(14):16150-16158.
- Jönsson, T. J.; Ellis, H. R. & Poole, L. B. 2007. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry*, 46: 5709-5721.
- Kamariah, N.; Eisenhaber, B.; Eisenhaber, F.; Grüber, G. 2018. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions. *Scientific Reports*, 8(1):14151.
- Kamariah, N.; Eisenhaber, B.; Eisenhaber, F.; Grüber, G. 2018. Active site C P-loop dynamics modulate substrate binding, catalysis, oligomerization, stability, over-oxidation and recycling of 2-Cys Peroxiredoxins. *Free Radical Biology and Medicine*, 118, 59-70.
- Kang, T. M.; Yuan, J.; Nguyen, A.; Becket, E.; Yang, H.; Miller, J. H. 2012. The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in *Escherichia coli*: caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in *Escherichia coli* and *Bacillus anthracis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:3216–3223.27.
- Kim, K.; Kim, I. H.; Lee, K. Y.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. 1988. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:4704-11.
- Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Wierzbowski, F.; Cottarel, G.; Collins, J. J. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135:679–690.
- Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8:423-35.
- Krishnamoorthy, G.; Leus, I. V.; Weeks, J. W.; Wolloscheck, D.; Rybenkov, V. V.; Zgurskaya, H. I. 2017. Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. *mBio*, 8(5). pii: e01172-17.
- Lakaye, B.; Dubus, A.; Joris, B.; Frère, J. M. 2001. Method for estimation of low outer membrane permeability to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9):2901-7.
- Lee, W.; Choi, K-S.; Riddell, J.; Ip, C.; Ghosh, D.; Park, J-H.; Park, Y. M. 2007. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 22011.
- Lee, J. T.; Lee, S. S.; Mondal, S.; Tripathi, B. N.; Kim, S.; Lee, K. W.; Hong, S. H.; Bai, H. W.; Cho, J. Y.; Chung, B. Y. 2016. Enhancement of the chaperone activity of alkyl hydroperoxide reductase C from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from a point-specific mutation confers heat tolerance in *Escherichia coli*. *Molecules and Cells*, 39(8):594-602.
- Lennon, B. W.; Williams, C. H.; Ludwig, M. L. 2000. Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science*, 289(5482):1190-4.

- Ling, J.; Cho, C.; Guo, L-T.; Aerni, H. R.; Rinehart, J.; Söll, D. 2012. Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. *Molecular Cell*, 48:713–722.
- Link, A. J.; Robison, K.; Church, G. M. 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis*, 18: 1259-1313.
- Liu, C.; Yin, Q. Q.; Zhou, H. C.; Wu, Y. L.; Pu, J. X.; Xia, L.; Liu, W.; Huang, X.; Jiang, T.; Wu, M. X.; He, L. C.; Zhao, Y. X.; Wang, X. L.; Xiao, W. L.; Chen, H. Z.; Zhao, Q.; Zhou, A. W.; Wang, L. S.; Sun, H. D.; Chen, G. Q. 2012. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature Chemical Biology*, 8(5):486-93.
- Liu, C. X.; Zhou, H. C.; Yin, Q. Q.; Wu, Y. L. & Chen, G. Q. 2013. Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Experimental Cell Research*, 319(2): 170–176.
- Lu, X.; Roe, F.; Jesaitis, A. & Lewandowski, Z. 1998. Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2, 4-triazole. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(1): 135.
- Lu, J. & Holmgren, A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology & Medicine*, 66:75-87.
- Mehta, N. S.; Benoit, S. L.; Mysore, J.; Maier, R. J. 2007. In vitro and in vivo characterization of alkyl hydroperoxide reductase mutant strains of *Helicobacter hepaticus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770:257-65.
- Mendes, R. E.; Deshpande, L. M.; Jones, R. N. 2014. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resistance Updates*, 17(1-2):1-12.
- Michael, C. A.; Dominey-Howes, D. & Labbate, M. 2014. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health*, 2:145.
- Ministério da Saúde – Brasil. 2018. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única.
- Mishra, S. & Imlay, J. 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2): 145–160.
- Mo, Y. X.; Liu, D. L.; Gao, S. L.; Yin, X.C. 2019. Adenanthin Induces Differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cells by Targeting Peroxiredoxin III. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*.(4):1083-1087. Chinese. doi: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.04.015. PMID: 31418361.
- Moss, C. W.; Samuels, S. B.; Weaver, R. E. 1972. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol*. 24(4):596-8. PMID: 4628797; PMCID: PMC380620.
- Muchowicz, A.; Firczuk, M.; Chlebowska, J.; Nowis, D.; Stachura, J.; Barankiewicz, J.; Trzeciecka, A.; Kłossowski, S.; Ostaszewski, R.; Zagożdżon, R.; Pu, J. X.; Sun, H. D.; Golab, J. 2014. Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochemical Pharmacology*, 89(2):210-6.
- Murata, T.; Tseng, W.; Guina, T.; Miller, S. I.; Nikaido, H. 2007. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(20):7213-22.
- Netto, L. E. S.; Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:15315-21.

