

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de **20/08/2023**.

**BUSCA DE INIBIDORES DO SISTEMA PEROXIRREDOXINA 2-  
CYS TÍPICAS DE EUCARIOTOS: AVALIAÇÃO FUNCIONAL E  
ESTRUTURAL**

**ANA LAURA PIRES DE OLIVEIRA**

**SÃO VICENTE – SP**  
**2021**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

BUSCA DE INIBIDORES DO SISTEMA PEROXIRREDOXINA 2-  
CYS TÍPICAS DE EUCARIOTOS: AVALIAÇÃO FUNCIONAL E  
ESTRUTURAL

**ANA LAURA PIRES DE OLIVEIRA**

**PROF. DR. MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA**

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

**SÃO VICENTE - SP**

**2021**

O48b Oliveira, Ana Laura Pires de  
Busca de inibidores do sistema peroxirredoxina 2-Cys  
típicas de eucariotos: : avaliação funcional e estrutural /  
Ana Laura Pires de Oliveira. -- São Vicente, 2021  
109 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente  
Orientador: Marcos Antonio de Oliveira

1. Biologia Molecular. 2. Peroxirredoxinas. 3. Inibição  
enzimática. 4. Leveduras. 5. Humanos. 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 a Deus e a minha mãe, Andréia.

## AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo n° 2019/04054-4) 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. João Lago e à doutoranda Deborah Sessa pelo fornecimento dos compostos naturais utilizados neste trabalho. Agradeço ainda ao Prof. Dr. João pelas discussões e sugestões sempre pertinentes.

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, agradeço pela ajuda com os experimentos, pela constante troca de ideias e pelo companheirismo. Em especial, agradeço à Dra. Melina, por todo companheirismo e incentivo, por me auxiliar com tanto carinho e profissionalismo desde a minha chegada no laboratório, mesmo estando sempre tão atarefada. Ao Dr. Leonardo e Dr. Breyer por toda colaboração, ajuda e amizade. Às minhas co-orientadas Maria Eduarda, Vitória e Tiffany, agradeço por me auxiliarem nos experimentos e me permitirem participar do trabalho de vocês, passando um pouco do que aprendi.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, por me orientar e permitir que eu fizesse parte da sua equipe desde a minha graduação. Por todo apoio e acolhimento nos dias difíceis e especialmente, por me proporcionar oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A minha mãe, Andréia, pelo apoio incondicional, por ser a minha fortaleza e sempre acreditar em mim.

Ao meu noivo, Ruan, pelo apoio incondicional, por compartilhar toda essa jornada comigo e por estar sempre presente nos momentos difíceis.

Às minhas psicólogas Camila e Angela, por me ajudarem na finalização desse trabalho, me acompanhando sempre com muito carinho e respeito.

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

**RESUMO:** Em infecções causadas por fungos patogênicos, o estresse oxidativo/nitrosativo promovido por células de defesa do hospedeiro e/ou pela ação de fungicidas, é utilizado para controlar a progressão do patógeno. Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos, infecções invasivas e linhagens resistentes aos principais fungicidas, como por exemplo, a anfotericina B (AMB), representam um grave problema de saúde pública. A resistência destes patógenos está relacionada com diversos fatores, dentre eles, a presença de enzimas antioxidantes de alta eficiência, capazes de neutralizar os oxidantes produzidos pelo hospedeiro e pela administração de fungicidas. Neste contexto, um grupo de peroxidases denominadas Peroxirredoxinas 2-Cys típicas (Prx 2-Cys típicas) se destacam por decompor uma grande variedade de hidroperóxidos com alta especificidade e eficiência ( $k = 10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), estarem distribuídas nos mais diversos ambientes celulares e possuírem uma cisteína altamente reativa denominada cisteína peroxidásica ( $C_P$ ). Apesar das Prx 2-Cys típicas de fungos patogênicos serem um alvo bastante atraente para o combate de infecções fúngicas, nenhum inibidor de Prx 2-Cys típicas foi caracterizado para estes organismos. Por outro lado, já foram descritos inibidores destas enzimas para mamíferos, dentre eles, diterpenóides naturais como a Adenantina (Adn) e o JDA-202, que são capazes de inibir isoformas citosólicas das Prx 2-Cys típicas de humanos (Prx1 e Prx2), levando a remissão de tumores com baixa toxicidade para células saudáveis. É importante ressaltar que estudos que investigam inibidores de Prx 2-Cys típicas nunca atentaram para uma avaliação comparativa com enzimas de outros organismos. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a Adn é capaz de inibir as isoformas citosólicas Tsa1 e Tsa2 de *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo modelo para estudos bioquímicos e genéticos. Investigações realizadas no âmbito deste trabalho revelaram que Tsa1 apresenta alta identidade com isoformas citosólicas de leveduras patogênicas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, revelando que esta levedura é um bom modelo para estudo destes micro-organismos. Os objetivos deste trabalho residiram na busca por compostos naturais da biota costeira de São Paulo com atividade inibitória sobre Prx 2-Cys típicas de fungos, utilizando como modelo Tsa1 de *S. cerevisiae* de forma comparativa com Prx2, a isoforma mais abundante de Prx 2-Cys típicas de humano e na utilização desta levedura para ensaios *in vivo* do potencial fungicida dos compostos identificados como inibidores de Tsa1, assim como inibidores + fungicidas amplamente utilizados em tratamentos clínicos (ex: AMB). Neste contexto, foram avaliadas as propriedades inibitórias da Adn, assim como de terpenóides *ent*-caurânos e lactonas sesquiterpênicas da biota brasileira. Nossos resultados revelaram que a Adn, como esperado, é capaz de inibir eficientemente a Prx2 humana e redeterminamos seu  $IC_{50}$  como  $2 \pm 0.13 \mu\text{M}$ . Em relação aos compostos naturais, nossos resultados revelaram que os compostos NC-EK2, NC-LS1, NC-LS5, NC-HP1 e NC-ABP1 foram capazes de exercer atividade inibitória sobre as Prx 2-Cys típicas por mecanismos aparentemente distintos. Também demonstramos que NC-LS5 é capaz de exercer atividade inibitória sobre o crescimento de células de levedura. Evidências obtidas por SDS-PAGE indicam que NC-LS1 é capaz de impedir a formação de dissulfetos, o que pode ser atribuído aos sistemas carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados presentes em sua estrutura, capazes de efetuar uma adição de Michael com tióis das enzimas, indicando uma inibição irreversível a exemplo de Adn. Por outro lado, o composto NC-EK2 não possui estes sistemas sugerindo uma inibição do tipo competitiva, entretanto, análises adicionais são necessárias para se chegar a qualquer observação mais conclusiva. Foram realizados procedimentos de *docking* molecular sobre as estruturas de Tsa1 e Prx2, visando um melhor entendimento das interações moleculares entre os compostos identificados como inibidores. Inicialmente, efetuamos as simulações utilizando Tsa1 e os inibidores Adn e NC-LS1, onde Adn foi utilizada por já existirem dados comparativos de *docking* utilizando Prx1 de humanos e ambos são capazes de bloquear as cisteínas. Desta forma, para ambos os compostos, se esperaria resultados positivos em regiões próximas as cisteínas. Os resultados obtidos indicam que o posicionamento dos compostos ocorreu integralmente na região do sítio ativo próximo à  $C_P$  e que as interações para estabilização dos ligantes são majoritariamente de caráter hidrofóbico envolvendo átomos das cadeias laterais dos resíduos Leu<sup>41</sup>, Phe<sup>45</sup>, Leu<sup>142</sup>, Val<sup>167</sup>, Pro<sup>181</sup> e Tyr<sup>77</sup> e também das cadeias principais de Phe<sup>45</sup>, Leu<sup>142</sup>. A maioria dos resíduos identificados em Tsa1 são equivalentes aos resíduos já relatados na literatura, identificados por *docking* em Prx1 de humanos, assim como aos resíduos que interagem com um ligante cristalizado juntamente com Tsa1 pelo nosso grupo de pesquisa (PDB: 3SBC), o que gera uma maior confiabilidade dos dados obtidos. De forma geral, os resultados obtidos neste projeto representam a primeira abordagem comparativa da atividade inibitória de compostos naturais sobre 2-Cys Prx típicas humana e de fungo incluindo a identificação de novos compostos da biota costeira brasileira.

**Palavras-chave:** Peroxirredoxinas. Inibidores. Leveduras. Humanos.

**ABSTRACT:** In infections caused by pathogenic fungi, oxidative/nitrosative stress promoted by host defense cells and/or by the action of fungicides is used to control pathogen progression. However, in immunocompromised individuals, invasive infections and strains resistant to the main fungicides, such as amphotericin B (AMB), represent a serious public health problem. The resistance of these pathogens is related to several factors, among them the presence of antioxidant enzymes of high efficiency, capable of neutralizing the oxidants produced by the host and by the administration of fungicides. In this context, a group of peroxidases called Typical 2-Cys Peroxiredoxins (Typical Prx 2-Cys) stand out for breaking down a wide variety of hydroperoxides with high specificity and efficiency ( $k = 10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), being distributed in the most diverse cellular environments and possessing a highly reactive cysteine called peroxidase cysteine ( $C_P$ ). Although the typical Prx 2-Cys of pathogenic fungi is a very attractive target for fighting fungal infections, no inhibitors of typical Prx 2-Cys have been characterized for these organisms. On the other hand, inhibitors of these enzymes have been described for mammals, among them natural diterpenoids such as Adenantine (Adn) and JDA-202, which are able to inhibit cytosolic isoforms of the typical human Prx 2-Cys (Prx1 and Prx2), leading to tumor remission with low toxicity to healthy cells. Importantly, studies investigating inhibitors of typical Prx 2-Cys have never paid attention to a comparative evaluation with enzymes from other organisms. Our research group has demonstrated that Adn is able to inhibit the cytosolic isoforms Tsa1 and Tsa2 of *Saccharomyces cerevisiae*, a model organism for biochemical and genetic studies. Investigations performed as part of this work revealed that Tsa1 shows high identity with cytosolic isoforms of pathogenic yeasts of the genera *Candida* and *Cryptococcus*, revealing that this yeast is a good model for studying these microorganisms. The objectives of this work were in the search for natural compounds from the coastal biota of São Paulo with inhibitory activity on Prx 2-Cys typical of fungi, using as model Tsa1 of *S. cerevisiae* in a comparative way with Prx2, the most abundant isoform of Prx 2-Cys typical of human and in the use of this yeast for in vivo assays of the fungicidal potential of the compounds identified as Tsa1 inhibitors, as well as inhibitors + fungicides widely used in clinical treatments (e.g. AMB). In this context, the inhibitory properties of Adn, as well as ent-cauranic terpenoids and sesquiterpene lactones from Brazilian biota, were evaluated. Our results revealed that Adn, as expected, is able to efficiently inhibit human Prx2 and we redetermined its  $IC_{50}$  as  $2 \pm 0.13 \mu\text{M}$ . Regarding natural compounds, our results revealed that compounds NC-EK2, NC-LS1, NC-LS5, NC-HP1 and NC-ABP1 were able to exert inhibitory activity on typical Prx 2-Cys by apparently distinct mechanisms. We also demonstrated that NC-LS5 is able to exert inhibitory activity on yeast cell growth. Evidence obtained by SDS-PAGE indicates that NC-LS1 is able to prevent the formation of disulfides, which can be attributed to the carbonyl  $\alpha$ - $\beta$ -unsaturated systems present in its structure, able to effect a Michael addition with thiols of the enzymes, indicating an irreversible inhibition like Adn. On the other hand, the NC-EK2 compound does not have these systems suggesting a competitive type inhibition, however, further analysis is needed to arrive at any more conclusive observation. Molecular docking procedures were performed on the structures of Tsa1 and Prx2, aiming at a better understanding of the molecular interactions between the compounds identified as inhibitors. Initially, we performed the simulations using Tsa1 and the inhibitors Adn and NC-LS1, where Adn was used because there are already comparative docking data using Prx1 from humans and both are able to block cysteines. Thus, for both compounds, one would expect positive results in regions near the cysteines. The results obtained indicate that the positioning of the compounds occurred entirely in the region of the active site near the  $C_P$  and that the interactions for stabilization of the ligands are mostly of hydrophobic character involving atoms of the side chains of residues Leu<sup>41</sup>, Phe<sup>45</sup>, Leu<sup>142</sup>, Val<sup>167</sup>, Pro<sup>181</sup> and Tyr<sup>77</sup> and also of the main chains of Phe<sup>45</sup>, Leu<sup>142</sup>. Most of the residues identified in Tsa1 are equivalent to residues already reported in the literature, identified by docking in human Prx1, as well as to residues interacting with a ligand crystallized together with Tsa1 by our research group (PDB: 3SBC), which generates a higher reliability of the obtained data. Overall, the results obtained in this project represent the first comparative approach to the inhibitory activity of natural compounds on human and fungal 2-Cys Prx including the identification of new compounds from the Brazilian coastal biota.

**Keywords:** Peroxiredoxins. Inhibitors. Yeasts. Humans.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das reações de Fenton e de Harber-Weiss, capazes de promover a formação de HO•.....	14
Figura 2: Tríade catalítica e representação das alterações estruturais entre o estado reduzido (FF) e oxidado (LU).....	17
Figura 3: Diferentes estruturas quaternárias apresentadas por Prx 2-Cys típicas .....	18
Figura 4: Modo de ação dos antifúngicos comumente usados contra infecções invasivas e sistêmicas e explosão oxidativa em fagócitos .....	22
Figura 5: Interações Tsa1 e Tsa2 na interface D.....	24
Figura 6: Estruturas químicas de inibidores de Prx2 2-Cys típicas.....	25
Figura 7: Estrutura dos compostos naturais, isolados da biota florística de São Paulo, selecionados para o desenvolvimento do estudo .....	33
Figura 8: SDS-PAGE contendo os resultados da purificação de Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> e Prx2 de <i>H. sapiens</i> pelo método de IMAC.....	34
Figura 9: Ensaio de oxidação do DTT para avaliação comparativa inibitória da Adn sobre Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> e Prx2 de <i>H. sapiens</i> .....	34
Figura 10: Ensaio de oxidação de NADPH com Prx2 e Tsa1 pré-tratadas com Adn.....	35
Figura 11: Determinação do IC <sub>50</sub> de Prx2 + Adn pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH....	36
Figura 12: Ensaio de oxidação do NADPH utilizando a proteína Prx2 pré tratada com compostos naturais .....	37
Figura 13: Ensaio de oxidação do NADPH utilizando a proteína Tsa1 pré tratada com compostos naturais.....	38
Figura 14: Consumo relativo do NADPH após tratamento das enzimas os com compostos naturais.....	40
Figura 15: Diagramas de formas reduzidas, oxidadas e contendo um inibidor ligado à C <sub>P</sub> de Prx 2-Cys típicas .....	41

Figura 16: Resultado de SDS-PAGE não redutor para avaliação da ligação dos compostos naturais com as cisteínas de Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> e Prx2 de <i>H. sapiens</i> .....	41
Figura 17: Superfície molecular e interações de resíduos de AA do sítio ativo de Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> .....	43
Figura 18: Alinhamento das sequências de AA de Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> e Prx 2-Cys típicas de leveduras patogênicas.....	43
Figura 19: Estruturas cristalográficas de Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> e Prx2 de <i>H. sapiens</i> e estruturas tridimensionais dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre as proteínas deste estudo.....	45
Figura 20: Distribuição dos compostos pelo tetrâmero de Prx2 e interações entre grupo funcional dos compostos e $\gamma$ de C <sub>p</sub> . ....	46
Figura 21: Resíduos de AA de Tsa1 e Prx2 que estabilizam os inibidores no sitio ativo.....	47
Figura 22: Importância da interface D para estabilização de ligantes.....	48
Figura 23: Avaliação da concentração inibitória mínima dos compostos naturais inibidores de Tsa1 sobre <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	51
Figura 24: Determinação da concentração inibitória mínima de AMB sobre <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	52
Figura 25: Atuação em conjunto do antifungico AMB e compostos naturais inibidores de Tsa1 de <i>S. cerevisiae in vivo</i> .....	52

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Velocidade inicial ( $v_0$ ) das reações das enzimas Tsa1 e Prx2 tratadas com os compostos naturais da biota florística brasileira.....	39
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
Adn	Adenantina
AMB	Anfotericina B
Cat	Catalase
CHP	Peróxido de cumeno
C <sub>P</sub>	Cisteína peroxidásica
C <sub>P</sub> -SOH	Cisteína ácido sulfênico
C <sub>P</sub> -SO <sub>2</sub> H	Cisteína ácido sulfínico
C <sub>R</sub>	Cisteína de resolução
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FF	<i>Fully folded</i>
Gpx	Glutaciona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
HOCl	Ácido hipocloroso
IAA	Iodoacetamida
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósideo
Lp-OOH	Peróxidos de lipídeos
LU	<i>Locally unfolded</i>
MIC	Concentração inibitória mínima
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2-fosfato reduzido
NC-ABP1	Ácido benzóico prenilado
NC-CA1	Ácido cóstico
NC-EK1	Ácido caurenóico
NC-EK2	Ácido 15-senecioloxi-caurenóico
NC-HP1	Hidroquinonina prenilada

NC-LG1	Lignana
NC-LS1	Caleína C
NC-LS2	Acetogenina
NC-LS3	Jacaranona
NC-LS5	Lactona sesquiterpênica
NEM	N-etilmaleimida
NO <sup>•</sup>	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
Ohr	<i>Organic hydroperoxide resistance protein</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAA	Parvifolina AA
Prx	Peroxirredoxinas
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
Sod	Superóxido dismutase
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
Tsa1	<i>Thiol-specific antioxidante 1</i>

## SUMÁRIO

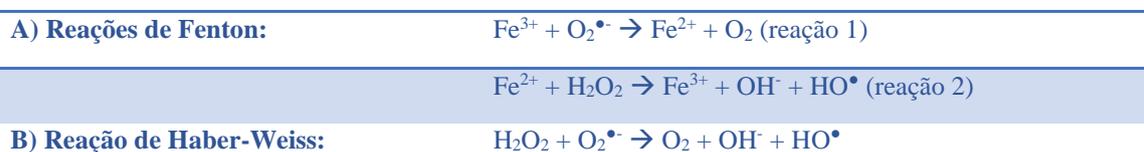
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Infecção por patógenos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	14
1.2 Peroxirredoxinas: variedade de substratos, eficiência catalítica, abundância e classificação.....	15
1.3 Transições da estrutura quaternária .....	17
1.4 Fungos patogênicos e defesas antioxidantes.....	18
1.5 Fármacos fungicidas levam à formação de EROs.....	21
1.6 Similaridade e identidade de Prx 2-Cys típicas não correspondem a redundância funcional.....	23
1.7 Inibidores de Prx e potenciais moléculas inibitórias oriundas da biota costeira brasileira.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Reagentes.....	29
3.2 Moléculas para avaliação da atividade inibitória sobre Tsa1 e Prx2.....	29
3.3 Meios de cultura.....	29
3.4 Linhagens.....	29
3.5 Mini preparação plasmidial.....	29
3.6 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo.....	29
3.7 Preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes.....	30
3.8 Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	30
3.9 Quantificação de proteínas.....	30
3.10 Determinação da atividade antioxidante.....	30
3.11 Determinação da IC <sub>50</sub> .....	30
3.12 Análise da ligação de compostos às enzimas por SDS-PAGE.....	31
3.13 Análises da estrutura primária e terciária/quaternária de Prx 2-Cys típicas.....	31
3.14 Ensaios de citotoxicidade sobre células de levedura.....	31
3.15 <i>Docking</i> molecular dos compostos naturais com Tsa1 e Prx2.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Compostos naturais.....	33
4.2 Padronização da expressão e purificação de Tsa1 e Prx2.....	33
4.3 Avaliação da inibição e ligação de compostos naturais à Prx 2-Cys típicas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>H. sapiens</i> .....	34
4.4 Tsa1 de <i>S. cerevisiae</i> como modelo biológico para a inibição de Prx 2-Cys de leveduras patogênicas.....	42
4.5 Avaliação das interações enzima-inibidor <i>in silico</i> .....	44
4.6 Avaliação do potencial fungicida dos compostos identificados como inibidores de Tsa1 sobre <i>S. cerevisiae</i> .....	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6. PERSPECTIVAS.....	57
REFERÊNCIAS .....	58
APÊNDICES .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Infecção por patógenos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Quando um micro-organismo infecta seu hospedeiro, uma das estratégias de defesa contra o patógeno é a elevada geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) por células fagocíticas, fazendo com que o patógeno se depare com um estresse oxidativo/nitrosativo promovido pelas células de defesa (Gutiérrez-Escobedo et al., 2020; Rocha et al., 2018). Nesta circunstância, ocorre a ativação da NADPH oxidase, também denominada fagócito oxidase, que oxida o NADPH e, no processo, reduz o oxigênio molecular ( $O_2$ ) à radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2015; Moghadam et al., 2021). O  $O_2^{\bullet-}$  sofre dismutação espontaneamente com taxas de  $10^5 M^{-1}s^{-1}$ , ou pela enzima superóxido dismutase (Sod) com constantes de  $10^8 M^{-1}s^{-1}$ , produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma molécula com grande poder de difusão em membranas biológicas, capaz de desencadear mecanismos potencialmente tóxicos para as células (Brown et al., 2012; Halliwell e Gutteridge, 2015; Underhill e Ozinsky, 2002). Sua importância em processos biológicos também pode ser exemplificada pelo fato que recentemente foi identificado o primeiro receptor de  $H_2O_2$  indicando sua participação em processos de sinalização relacionados à homeostase celular (Wu et al., 2020).

De fato, o  $H_2O_2$  por si só não é capaz de destruir eficientemente o patógeno, entretanto, grânulos azurófilos dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que catalisa a reação entre o  $H_2O_2$  e haletos ( $Cl^-$ ), produzindo ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente microbicida (Winterbourn e Kettle, 2013). Adicionalmente, o  $H_2O_2$  também é convertido em radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), outro agente altamente microbicida, por meio de reações químicas como as de Fenton e de Haber-Weiss (Fig. 1), podendo atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015).



**Figura 1: Representação das reações de Fenton e de Harber-Weiss, capazes de promover a formação de  $HO^{\bullet}$ .** A) Reações de Fenton, onde a interação entre uma molécula de  $Fe^{3+}$  com um  $O_2^{\bullet-}$  resulta na formação de  $Fe^{2+}$  que, ao reagir com  $H_2O_2$ , produz  $HO^{\bullet}$ . B) Representação da reação de Haber-Weiss, originando  $HO^{\bullet}$  a partir da reação entre  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ .

Outra forma de defesa contra micro-organismos invasores ocorre pela produção do radical óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). O  $NO^{\bullet}$  é gerado pela oxidação da arginina (Arg) na presença da molécula de oxigênio ( $O_2$ ), sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Fritzsche et al., 2010; Prolo et al., 2014). Elevadas concentrações de  $NO^{\bullet}$  podem originar uma série de compostos

reativos, as ERNs. Por exemplo, a reação  $\text{NO}^{\bullet}$  com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  promove a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um potente agente oxidante, capaz de promover danos a biomoléculas como proteínas e DNA (Calcerrada et al., 2011; Niles et al., 2006; Saini et al., 2019).