- Nguyen, D.; Joshi-Datar, A.; Lepine, F.; Bauerle, E.; Olakanmi, O.; Beer, K.; McKay, G.; Siehnel, R.; Schafhauser, J.; Wang, Y.; Britigan, B. E.; Singh, P. K. 2011. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334: 982–986.
- Nieto, L. M.; Mehaffy, C.; Creissen, E.; Troudt, J.; Troy, A.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Burgos, M.; Izzo, A.; Dobos, K. M. 2016. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* after Acquisition of Isoniazid Resistance: Individual Nature of katG Mutants and the Possible Role of AhpC. *PLoS One*, 11(11):e0166807.
- Niimura, Y.; Poole, L. B.; Massey, V. 1995. *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (43): 25645-25650.
- Nikaido, H.; Basina, M.; Nguyen, V.; Rosenberg, E. Y. 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal of Bacteriology*, 180(17):4686-92.
- Niles, J. C.; Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. 2006. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 14(2): 109–121.
- Nogueira, M. S.; Da Costa, F. B.; Brun, R.; Kaiser, M.; Schmidt, T. J. 2016. *ent*-Pimarane and *ent*-Kaurane Diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and Their Antiprotozoal Activity. *Molecules*, 21(9), 1237.
- Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D. C.; Netto, L. E. S., Augusto, O. 2007. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(3):326-34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.042.
- Oh, E. & Jeon, B. 2014. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 9:e87312.
- Oliveira M. A.; Netto, L. E.; Medrano, F.J.; Barbosa, J.A.; Alves, S.V.; Cussiol, J.R.; Guimarães, B.G. (2004). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an oxidized state of Ohr from *Xylella fastidiosa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 60: 337-9.
- Oliveira, M. A.; Discola, K. F.; Alves, S. V. Medrano, F. J.; Guimarães, B. G. & Netto, L. E. 2010. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*, 49: 3317-3326.
- O'Shea, R.; Moser, H. E. 2008. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(10):2871-8.
- Oteo, J.; Aracil, M. B. 2015. Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, extended spectrum β -lactamases and carbapenemases. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2:27–33, 2015.
- Parsonage, F.; Youngblood, D. S.; Sarma, G. N.; Wood, Z. A.; Karplus, P. A.; Poole, L. B. 2005. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*, 44:10583-92.
- Peskin, A. V.; Cox, A. G.; Nagy, P.; Morgan, P. E.; Hampton, M. B.; Davies, M. J.; Winterbourn, C. C. 2010. Removal of amino acid, peptide and protein

- hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. *The Biochemical Journal*, 432, 313–21.
- Piddock, L. J. 2012. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *The Lancet Infectious Diseases*, 12(3):249–253.
- Poole, L. B. & Ellis, H. R. 1996. Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry*, 35:56–64.
- Poole, L. B.; Hall, A. & Nelson, K. J. 2011. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Current Protocols in Toxicology*, Capítulo 7:Unidade7.9. doi: 10.1002/0471140856.tx0709s49.
- Prolo, C.; Alvarez, M. N. & Radi, R. 2013. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *BioFactors (Oxford, England)*, 40(2): 215–25.
- Prost, I.; Dhondt, S.; Rothe, G.; Vicente, J.; Rodriguez, M. J.; Kift, N.; Carbonne, F.; Griffiths, G.; Esquerré-Tugayé, M. T.; Rosahl, S.; Castresana, C.; Hamberg, M.; Fournier, J. 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.*, 139(4):1902–13. doi: 10.1104/pp.105.066274. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16299186; PMCID: PMC1310568.
- Purrello, S. M.; Garau, J.; Giamarellos, E.; Mazzei, T.; Pea, F.; Soriano, A.; Stefani, S. 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7:178–186.
- Radi, R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115:(23) 5839–5848.
- Reardon, S. 2015. Spread of antibiotic-resistance gene does not spell bacterial apocalypse — yet. *Nature*, doi: 10.1038/nature.2015.19037.
- Rhee, S. G. 2016. Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, 39(1):1–5.
- Roberts, B. & Hirst, R. 1996. Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Medical Microbiology*, 45(5):383–7.
- Rossolini, G. M.; Arena, F.; Pecile, P; Pollini, S. 2014. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18:56–60.
- Rudin, L.; Sjöström, J-A.; Lindberg, M.; Philipson, L. 1974. Factors Affecting Competence for Transformation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 118(1): 155–164.
- Salmelin, C.; Hovinen, J.; Vilpo, J. 2000. Polymyxin permeabilization as a tool to investigate cytotoxicity of therapeutic aromatic alkylators in DNA repair-deficient *Escherichia coli* strains. *Mutation Research*, 467(2):129–38.
- Scudamore, R. A.; Beveridge, T. J.; Goldner, M. 1979. Outer-membrane penetration barriers as components of intrinsic resistance to beta-lactam and other antibiotics in *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(2):182–9.
- Shatalin, K.; Shatalina, E.; Mironov, A.; Nudler, E. 2011. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 334(6058):986–990.
- Soethoudt, M.; Peskin, A. V.; Dickerhof, N.; Paton, L. N.; Pace, P. E. & Winterbourn, C. C. 2014. Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 77:331–9.

- Strebhardt, K. & Ullrich, A. 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature reviews: Cancer*, 8(6):473–80.
- Sugadev, R.; Ponnuswamy, M. N. & Sekar, K. 2011. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(1):67–77.
- Tairum, C. A.; Oliveira, M. A.; Horta, B. B.; Zara, F. J.; Netto, L. E. S.. 2012. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*, 424:28–41.
- Tairum, C. A.; Santos, M. C.; Breyer, C. A.; Geyer, R. R.; Nieves, C. J.; Portillo-Ledesma, S.; Ferrer-Sueta, G.; Toledo Jr, J. C.; Toyama, M. H.; Augusto, O. Netto, L. E. S.; de Oliveira, M. A. 2016. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Scientific Reports*, 6: 33133.
- Teixeira, F.; Tse, E.; Castro, H.; Makepeace, K. A. T.; Meinen, B. A.; Borchers, C. H.; Poole, L. B.; Bardwell, J. C.; Tomás, A. M.; Southworth, D. R.; Jakob, U. 2019. Chaperone activation and client binding of a 2-cysteine peroxiredoxin. *Nature Communications*, 10: 659.
- Tirapelli, C. R.; Ambrosio, S. R.; da Costa, F. B. & de Oliveira, A. M. 2008. Diterpenes : A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 3(1):1-8.
- Underhill, D. M. & Ozinsky, A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*, 20: 825–52.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Micobiological Reviews*, 56(3):395-411.
- Vaara, M. 2019. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. *Molecules*, 24(2): 249.
- Vandresen, F.; Schmitt, E.; Kato, L.; de Oliveira, C. M. A.; Amado, C. A. B.; da Silva, C. C. 2010. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20(3): 317-321.
- Ventola, C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4):277–83.
- Vignols, F.; Bréhélin, C.; Surdin-Kerjan, Y.; Thomas, D.; Meyer, Y. 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102:16729-34.
- Viljanen, P.; Vaara, M. 1984. Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25(6):701-5.
- Wang, X.; Zhao, X.; Malik, M.; Drlica, K. 2010. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3):520–524.
- Washburn, R. S.; Marra, A.; Bryant, A. P.; Rosenberg, M.; Gentry, D. R. 2001. *rho* Is Not Essential for Viability or Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4):1099-1103.
- WHO/IACG – World Health Organization/ Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. 2019. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections (Report to the secretary-general of the united nations).
- Wood, Z. A.; Schröder, E.; Robin Harris, J. & Poole, L. B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1):32–40.

- Wood, Z. A.; Poole, L. B. & Karplus, P. A. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 300(5619):650–653.
- Yeom, J.; Imlay, J. A.; Park, W. 2010. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29):22689–22695.
- Zeida, A.; Reyes, A. M.; Lichtig, P.; Hugo, M.; Vazquez, D. S.; Santos, J.; González Flecha, F. L.; Radi, R.; Estrin, D. A.; Trujillo, M. 2015. Molecular Basis of Hydroperoxide Specificity in Peroxiredoxins: The Case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 54(49):7237-47. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00758. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26569371