Adicionalmente, as EROs e ERNs podem atacar diretamente ácidos graxos insaturados e iniciar a peroxidação lipídica (Chang e Abbott, 2006; Manevich et al., 2002; Ramana et al., 2019), que além de gerar produtos citotóxicos (Sottero et al., 2018), atacam membranas biológicas, ocasionando perda de fluidez, queda do potencial de membrana, aumento da permeabilidade ao  $\text{H}^+$  e outros íons que podem resultar na ruptura e extravasamento do conteúdo celular (Alegria et al., 2017). Portanto, este é um processo extremamente deletério e a redução dos peróxidos de lipídeos por enzimas antioxidantes é um processo fundamental para a sobrevivência do micro-organismo (Alegria et al., 2017; Mongkolsuk et al., 1998; Sottero et al., 2018). Neste contexto, para decompor os diferentes hidroperóxidos, os patógenos utilizam enzimas altamente eficientes como as glutational peroxidases (Gpx), catalases (Cat) e peroxirredoxinas (Prx) (Broxton e Culotta, 2016; Jaeger e Flohé, 2006; Oliveira et al., 2021; Rocha et al., 2018; Soares et al., 2017; Staerck et al., 2017; Upadhyya et al., 2013). No entanto, as Prx merecem destaque, pois possuem distribuição ubíqua entre os organismos, múltiplas isoformas, grande variedade de substratos, elevada eficiência catalítica e abundância intracelular, aspectos estes que serão abordados a seguir.

### **1.2 Peroxirredoxinas: variedade de substratos, eficiência catalítica, abundância e classificação**

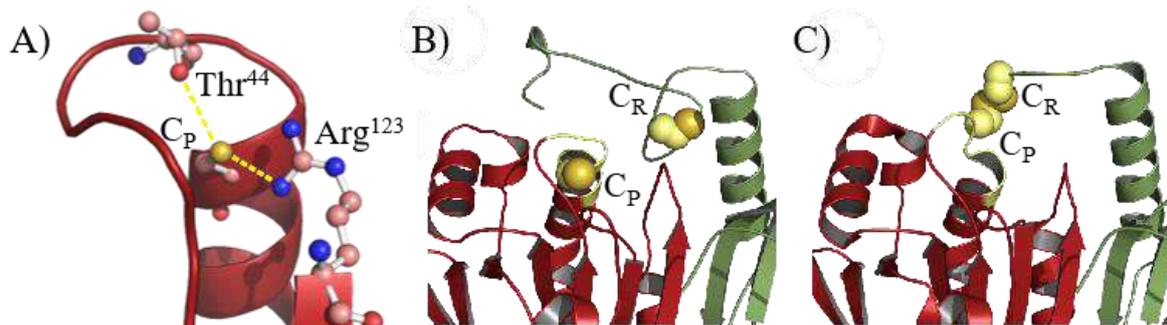
Em contraste com as Cat, que são aptas a decompor somente o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as Prx são capazes de reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxidos de lipídeos (Lp-OOH) e peroxinitrito (Bryk et al., 2000; Netto et al., 1996; Jacobson et al., 1989), com alta especificidade e eficiência ( $k = 10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Cox et al., 2009; Horta et al., 2010; Parsonage et al., 2005; Peskin et al., 2007; Truzzi et al., 2019). Em especial, os Lp-OOH possuem uma estrutura mais volumosa do que os outros hidroperóxidos citados e são acomodados na cavidade hidrofóbica do sítio ativo das Prx, sendo decompostos eficientemente pelas Prx (Baker et al., 2001; Longo et al., 2020; Reyes et al., 2011). Em eucariotos, estas enzimas são amplamente distribuídas nos compartimentos celulares, o que indica que desempenham importante função na homeostase celular. Como exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae* foram descritas cinco isoformas de Prx, distribuídas no núcleo (nTpx), mitocôndria (Prx1) e citosol (Tsa1, Tsa2 e Ahp1) (Park et al., 2000). A abundância das Prx também merece atenção, novamente como exemplo, Tsa1 é uma das proteínas mais expressas nesta levedura contando com aproximadamente 378.000 moléculas por célula, o que representa 0.7% de todas suas proteínas solúveis (Ghaemmaghami et al., 2003; Loberg et al., 2019).

Estas enzimas utilizam para a decomposição de hidroperóxidos, um resíduo de cisteína reativo, denominado de cisteína peroxidásica ( $C_P$ ) (Horta et al., 2010; Netto et al., 1996; Parsonage et al., 2005), o que as difere das Gpx ou Cat, as quais utilizam selenocisteína ou um grupamento prostético para a decomposição dos substratos. A maioria das Prx apresenta-se como homodímeros, porém, algumas apresentam somente a  $C_P$ , enquanto outras possuem um segundo resíduo apto a formar um dissulfeto com a  $C_P$  no decorrer do ciclo catalítico, denominado cisteína de resolução ( $C_R$ ) (Kang et al., 2005; Wood et al., 2003). Neste contexto, as Prx podem ser classificadas como 1-Cys, a qual utiliza somente  $C_P$  no ciclo catalítico ou 2-Cys, quando há a presença da  $C_R$ . Há, ainda, uma subdivisão quanto as 2-Cys em típicas e atípicas, quando o dissulfeto formado é intermolecular (entre as cisteínas dos diferentes monômeros do dímero) ou quando o dissulfeto formado é intramolecular (entre as cisteínas presentes na mesma cadeia polipeptídica), respectivamente (Chae et al., 1994; Oliveira et al., 2021; Rhee, 2016).

As Prx 2-Cys típicas representam a classe de Prx mais estudada e, normalmente, mais abundante na célula (Kang et al., 2017). Analisando as estruturas terciária e quaternária destas enzimas, pode-se observar que a  $C_P$  se encontra na porção terminal de uma  $\alpha$ -hélice, favorecendo sua desprotonação (tiolato,  $C_P-S^-$ ), estando próxima a um resíduo de Arg e um de treonina/serina (Thr/Ser), conservados universalmente entre as Prx já descritas até o momento (Tairum et al., 2016). Estes três resíduos de aminoácidos (AA) ( $C_P$ , Thr/Ser e Arg) são denominados de tríade catalítica (Fig. 2A) e todos apresentam grande importância na realização da catálise e manutenção de  $C_P$  em sua forma desprotonada (Flohé et al., 2011; Tairum et al., 2016). Durante o ciclo catalítico, a atividade peroxidásica das Prx se inicia com o ataque de  $C_P-S^-$  a um átomo de oxigênio de um hidroperóxido, resultando em uma clivagem heterolítica da ligação O-O, liberando uma molécula de água ( $H_2O$ ) no caso do  $H_2O_2$ , com uma oxidação simultânea de  $C_P-S$  à  $C_P-SOH$  (cisteína ácido sulfênico) (Dalla Tiezza et al., 2020; Ferrer-Sueta et al., 2011; Hall et al., 2010). Em seguida, ocorre uma condensação de  $C_P-SOH$  com  $C_R-SH$ , no caso das Prx 2-Cys, levando à formação de um dissulfeto ( $C_P-S-S-C_R$ ) e liberação de  $H_2O$  (West et al., 2018).

Em Prx 2-Cys típicas, a distância entre essas cisteínas é de  $\sim 10 \text{ \AA}$ , sendo necessário o desenovelamento parcial de uma  $\alpha$ -hélice para que seja formado o dissulfeto (Fig. 2B e 2C). Neste contexto, quando a  $C_P$  está reduzida, a  $\alpha$ -hélice se encontra enovelada em uma conformação denominada de *fully folded* (FF) e, após a reação com um hidroperóxido, ocorre o desenovelamento parcial da  $\alpha$ -hélice e formação de dissulfeto, em uma conformação denominada *locally unfolded* (LU) (Kriznik et al., 2020; Wood et al., 2003). Para que seja efetuado um novo ciclo catalítico, após oxidação de  $C_P$ , o dissulfeto formado necessita ser reduzido e esta função é normalmente

desempenhada pelo sistema Trx, composto pelas enzimas tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR), que utilizam elétrons provenientes do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a partir de uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A redução pelo sistema Trx restaura a atividade peroxidásica das Prx, tornando-as aptas a decomposição de uma nova molécula de hidroperóxido (Discola et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Jaeger e Flohé, 2006).



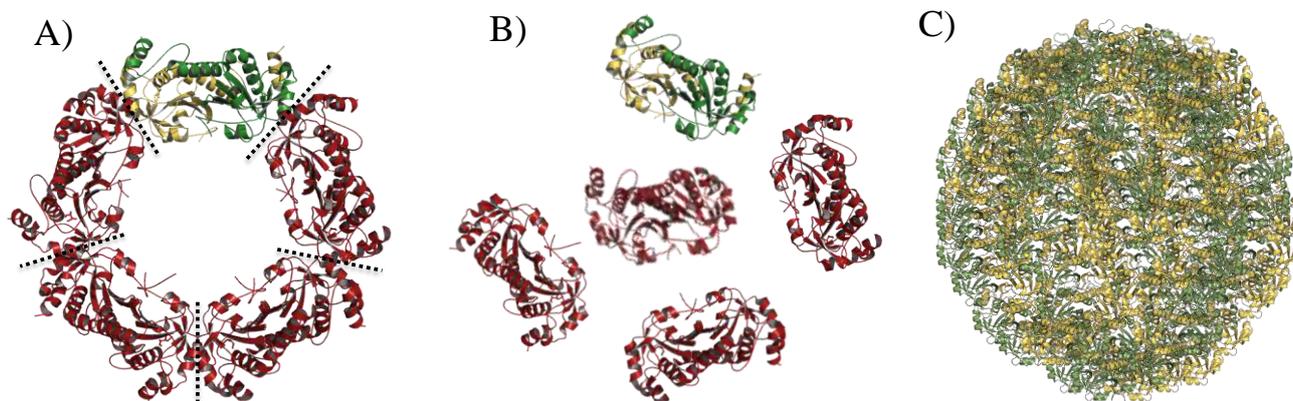
**Figura 2: Tríade catalítica e representação das alterações estruturais entre o estado reduzido (FF) e oxidado (LU).** A) Representação da tríade catalítica de Prx 2-Cys típicas composta pela  $C_P$ , Thr e Arg (Tsa1 de *S. cerevisiae*; PDB = 3SBC), onde a proteína está representada em *cartoon* (vermelho) e os resíduos de AA da tríade catalítica por *balls e sticks* e coloridos por CPK (C: rosa; O: vermelho, N: azul e S: amarelo escuro). As linhas amarelas tracejadas representam interações polares com Thr e Arg responsáveis por manter o  $S\gamma$  de  $C_P$  desprotonado em tiolato ( $S^-$ ). B) Representação do estado FF com as cisteínas reduzidas da proteína AhpC (*Salmonella typhimurium*: código PDB = 4MA9). C) Representação do estado LU com as cisteínas oxidadas em dissulfeto intermolecular (AhpC de *S. typhimurium*: PDB = 1YEP). Em B e C, o dímero está representado em *cartoon* com um monômero em vermelho e o outro em verde,  $C_P$  e  $C_R$  são representadas por esferas e coloridas da seguinte forma C: amarelo claro e S: amarelo escuro. As figuras foram geradas utilizando o programa PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

### 1.3 Transições da estrutura quaternária

Normalmente, as Prx 2-Cys típicas são consideradas como homodímeros ( $\alpha_2$ ), entretanto, diversos trabalhos demonstram que estas enzimas podem se apresentar, também, como decâmeros  $\alpha_2(5)$ , através da associação de cinco dímeros por meio da interação entre as interfaces diméricas (interface D) (Fig. 3A) (Parsonage et al., 2005; Tairum et al., 2016). Já foi demonstrado que as Prx 2-Cys típicas se encontram como decâmeros quando suas cisteínas estão reduzidas e aptas para decompor hidroperóxidos (Fig. 3A), ao passo que a formação do dissulfeto resulta na dissociação dos decâmeros em dímeros (Fig. 3B) (Nelson et al., 2018; Parsonage et al., 2005; Pastor-Flores et al., 2020; Tairum et al., 2016). Uma das possibilidades aventadas para esta associação seria de uma interação cooperativa entre os dímeros para aumentar a eficiência catalítica na decomposição de hidroperóxidos (Parsonage et al., 2005), entretanto, existem evidências que estas transições também podem estar envolvidas com a participação em vias de sinalização (Nelson et al., 2018; Stocker et al., 2018).

Determinadas condições podem alterar o grau oligomérico das Prx 2-Cys típicas, a exemplo de quando estas enzimas são submetidas ao estresse oxidativo, onde ocorre a hiperoxidação de  $C_P$ -

SOH à C<sub>P</sub>-SO<sub>2</sub>H (cisteína ácido sulfínico), em decorrência do ataque de uma segunda molécula de hidropéroxido antes da formação do dissulfeto. Neste estado, as Prx 2-Cys típicas são capazes de se associar em estruturas de alto peso molecular (*High Molecular Weight* - HMW) (Fig. 3C). Esta alteração da estrutura quaternária está relacionada ao *switch* de função peroxidase → chaperona molecular, a qual, além de proteger a agregação proteica ocasionada por estresse oxidativo, também está envolvida na transdução de sinal (Aran et al., 2011; Bolduc et al., 2018; Jang et al., 2004; Pastor-Flores et al., 2020; Saccoccia et al., 2012; Tairum et al., 2021; Truzzi et al., 2019). Cabe ressaltar que essa alteração estrutural só foi descrita para as Prx do grupo 2-Cys típicas.



**Figura 3: Diferentes estruturas quaternárias apresentadas por Prx 2-Cys típicas.** **A)** Estrutura de Prx 2-Cys típica em seu estado reduzido representado pela união de cinco dímeros formando a estrutura do decâmero. No dímerno superior um monômero está colorido em verde e outro em amarelo. O restante dos dímeros estão representados em vermelho e a interface D é evidenciada pela linha tracejada. **B)** Dímeros de Prx 2-Cys típica em seu estado oxidado. **C)** Estrutura esférica de complexos HMW de Prx 2-Cys típica hiperoxidada. Para as representações gráficas foi utilizada a coordenada cristalográfica de Tsa1 de *S. cerevisiae* (PDB = 3SBC). As imagens foram elaboradas com o auxílio do programa PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

#### 1.4 Fungos patogênicos e defesas antioxidantes

Nos últimos anos, grande atenção é dada às infecções de origem viral e bacteriana, colocando infecções fúngicas em segundo plano (Fisher et al., 2017; Houldcroft et al., 2017; Rodrigues & Nosanchuk, 2020). No entanto, estudos recentes demonstram que infecções causadas por fungos patogênicos possuem grande impacto e representam graves riscos para as mais diversas espécies de organismos, incluindo animais e plantas, e, portanto, para cultivos, ecossistemas e a própria biodiversidade (Doehlemann et al., 2017; Fisher et al., 2017; Góralaska et al., 2018; Kohler et al., 2017; von Lilienfeld-Toal et al., 2019). No que tange à saúde humana, infecções fúngicas de baixa gravidade atingem até 1.7 bilhões de pessoas anualmente, em todo o mundo (Brown et al., 2012). Entretanto, estima-se que infecções invasivas podem levar a morte de até um milhão e meio de pessoas por ano (Kim, 2016; Warris e Ballou, 2019). Estudos recentes relatam que a aspergilose pulmonar invasiva, comumente causada pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, está associada a uma das complicações de

pacientes com COVID-19, em estado grave, que necessitam de cuidados em unidades de terapia intensiva, podendo piorar o quadro destes pacientes e suas chances de sobrevivência, o que revela um grave problema de saúde pública (Arastehfar et al., 2020; Bartoletti et al., 2020; Ghazanfari et al., 2021).

Dentre os fungos patogênicos existem diversas leveduras, grupo que se apresenta predominantemente sob forma unicelular, que muitas vezes pertencem ao microbioma saudável, mas que em determinadas condições, se comportam como agentes infecciosos de diversas doenças de importância para saúde humana e animal (Mayer et al., 2013). De fato, mais de 90% das infecções fúngicas em humanos são causadas por leveduras do gênero *Candida* (Castanheira, 2013; Pfaller et al., 2010; Spivak et al., 2018; Turner e Butler, 2014) e já foi demonstrado que peroxidases são importantes para a infecção e o estabelecimento destes patógenos (Gutiérrez-Escobedo et al, 2020; Hromatka et al., 2005; Martchenko et al., 2004). A seguir, daremos ênfase ao papel das Prx 2-Cys típicas destes micro-organismos.

Em *Candida albicans*, a Prx CaTsa1 é altamente expressa no citosol, como ocorre em *S. cerevisiae*, mas, em contraste, também é presente na superfície celular e está envolvida com a resistência ao estresse oxidativo e com o crescimento de hifas (Urban et al., 2005). Foi demonstrado que a localização extracelular de Tsa1 também é comum a quatro espécies patogênicas de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*), revelando um mecanismo comum de proteção nestas leveduras (Ramírez-Quijas et al., 2015). Ainda, em *C. glabrata*, a diminuição da expressão de CgTsa1 leva à diminuição significativa da virulência em camundongos (Saijo et al., 2010) e já foi demonstrado que CgTsa1 e CgTsa2 são requeridas para sobrevivência dos patógenos em neutrófilos humanos e, também, que a expressão destas Prx é induzida nestas condições, indicando a importância das mesmas no processo de resistência às defesas do hospedeiro (Gutiérrez-Escobedo et al, 2020).

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* também representam leveduras patogênicas à mamíferos e são agentes etiológicos de doenças como, por exemplo, formas de pneumonia frequentemente fatal (criptococose), meningite basal e lesões cerebrais denominadas de criptococoma (Chen et al., 2014; Springer et al., 2014). Em *C. neoformans*, CnTsa1 é induzida sob estresse oxidativo, sendo essencial para a resistência ao estresse gerado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que linhagens de *C. neoformans*  $\Delta$ cnts1 possuem sua virulência diminuída (Missall et al., 2004; Upadhyya et al., 2013). Cabe ressaltar que a deleção do sistema redutor de CnTsa1 também interfere na virulência em cultura de macrófagos, indicando indiretamente a importância da Prx para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (Missall e Lodge, 2005), o que está de acordo com dados recentes que indicam que

CnTsa1 é capaz de elevar a expressão de seu próprio sistema redutor, aumentando a resistência ao estresse oxidativo promovido pelo hospedeiro (Leipheimer et al., 2020).

Dentre os patógenos emergentes, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* é amplamente distribuída nos mais diversos ambientes terrestres e está relacionada a infecções como fungemia, peritonite, endocardite e meningite em indivíduos imunocomprometidos, sendo isolada, inclusive, de pacientes com câncer (Cabral et al., 2017; Troska et al., 2017). Até o presente momento, não foi demonstrado o envolvimento de ERNs ou EROs na resposta à infecção por *R. mucilaginosa*, entretanto, em um trabalho envolvendo transcriptoma sob estresse nutricional, realizado em nosso laboratório, identificamos um gene altamente expresso com grande homologia com Tsa1 de *S. cerevisiae* (85% de identidade).

*S. cerevisiae* é outra levedura que merece destaque como patógeno emergente e oportunista (Maleb et al., 2017). Também conhecida como levedura do pão, cerveja e vinho, é amplamente distribuída na natureza e largamente utilizada na indústria de panificação, bebidas alcóolicas, biocombustíveis e biotecnologia (Llanos et al., 2006; Parapouli et al., 2020). Esta levedura também é um modelo de estudos genéticos e bioquímicos em eucariotos, em razão da facilidade de sua manipulação, capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono para o crescimento de suas células e similaridades bioquímicas e genéticas com células de mamíferos (Nielsen, 2019). Em razão destas características, cinco prêmios Nobel no século XX foram concedidos a pesquisadores que a utilizaram como organismo modelo (três em fisiologia/medicina e dois em química) (Hohmann, 2016).

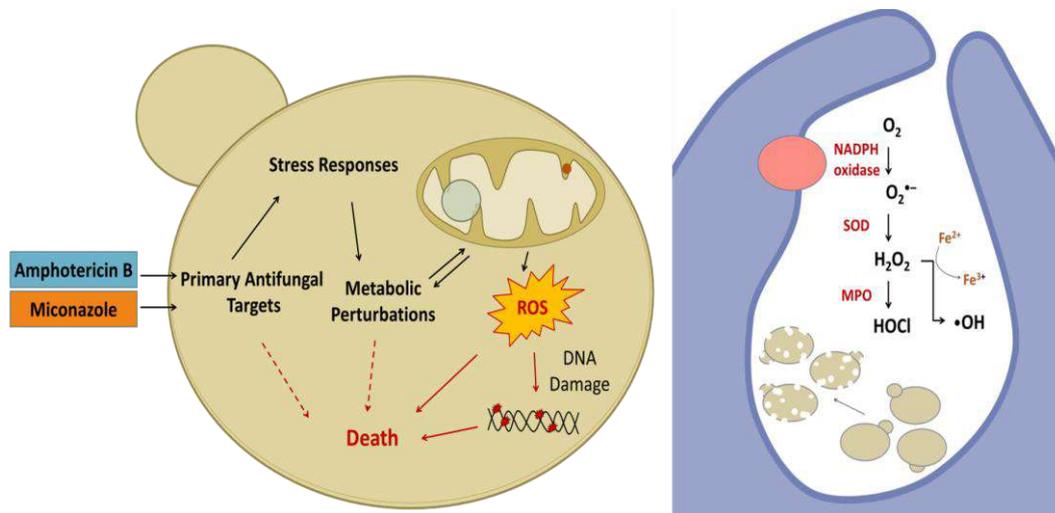
Em diversos organismos, incluindo humanos, *S. cerevisiae* é encontrada na microbiota saudável dos tratos gastrointestinal e respiratório e nas mucosas (Muñoz et al., 2005; Popiel et al., 2015; Salonen et al., 2000). No entanto, nas últimas décadas, as infecções fúngicas invasivas causadas por esta levedura em humanos, normalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumentaram significativamente, incluindo linhagens resistentes aos fármacos (Davies et al., 2019; Enache-Angoulvant e Hennequin, 2005; Johnson et al., 2008; Moraes et al., 2020; Parapouli et al., 2020; Richardson e Lass-Flörl, 2008; Tiballi et al., 1995). As condições clínicas ocasionadas por esta levedura podem variar de infecções superficiais simples a infecções sistêmicas, onde a manifestação mais importante é a fungemia, que se caracteriza pela presença de fungos na corrente sanguínea, pois geralmente é a mais grave (Belet et al., 2005; Muñoz et al., 2005; Souza et al., 2013).

*S. cerevisiae* possui patogenicidade inerentemente baixa, com capacidade limitada de aderir ou romper a barreira intestinal, o que sugere que o dano local é um requisito para ocorrência de infecções sistêmicas (Davies et al., 2020; Popiel et al., 2015). Alguns fatores de risco descritos para

infecção são a imunossupressão, o uso de dispositivos intravasculares, tratamento com antibióticos de amplo espectro, cirurgias abdominais e transplantes (Belet et al., 2005; Enache-Angoulvant e Hennequin, 2005; Hamoud et al., 2011; Olver et al., 2012; Pillai et al., 2014; Popiel et al., 2015; Smith et al., 2002; Souza et al., 2013). Muñoz e colaboradores em 2005 relataram uma taxa de mortalidade de 28% em pacientes imunocomprometidos com contato direto ou indireto com probióticos a base de *S. cerevisiae*. Novamente, a importância de enzimas antioxidantes em resposta às defesas do hospedeiro também foi evidenciada em trabalho envolvendo transcriptoma de linhagens virulentas de *S. cerevisiae* quando incubadas com sangue humano, onde os resultados revelam um grande aumento da expressão de diversos genes de enzimas antioxidantes, incluindo Tsa1 e enzimas de seu sistema redutor (Llopis et al., 2012).

**1.5 Fármacos fungicidas levam à formação de EROs**

Estudos recentes têm apontado que fármacos antifúngicos utilizados no tratamento de infecções induzem danos oxidativos que resultam na morte dos patógenos (Belenky et al., 2013; Jee et al., 2016; Kohanski et al., 2008; Kohanski et al., 2010; Nyerges et al., 2018). De fato, fármacos amplamente utilizados em protocolos terapêuticos para o combate aos fungos patogênicos, como a anfotericina B (AMB) e azoles (AZL), que impedem a biossíntese de ergosterol e o crescimento celular, também induzem danos oxidativos (Ostrosky-Zeichner et al., 2010). Belenky e colaboradores demonstraram que o tratamento com AMB ou miconazol (MCZ) eleva os níveis intracelulares de EROs, o que está fortemente relacionado com a morte celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae* (Fig. 4A), corroborando com o estresse oxidativo gerado por fagócitos (Fig. 4B). Os autores demonstraram também que a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de acentuar a morte celular (Ostrosky-Zeichner et al., 2010).



**Figura 4: Modo de ação dos antifúngicos comumente usados contra infecções invasivas e sistêmicas e explosão oxidativa em fagócitos. A)** A AMB e o MCZ são capazes de causar distúrbios metabólicos que geram o acúmulo de

EROs, que têm múltiplos efeitos tóxicos nas células fúngicas. **B)** Explosão respiratória gerada em fagócitos como mecanismo de defesa na eliminação de patógenos, onde na presença de íons de ferro, o HO<sup>•</sup> pode ser formado através da reação de Fenton e/ou de Haber-Weiss.

Posteriormente, foi demonstrado que a estimulação do aumento intracelular de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, utilizando linhagens cujo os genes *sod* foram deletados ou através da inibição da enzima Sod por N-N'-dietilditiocarbamato, eleva significativamente a morte celular de *C. albicans* em reposta ao tratamento com AMB (De Cremer et al., 2016). Análises transcriptômicas demonstraram que o tratamento de *S. cerevisiae* com AMB leva à redução da expressão de genes de enzimas relacionadas à assimilação de enxofre e enzimas de combate ao estresse oxidativo, como a Tsa1 (Pang et al., 2017). Além disso, a deleção do gene AHP1 de *C. albicans* diminuiu significativamente a resistência dessa levedura a AMB (Truong et al., 2016) e, em fungos fitopatogênicos como o *Alternaria alternata*, a mutação *Δtsa1* gerou uma maior sensibilidade aos fungicidas utilizados, indicando que a capacidade de resistência ao estresse oxidativo corrobora para a virulência desse fungo (Ma et al., 2018).

De forma geral, os resultados apontam a necessidade de enzimas capazes de decompor O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que são importantes para evitar a formação de espécies radicalares como HO<sup>•</sup>, através de reações químicas como as de Fenton e Harber Weiss (Fig. 1). Neste contexto, o bloqueio de enzimas antioxidantes por agentes químicos é capaz de acentuar a morte celular dos patógenos quando submetidos à estresse oxidativo ou tratamento com antibióticos e, a utilização de inibidores destas enzimas antioxidantes é uma abordagem que tem sua importância cada vez mais reconhecida (Birben et al., 2012; Edlich e Lyr, 1992; Shekhova et al., 2017). No entanto, os hospedeiros, incluindo os humanos, possuem enzimas extremamente semelhantes às dos patógenos e os inibidores acabam sendo tóxicos também para as células dos hospedeiros (Benov e Fridovich, 1994; Brennan et al., 2015; Mishra e Imlay, 2012; Roberts e Hirst, 1996; Sugadev et al., 2011). Neste cenário, um importante alvo seriam as Prx 2-Cys típicas, uma vez que a identidade entre as Prx 2-Cys típicas de leveduras patogênicas e humanos é < 60%, possuindo diferenças, inclusive, de AA envolvidos na ligação com substratos. Acreditamos que pequenas diferenças estruturais podem levar a diferenças importantes na interação enzima-ligante, tópico este que será abordado a seguir.

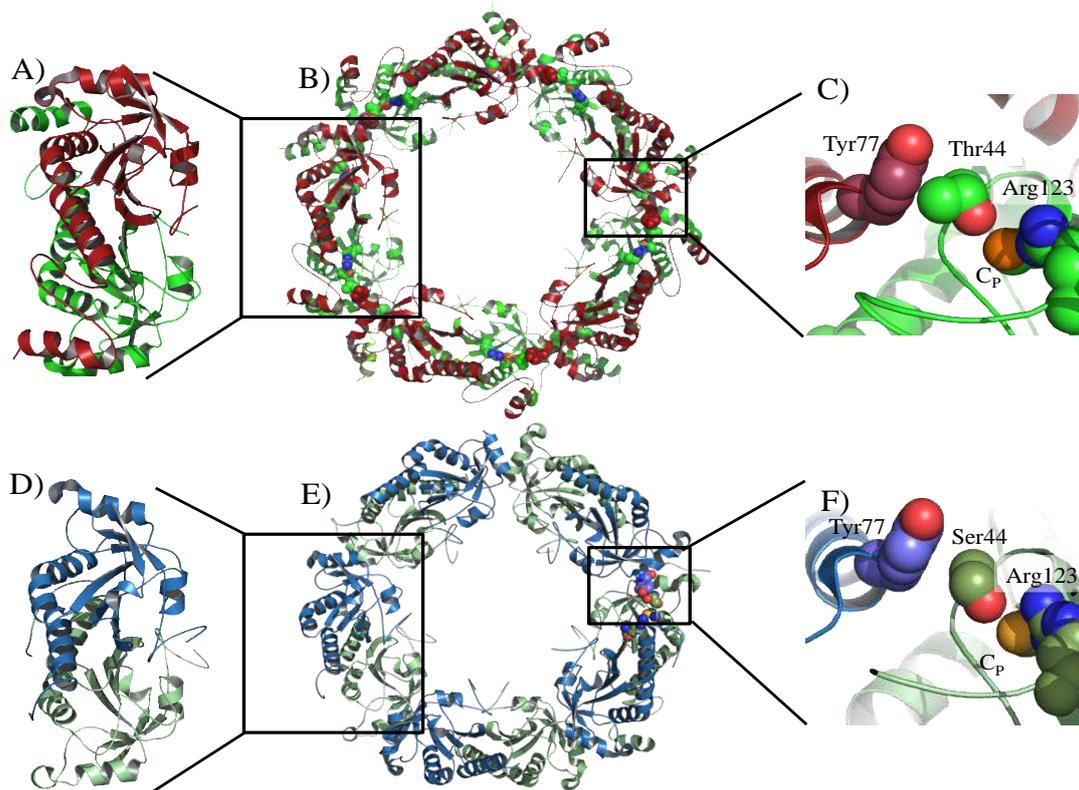
### **1.6 Similaridade e identidade de Prx 2-Cys típicas não correspondem a redundância funcional**

*S. cerevisiae* possui duas isoformas citosólicas de Prx 2-Cys típicas, denominadas Tsa1 e Tsa2, que compartilham em sua estrutura primária 86% de identidade e 96% de similaridade. Devido à esta característica, alguns autores sugerem que elas possuem funções redundantes (Chae et al., 1993; Ross et al., 2000). Ainda que apresentem alta similaridade e identidade, existem diferenças

significativas como abundância (Tsa1 ~378.000; Tsa2 ~4.800 cópias por célula) (Ghaemmaghami et al., 2003), padrão de expressão (Tsa1 = constitutiva; Tsa2 = induzível) (Kim et al., 1988; Munhoz e Netto, 2004) e  $pK_a$  da  $C_P$  (Tsa1 = 5.4; Tsa2 = 6.3) (Ogusucu et al., 2007). No caso do  $pK_a$ , cabe ressaltar que isto significa que Tsa1 possui uma reatividade sobre hidroperóxidos ~10× superior à de Tsa2. Outra diferença fundamental, que existe entre as duas proteínas, é que em Tsa1 existe uma Thr como parte da tríade catalítica, a qual é naturalmente substituída por Ser em Tsa2 (Tairum et al., 2016; Tairum et al., 2021). Entretanto, este fato sempre foi negligenciado pois ambos AA possuem um  $O_\gamma$  que pode estabilizar o tiolato de  $C_P$ .

No entanto, demonstramos que a substituição natural de Thr por Ser em Tsa1 e Tsa2 é capaz de afetar as transições estruturais destas enzimas, uma vez que a enzima que possui naturalmente a Thr (Tsa1) transita entre decâmeros (reduzida) e dímeros (oxidada), enquanto que Tsa2, a qual possui naturalmente Ser como parte da tríade catalítica, se apresenta constitutivamente decamérica. Cabe ressaltar que substituições recíprocas (Thr→Ser ou Ser→Thr) revertem as características oligoméricas das mesmas (Tairum et al., 2016). Análises estruturais e moleculares nos levaram a postular que uma vez que Thr se encontra intimamente associada a interface D, efetuando uma interação do tipo CH-- $\pi$  com o resíduo de Tyr<sup>77</sup> do dímero adjacente (Fig. 5C), a transição FF para LU leva a ruptura das interações entre as interfaces D, levando à dissociação do decâmero. Por sua vez, a presença de uma Ser como parte da tríade catalítica, em Tsa2, não é capaz de efetuar esta interação (Fig. 5F), o que permitiria a transição FF→LU sem a dissociação do decâmero (Tairum et al., 2016). Posteriormente, foi demonstrado que a substituição Thr→Ser também exerce o mesmo efeito em transições estruturais de Prx 2-Cys típicas de bactérias (Nelson et al., 2018). Em acordo com nossas observações, a determinação da estrutura de Tsa2 revelou que a Ser possui maior liberdade de movimento apresentando diferentes rotâmeros (Nielsen et al., 2016), interferindo na desprotonação de  $C_P$  e influenciando nas diferenças de  $pK_a$  observados entre Tsa1 e Tsa2.

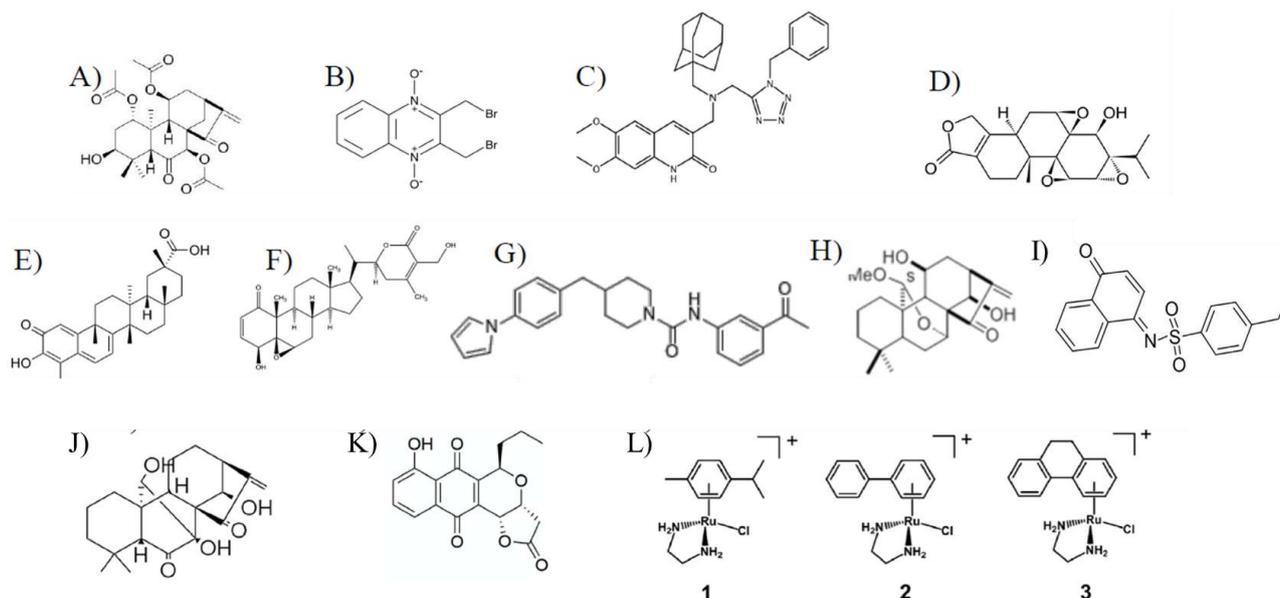
Recentemente demonstramos que essa substituição é capaz de conferir elevada resistência/suscetibilidade à hiperoxidação de  $C_P$  e afinidade por substratos ( $H_2O_2$  e peróxido de cumeno - CHP) (Tairum et al., 2021). Curiosamente, esta característica não aparenta ser conservada em mamíferos, uma vez que não são encontradas enzimas contendo Ser na tríade catalítica. Estes resultados demonstram que diferenças estruturais aparentemente sutis podem levar a contrastes funcionais entre as Prx 2-Cys típicas.



**Figura 5: Interações Tsa1 e Tsa2 na interface D.** A) Homodímero Tsa1 representado em *cartoon* com um monômero colorido em verde e o adjacente em vermelho (PDB = 3SBC). B) Decâmero de Tsa1. C) Interação entre Thr<sup>44</sup> e Tyr<sup>77</sup> na interface D do decâmero de Tsa1. Neste caso, é efetuada uma ligação CH- $\pi$  entre os átomos de carbono dos AA. D) Homodímero Tsa2 representado em *cartoon* com um monômero colorido em verde e o adjacente em azul (PDB = 5DVB). E) Decâmero de Tsa2. F) Interface D do decâmero, onde não ocorrem interações moleculares entre Ser<sup>44</sup> e Tyr<sup>77</sup>. Os átomos representados por esferas foram coloridos como segue: O = vermelho, N = azul e S = laranja, os átomos de carbono seguem a mesma tonalidade da cadeia adjacente. As representações gráficas foram geradas utilizando o programa PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

### 1.7 Inibidores de Prx e potenciais moléculas inibitórias oriundas da biota costeira brasileira

Em humanos, a expressão aumentada das Prx 2-Cys típicas citosólicas, Prx1 e Prx2, está relacionada com doenças genéticas como, por exemplo, o câncer (Hou et al., 2014; Lee et al., 2019; Liu et al., 2013; Shi et al., 2017) e a busca por inibidores para estas proteínas desperta interesse crescente (Brindisi et al., 2015; Haraldsen et al., 2009; Liu et al., 2013; Shi et al., 2017; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2015). Até o presente momento, doze moléculas capazes de inibir as Prx 2-Cys típicas foram descritas: adenantina (Adn), conoidina A, N-N-dissubstituído 3-aminometil quinolona, triptolide, celastrol, withaferina A, AMRI-59, H7, JDA-202, frenolicina B, parvifolina AA (PAA) e um rutênio organometálico (Fig. 6) (Brindisi et al., 2015; Haraldsen et al., 2009; Lin et al., 2019; Liu et al., 2012; Shi et al., 2017; Wei et al., 2016; Yang et al., 2016; Ye et al., 2019; Zhu et al., 2019). Dentre eles, o JDA-202 e a Adn são diterpenóides pertencentes à classe dos *ent*-caurânicos, mas somente a Adn está disponível comercialmente.



**Figura 6: Estruturas químicas de inibidores de Prx2 2-Cys típicas.** Adn (A), Conoidina A (B), N,N-disubstituído 3-aminometil quinolona (C), Triptolide (D), Celastrol (E), Withaferina A (F), AMRI-59 (G), JDA-202 (H), H7 (I), PAA (J), Frenolicina B (K) e rutênio organometalico (L3).

Resultados promissores revelam que o tratamento com Adn, diterpenóide natural isolado de *Isodon adenanthus*, *in vitro* em células tumorais de leucemia mielóide aguda, é capaz de induzir a diferenciação de células neoplásicas em células mielóides pela via de  $H_2O_2$ -ERK1/2-C/EBP $\beta$ , ou mesmo promover a apoptose das células tumorais (Liu et al., 2012). Estudos posteriores *in vitro*, demonstraram que a utilização da Adn é capaz de promover apoptose de hepatocarcinomas, e sua administração *in vivo* em camundongos contendo xenoenxertos de hepatocarcinomas humanos leva a regressão tumoral, com reduzidos efeitos colaterais (Hou et al., 2014). Mais recentemente, foi demonstrado que Adn é capaz de atuar sobre células tumorais pulmonares, causando apoptose e/ou promovendo a diferenciação de células leucêmicas (Hu et al., 2019; Mo et al., 2019), e, também, promove efetivamente a morte de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda precursora de células B (Fidy et al., 2019).

O composto JDA-202, diterpenóide natural isolado de *Isodon rubescens*, possui forte atividade antiproliferativa em linhagens tumorais de células de esôfago (Shi et al., 2017), inibindo a atividade de Prx1 *in vitro* e induzindo significativamente a morte celular. Adicionalmente, os pesquisadores demonstraram que JDA-202 inibiu consideravelmente o crescimento de xenoenxerto (38.3%) de tumor na linhagem em camundongos, sem a perda significativa de massa corporal e toxicidades aos órgãos no final do tratamento com JDA-202 (Shi et al., 2017). Foi demonstrado que tanto JDA-202 quanto Adn se ligam as cisteínas de Prx 2-Cys típicas, atuando como aceptores de Michael em uma reação de adição entre um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado da Adn e o  $S\gamma$  das

cisteínas de Prx1 e Prx2, impedindo a formação do dissulfeto intermolecular (Liu et al., 2012; Liu et al., 2013; Shi et al., 2017; Soethoudt et al., 2014). É importante ressaltar que a Prx1 e Prx2 de humanos (e de mamíferos de forma geral) são altamente semelhantes, apresentando 91% de similaridade e 78% identidade. No entanto, ocorre a inibição diferencial de Prx1 e Prx2, tanto por JDA-202, quanto Adn. Ainda, os resultados obtidos revelam que o IC<sub>50</sub> do composto JDA-202, possui uma afinidade ~10× mais acentuada para Prx1, quando comparado com Prx2 ( $5.3 \pm 0.7$  e  $49.2 \pm 1.7$  μM, respectivamente), similar ao determinado para Adn (1.5 e 15 μM, respectivamente) (Liu et al., 2012; Shi et al., 2017).

Recentemente, outro composto natural pertencente à classe dos *ent*-caurânos foi relatado como inibidor de Prx1/Prx2 de humanos, a PAA, diterpenóide também isolado de *Isodon rubescens* (Zhu et al., 2019). Foi demonstrado que a PAA ao inibir a atividade de Prx1 e Prx2 se ligando covalentemente à cisteína, ativa a via ROS/ERK e aumenta a lise tumoral mediada por células *Natural Killer* (NK), por regulação positiva dos ligantes NKG2D em células de carcinoma hepatocelular. É importante ressaltar que os ensaios foram realizados *in vivo* e não foram observados níveis aumentados de NKG2D em células saudáveis do fígado, indicando uma especificidade de PAA com as células tumorais. Além disso, também foi investigada a ação da Adn na regulação da expressão dos ligantes NKG2D em células de hepatocarcinoma celular e os resultados demonstraram efeitos semelhantes a PAA, sugerindo um papel importante da classe dos *ent*-caurânos na regulação da resposta imune mediada por células NK (Zhu et al., 2019).

Apesar de inibidores terem sido identificados para Prx 2-Cys típicas de humanos, nenhum deles havia sido utilizado para avaliar a inibição sobre enzimas de leveduras. Neste contexto, durante o mestrado de Melina C. Santos (pesquisadora de nosso grupo), foi investigada a possibilidade de Adn inibir diferencialmente Tsa1, que possui Thr como parte da tríade catalítica, e Tsa2, que possui Ser. Os resultados demonstraram que Tsa2 sofre inibição significativamente maior quando comparada com Tsa1 e, ao utilizar o mutante Tsa1<sup>T44S</sup>, para avaliar se a substituição Thr→Ser estava envolvida nestas diferenças, os resultados revelaram que a enzima se tornou muito mais suscetível à inibição por Adn.

É importante ressaltar que estudos envolvendo a inibição de Prx 2-Cys típicas de leveduras não estão disponíveis na literatura e, estudos comparativos avaliando a inibição de enzimas de levedura e humanos ainda não foram efetuados. De fato, existe a possibilidade que uma mesma molécula identificada para a remissão de tumores (e.g. Adn), possa apresentar propriedades inibitórias mais acentuadas para Prx 2-Cys típicas de outros organismos (e.g. patógenos), devido a peculiaridades estruturais das proteínas, o que tornaria sua utilização possível para outras finalidades

terapêuticas. Além disso, a identificação de potenciais moléculas inibitórias oriundas da biota florística brasileira valoriza a nossa biodiversidade.

## REFERÊNCIAS

- Aksam, E.B.; Jungwirth, H.; Kohlwein, S.D.; Ring, J.; Madeo, F.; Veenhuis, M. & van der Klei, I.J. 2008. Absence of the peroxiredoxin Pmp20 causes peroxisomal protein leakage and necrotic cell death. *Free Radical Biology and Medicine.*, 45(8): 1115-1124.
- Alegria, T.G.; Meireles, D.A.; Cussiol, J.R.; Hugo, M.; Trujillo, M.; de Oliveira, M.A. & Radi, R. 2017. Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 114(2): E132-E141.
- Aran, M.; Ferrero, D.; Wolosiuk, A.; Mora-García, S. & Wolosiuk, R.A. 2011. ATP and Mg<sup>2+</sup> promote the reversible oligomerization and aggregation of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of Biological Chemistry.*, 286(26): 23441-23451.
- Arastehfar, A.; Carvalho, A.; van de Veerdonk, F.L.; Jenks, J.D.; Koehler, P.; Krause, R.; & Hoenigl, M. 2020. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA)—from immunology to treatment. *Journal of Fungi*, 6(2), 91.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology., 1998.
- Baker, L.M.; Raudonikiene, A.; Hoffman, P.S. & Poole, L.B. 2001. Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. *Journal of bacteriology.*, 183(6): 1961–1973.
- Bartoletti, M.; Pascale, R.; Cricca, M.; Rinaldi, M.; Maccaro, A.; Bussini, L. & Viale, P. 2020. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among COVID-19 intubated patients: a prospective study. *Clinical Infectious Diseases.*
- Bayer, S.B.; Low, F.M.; Hampton, M.B. & Winterbourn, C.C. 2016. Interactions between peroxiredoxin 2, hemichrome and the erythrocyte membrane. *Free radical research.*, 50(12): 1329-1339.
- Belenky, P.; Camacho, D. & Collins, J.J. 2013. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell reports.*, 3(2): 350-358.
- Belet, N.; Dalgç, N.; Öncel, S.; Ciftçi, E.; Ince, E.; Güriz, H. & Dogru, Ü. 2005. Catheter-related fungemia caused by *Saccharomyces cerevisiae* in a newborn. *The Pediatric infectious disease journal.*, 24(12): 1125.
- Benov, L.T. & Fridovich, I. 1994. *Escherichia coli* expresses a copper-and zinc-containing superoxide dismutase. *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. *World Allergy Organization Journal.*, 5(1): 9-19.
- Bolduc, J.A.; Nelson, K.J.; Haynes, A.C.; Lee, J.; Reisz, J.A.; Graff, A.H. & Lowther, W.T. 2018. Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry.*, 293(30), 11901-11912.
- 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(1): 99.
- Brindisi, M.; Brogi, S.; Relitti, N.; Vallone, A.; Butini, S.; Gemma, S. & Fiorillo, A. 2015. Structure-based discovery of the first non-covalent inhibitors of *Leishmania major* trypanothione peroxidase by high throughput docking. *Scientific reports.*, 5(1): 1-10.
- Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N.A.; Levitz, S.M.; Netea, M.G. & White, T.C. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine.*, 4(165): 165rv13-165rv13.

- Broxton, C.N. & Culotta, V.C. 2016. SOD enzymes and microbial pathogens: surviving the oxidative storm of infection. *PLoS pathogens.*, 12(1).
- Bryk, R.; Griffin, P. & Nathan, C. 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature.*, 407(6801): 211-215.
- Cabral, A.M.; da Siveira Rioja, S.; Brito-Santos, F.; da Silva, J.R.P.; MacDowell, M.L.; Melhem, M.S. & Damasco, P.V. 2017. Endocarditis due to *Rhodotorula mucilaginosa* in a kidney transplanted patient: case report and review of medical literature. *JMM case reports.*, 4(11).
- Calcerrada, P.; Peluffo, G. & Radi, R. 2011. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current pharmaceutical design.*, 17(35): 3905-3932.
- Castanheira, M.; Woosley, L.N.; Diekema, D.J.; Jones, R.N. & Pfaller, M.A. 2013. *Candida guilliermondii* and other species of *Candida* misidentified as *Candida famata*: assessment by Vitek 2, DNA sequencing analysis, and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in two global antifungal surveillance programs. *Journal of clinical microbiology.*, 51(1): 117-124.
- Chae, H.Z.; Kim, I.H.; Kim, K. & Rhee, S.G. 1993. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry.*, 268(22): 16815-16821.
- Chae, H.Z.; Uhm, T.B. & Rhee, S.G. 1994. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 91(15): 7022-7026.
- Chang, T.K. & Abbott, F.S. 2006. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews.*, 38(4): 627-639.
- Chen, S.C.A.; Meyer, W. & Sorrell, T.C. 2014. *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical microbiology reviews.*, 27(4): 980-1024.
- Costa, I.M.; Schultz, L.; Pedra, B.D.A.B.; Leite, M.S.M.; Farsky, S.H.; De Oliveira, M.A. & Monteiro, G. 2016. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. *Scientific reports.*, 6(1): 1-11.
- Cox, A.G.; Peskin, A.V.; Paton, L.N.; Winterbourn, C.C. & Hampton, M.B. 2009. Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. *Biochemistry.*, 48(27), 6495-6501.
- Dalla Tiezza, M.; Bickelhaupt, F.M.; Flohé, L.; Maiorino, M.; Ursini, F. & Orian, L. 2020. A dual attack on the peroxide bond. The common principle of peroxidatic cysteine or selenocysteine residues. *Redox biology.*, 101540.
- Davies, E.; Shipp, A.; Hawkes, R. & Wynn, R.F. 2020. Successful management of hepatosplenic infection due to *Saccharomyces cerevisiae* in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology.*, 42(2), e117-e120.
- De Cremer, K.; De Brucker, K.; Staes, I.; Peeters, A.; Van den Driessche, F.; Coenye, T. & Thevissen, K. 2016. Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. *Scientific reports.*, 6, 27463.
- Discola, K.F.; Oliveira, M.A.; Silva, G.M.; Barcena, J.A.; Porras, P.; Padilla, A.; Netto, L.E.; Guimarães, B.G.; 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.* 2005 61(Pt 4):445-7.

- Doehlemann, G.; Ökmen, B.; Zhu, W. & Sharon, A. 2017. Plant pathogenic fungi. *The fungal kingdom.*, 701-726.
- Edlich, W. & Lyr, H. 1992. Target sites of fungicides with primary effects on lipid peroxidation. Boca Raton, FL: CRC Press Inc. 53-68p.
- Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G. & Cowtan, K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.*, 66(4), 486-501.
- Enache-Angoulvant, A. & Hennequin, C. 2005. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clinical Infectious Diseases.*, 41(11): 1559-1568.
- Ferrer-Sueta, G.; Manta, B.; Botti, H.; Radi, R.; Trujillo, M. & Denicola, A. 2011. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chemical research in toxicology.*, 24(4): 434-450.
- Fidy, K.; Pastorczak, A.; Goral, A.; Szczygiel, K.; Fendler, W.; Muchowicz, A. & Jansen, E. 2019. Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular oncology.*, 13(5): 1180-1195.
- Fisher, R.A.; Gollan, B. & Helaine, S. 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology.*, 15(8): 453.
- Flohé, L.; Toppo, S.; Cozza, G. & Ursini, F. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling.*, 15(3): 763-780.
- 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.
- Ghaemmaghami, S.; Huh, W.K.; Bower, K.; Howson, R.W.; Belle, A.; Dephoure, N. & Weissman, J.S. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.*, 425(6959): 737-741.
- Ghazanfari, M.; Arastehfar, A.; Davoodi, L.; Charati, J.Y.; Moazeni, M.; Abastabar, M. & Hedayati, M.T. 2021. Pervasive but Neglected: A Perspective on COVID-19-Associated Pulmonary Mold Infections Among Mechanically Ventilated COVID-19 Patients. *Frontiers in medicine*, 8.
- Góral, K.; Blaszkowska, J. & Dzikowiec, M. 2018. Neuroinfections caused by fungi. *Infection.*, 46(4): 443-459.
- Gorin, G.; Martic, P.A. & Doughty, G. 1966. Kinetics of the reaction of N-ethylmaleimide with cysteine and some congeners. *Archives of biochemistry and biophysics.*, 115(3): 593-597.
- Hall, A.; Parsonage, D.; Poole, L.B. & Karplus, P.A. 2010. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *Journal of molecular biology.*, 402(1): 194-209.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. USA: Oxford University Press. 5ª Edição, 823p.
- Hansen, R. E. & Winther, J. R. 2009. An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Analytical biochemistry.*, 394(2): 147-58.
- Hamoud, S.; Keidar, Z. & Hayek, T. 2011. Recurrent *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an otherwise healthy patient. *The Israel Medical Association journal: IMAJ.*, 13(9): 575.
- Haraldsen, J.D.; Liu, G.; Botting, C.H.; Walton, J.G.; Storm, J.; Phalen, T.J. & Westwood, N.J. 2009. Identification of conoidin A as a covalent inhibitor of peroxiredoxin II. *Organic & biomolecular chemistry.*, 7(15): 3040-3048.
- Hohmann, S. 2016. Nobel yeast research. *FEMS yeast research.*, 16(8).

- Horta, B.B.; de Oliveira, M.A.; Discola, K.F.; Cussioli, J.R.R. & Netto, L.E.S. 2010. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Q $\beta$  from *Xylella fastidiosa* catalytic mechanism and high reactivity. *Journal of Biological Chemistry.*, 285(21): 16051-16065.
- Hou, J.K.; Huang, Y.; He, W.; Yan, Z.W.; Fan, L.; Liu, M.H. & Chen, G.Q. 2014. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell death & disease.*, 5(9): e1400-e1400.
- Houldcroft, C.J.; Beale, M.A. & Breuer, J. 2017. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology.*, 15(3): 183.
- Hromatka, B.S.; Noble, S.M. & Johnson, A.D. 2005. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Molecular biology of the cell.*, 16(10): 4814-4826.
- Hu, A.; Li, J.; Fang, Y. & Li, W. 2019. Adenanthin induces G2/M arrest and apoptosis in human non-small-cell lung cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.*, 12(3): 2354-2363.
- Huynh, K. & Partch, C.L. 2015. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Current protocols in protein science.*, 79(1): 28-9.
- 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. *Journal of Biological Chemistry.*, 264(3): 1488-1496.
- Jaeger, T. & Flohé, L. 2006. The thiol-based redox networks of pathogens: Unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors.*, 27(1-4): 109-120.
- Jang, H.H.; Lee, K.O.; Chi, Y.H.; Jung, B.G.; Park, S.K.; Park, J.H. & Choi, Y.O. 2004. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.*, 117(5): 625-635.
- 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(7609): 693-696.
- Johnson, E.; Espinel-Ingroff, A.; Szekely, A.; Hockey, H. & Troke, P. 2008. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *International journal of antimicrobial agents.*, 32(6): 511-514.
- Kaihami, G.H.; de Almeida, J.R.F.; dos Santos, S.S.; Netto, L.E.S.; de Almeida, S.R. & Baldini, R.L. 2014. Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS pathogens.*, 10(10).
- 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): 1-10.
- Kang, D.H.; Lee, D.J.; Lee, S.; Lee, S.Y.; Jun, Y.; Kim, Y. & Jho, E.H. 2017. Interaction of tankyrase and peroxiredoxin II is indispensable for the survival of colorectal cancer cells. *Nature communications.*, 8(1): 1-15.
- Kang, S.W.; Rhee, S.G.; Chang, T.S.; Jeong, W. & Choi, M.H. 2005. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in molecular medicine.*, 11(12): 571-578.
- Kim, J.Y. 2016. Human fungal pathogens: why should we learn?. *Journal of Microbiology.*, 54: 145-8.

- 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)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *Journal of Biological Chemistry.*, 263(10): 4704-4711.
- Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J. & Collins, J.J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology.*, 8(6): 423-435.
- Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Wierzbowski, J.; Cottarel, G. & Collins, J.J. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell.*, 135(4): 679-690.
- Köhler, J.R.; Hube, B.; Puccia, R.; Casadevall, A. & Perfect, J.R. 2017. Fungi that infect humans. *The fungal kingdom.*, 811-843.
- Kriznik, A.; Libiad, M.; Le Cordier, H.; Boukhenouna, S.; Toledano, M.B. & Rahuel-Clermont, S. 2020. Dynamics of a key conformational transition in the mechanism of peroxiredoxin sulfinylation. *ACS Catalysis.*, 10(5): 3326-3339.
- Lee, T.H.; Jin, J.O.; Yu, K.J.; Kim, H.S. & Lee, P.C.W. 2019. Inhibition of peroxiredoxin 2 suppresses Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastric cancer. *Biochemical and biophysical research communications.*, 512(2): 250-255.
- Leipheimer, J.; Bloom, A.L.; Campomizzi, C.S.; Salei, Y. & Panepinto, J.C. 2019. Translational Regulation Promotes Oxidative Stress Resistance in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans.*, *Mbio*, 10(6).
- Lin, Y.; Wang, J.; Zheng, W.; Luo, Q.; Wu, K.; Du, J. & Wang, F. 2019. Organometallic ruthenium anticancer complexes inhibit human peroxiredoxin I activity by binding to and inducing oxidation of its catalytic cysteine residue. *Metallomics.*, 11(3): 546-555.
- Liu, C.X.; Yin, Q.Q.; Zhou, H.C.; Wu, Y.L.; Pu, J.X.; Xia, L. & He, L.C. 2012. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature chemical biology.*, 8(5): 486.
- 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.
- Llanos, R.; Fernández-Espinar, M.T. & Querol, A. 2006. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 90(3): 221-231.
- Llopis, S.; Querol, A.; Heyken, A.; Hube, B.; Jespersen, L.; Fernández-Espinar, M.T. & Pérez-Torrado, R. 2012. Transcriptomics in human blood incubation reveals the importance of oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains. *BMC genomics.*, 13(1): 419.
- Loberg, M.A.; Hurtig, J.E.; Graff, A.H.; Allan, K.M.; Buchan, J.A.; Spencer, M.K. & West, J.D. 2019. Aromatic Residues at the Dimer–Dimer Interface in the Peroxiredoxin Tsa1 Facilitate Decamer Formation and Biological Function. *Chemical research in toxicology.*, 32(3): 474-483.
- Longo, L.; Breyer, C.A.; Novaes, G.M.; Gegembauer, G.; Leitão, N.P.; Jr, Octaviano, C.E.; Toyama, M.H.; de Oliveira, M.A. & Puccia, R. 2020. The Human Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* Has a Unique 1-Cys Peroxiredoxin That Localizes Both Intracellularly and at the Cell Surface. *Frontiers in cellular and infection microbiology.*, 10, 394.
- Low, F.M.; Hampton, M.B. & Winterbourn, C.C. 2008. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & redox signaling.*, 10(9): 1621-1630.

- Ma, H.; Wang, M.; Gai, Y.; Fu, H.; Zhang, B.; Ruan, R. & Li, H. 2018. Thioredoxin and glutaredoxin systems required for oxidative stress resistance, fungicide sensitivity, and virulence of *Alternaria alternata*. *Applied and environmental microbiology.*, 84(14).
- Maleb, A.; Sebbar, E.; Frikh, M.; Boubker, S.; Moussaoui, A. & Ismaili, Z. 2017. *Saccharomyces cerevisiae* invasive infection: The first reported case in Morocco. *Journal de mycologie medicale.*, 27(2): 266-270.
- Manevich, Y.; Sweitzer, T.; Pak, J.H.; Feinstein, S.I.; Muzykantov, V. & Fisher, A.B. 2002. 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 99(18): 11599-11604.
- Martchenko, M.; Alarco, A.M.; Harcus, D. & Whiteway, M. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Molecular biology of the cell.*, 15(2): 456-467.
- Mayer, F.L.; Wilson, D. & Hube, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.*, 4(2): 119-128.
- 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.
- Missall, T.A. & Lodge, J.K. 2005. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell.*, 4(2): 487-489.
- Missall, T.A.; Pusateri, M.E. & Lodge, J.K. 2004. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology.*, 51(5): 1447-1458.
- 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.*, 27(4): 1083-1087.
- Moghadam Z.M.; Henneke P.; Kolter J. 2021. From Flies to Men: ROS and the NADPH Oxidase in Phagocytes. *Front Cell Dev Biol.*, 26(9): 628991.
- Mongkolsuk, S.; Sukchawalit, R.; Loprasert, S.; Praituan, W. & Upaichit, A. 1998. Construction and Physiological Analysis of a *Xanthomonas* Mutant To Examine the Role of theoxyR Gene in Oxidant-Induced Protection against Peroxide Killing. *Journal of bacteriology.*, 180(15): 3988-3991.
- Moraes, D.C.; Cardoso, K.M.; Domingos, L.T.S.; Pinto, M.D.C.F.R.; Monteiro, R.Q. & Ferreira-Pereira, A. 2020.  $\beta$ -Lapachone enhances the antifungal activity of fluconazole against a Pdr5p-mediated resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 1-10.
- Muchowicz, A.; Firczuk, M.; Chlebowska, J.; Nowis, D.; Stachura, J.; Barankiewicz, J. & Pu, J. X. 2014. Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochemical pharmacology.*, 89(2): 210-216.
- Munhoz, D.C. & Netto, L.E.S. 2004. Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II Are Important Defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult Catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by yeast. *Journal of Biological Chemistry.*, 279(34): 35219-35227.
- Muñoz, P.; Bouza, E.; Cuenca-Estrella, M.; Eiros, J.M.; Pérez, M.J.; Sánchez-Somolinos, M. & Peláez, T. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clinical Infectious Diseases.*, 40(11): 1625-1634.

- Nelson, K.J.; Perkins, A.; Van Swearingen, A.E.; Hartman, S.; Brereton, A.E.; Parsonage, D. & Poole, L.B. 2018. Experimentally dissecting the origins of peroxiredoxin catalysis. *Antioxidants & redox signaling.*, 28(7): 521-536.
- Netto, L.E.; 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. *Journal of Biological Chemistry.*, 271(26): 15315-15321.
- Nielsen, J. (2019). Yeast systems biology: model organism and cell factory. *Biotechnology journal*, 14(9), 1800421.
- Nielsen, M.H.; Kidmose, R.T. & Jenner, L.B. 2016. Structure of TSA2 reveals novel features of the active-site loop of peroxiredoxins. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology.*, 72(1): 158-167.
- 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.*, 14(2): 109-121.
- Nyerges, Á.; Csörgő, B.; Draskovits, G.; Kintses, B.; Szili, P.; Ferenc, G. & Vászrhelyi, B.M. 2018. Directed evolution of multiple genomic loci allows the prediction of antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 115(25): E5726-E5735.
- Oliveira, M.A.; Discola, K.F.; Alves, S.V.; Barbosa, J.A.; Medrano, F.J.; Netto, L.E.; Guimarães, B.G. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2005;61(Pt 4):387-90.
- Oliveira M.A.; Tairum C.A.; Netto L.E.S.; de Oliveira A.L.P.; Aleixo-Silva R.L.; Cabrera V.I.M.; Breyer C.A.; Dos Santos M.C. 2021. Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1-17.
- Oliveira MA, Genu V, Discola KF, Alves SV, Netto LE, Guimarães BG. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a decameric form of cytosolic thioredoxin peroxidase 1 (Tsa1), C47S mutant, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2007 Aug 1;63(Pt 8):665-8.
- 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 and Medicine.*, 42(3): 326-334.
- Olver, W. J.; James, S. A.; Lennard, A.; Galloway, A.; Roberts, I. N.; Boswell, T. C. & Russell, N. H. 2002. Nosocomial transmission of *Saccharomyces cerevisiae* in bone marrow transplant patients. *Journal of Hospital Infection.*, 52(4), 268-272.
- Ostrosky-Zeichner, L.; Casadevall, A.; Galgiani, J.N.; Odds, F.C. & Rex, J.H. 2010. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature reviews Drug Discovery.*, 9(9): 719-727.
- Pang, C.N.I.; Lai, Y.W.; Campbell, L.T.; Chen, S.C.A.; Carter, D.A. & Wilkins, M.R. 2017. Transcriptome and network analyses in *Saccharomyces cerevisiae* reveal that amphotericin B and lactoferrin synergy disrupt metal homeostasis and stress response. *Scientific reports.*, 7(1): 1-12.
- Parapouli, M.; Vasileiadis, A.; Afendra, A. S. & Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology.*, 6(1): 1.

- Park, S.G.; Cha, M.K.; Jeong, W. & Kim, I.H. 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry.*, 275(8): 5723-5732.
- Parsonage, D.; 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(31): 10583-10592.
- Pastor-Flores, D.; Talwar, D.; Pedre, B. & Dick, T.P. 2020. Real-time monitoring of peroxiredoxin oligomerization dynamics in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 117(28): 16313-16323.
- Peskin, A.V.; Low, F.M.; Paton, L.N.; Maghzal, G.J.; Hampton, M.B. & Winterbourn, C.C. 2007. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *Journal of Biological Chemistry.*, 282(16): 11885-11892.
- Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.; Gibbs, D.L.; Newell, V.A.; Ellis, D.; Tullio, V. & Ling, T.A. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of clinical microbiology.*, 48(4): 1366-1377.
- Pillai, U.; Devasahayam, J.; Kurup, A. N. & Lacasse, A. 2014. Invasive *Saccharomyces cerevisiae* infection: A friend turning foe?. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation.*, 25(6): 1266.
- Popiel, K.Y.; Wong, P.; Lee, M.J.; Langelier, M.; Sheppard, D.C. & Vinh, D.C. 2015. Invasive *Saccharomyces cerevisiae* in a liver transplant patient: case report and review of infection in transplant recipients. *Transplant Infectious Disease.*, 17(3): 435-441.
- Porqué, P.G.; Baldesten, A. & Reichard, P. 1970. Purification of a thioredoxin system from yeast. *Journal of Biological Chemistry.*, 245(9): 2363-2370.
- Prolo, C.; Álvarez, M.N. & Radi, R. 2014. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors.*, 40(2): 215-225.
- Ramana, K.V.; Srivastava, S. & Singhal, S.S. 2019. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2019. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, 2019.
- Ramírez-Quijas, M.D.; Lopez-Romero, E. & CuÚllar-Cruz, M. 2015. Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microbial pathogenesis.*, 87: 1-12.
- Reyes A.M.; Hugo M.; Trostchansky A.; Capece L.; Radi R. & Trujillo M. 2011. Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radical Biology and Medicine.*, 51(2):464-73.
- Rhee, S.G. 2016. Overview on peroxiredoxin. *Molecules and cells.*, 39(1): 1-5.
- Richardson, M. & Lass-Flörl, C. 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection.*, 14, 5-24.
- Roberts, B. & Hirst, R. 1996. Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from Mycobacterium ulcerans. *Journal of medical microbiology.*, 45(5): 383-387.
- Rocha, M.C.; de Godoy, K.F.; Bannitz-Fernandes, R.; Fabri, J.H.M.; Barbosa, M.M.F.; de Castro, P.A. & de Oliveira, M.A. 2018. Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism and virulence. *Scientific reports.*, 8(1): 1-18.

- Rodrigues, M.L.; & Nosanchuk, J.D. 2020. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(2), e0007964.
- Ross, S.J.; Findlay, V.J.; Malakasi, P. & Morgan, B.A. 2000. Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Molecular biology of the cell.*, 11(8): 2631-2642.
- Saccoccia, F.; Di Micco, P.; Boumis, G.; Brunori, M.; Koutris, I.; Miele, A.E. & Angelucci, F. 2012. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Structure.*, 20(3): 429-439.
- Saijo, T.; Miyazaki, T.; Izumikawa, K.; Mihara, T.; Takazono, T.; Kosai, K. & Yanagihara, K. 2010. Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia.*, 169(2): 81-90.
- Saini, R. & Singh, S. 2019. Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils. *Journal of leukocyte biology.*, 105(1), 49-61.
- Salonen, J.H.; Richardson, M.D.; Gallacher, K.; Issakainen, J.; Helenius, H.; Lehtonen, O.P. & Nikoskelainen, J. 2000. Fungal colonization of haematological patients receiving cytotoxic chemotherapy: emergence of azole-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hospital Infection.*, 45(4): 293-301.
- Schröder, E.; Littlechil, J.A.; Lebedev, A.A.; Errington, N.; Vagin, A.A. & Isupov, M.N. 2000. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure.*, 8(6), 605-615.
- Shekhova, E.; Kniemeyer, O. & Brakhage, A.A. 2017. Induction of mitochondrial reactive oxygen species production by itraconazole, terbinafine, and amphotericin B as a mode of action against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, 61(11), e00978-17.
- Shi, X.J.; Ding, L.; Zhou, W.; Ji, Y.; Wang, J.; Wang, H. & Zhao, W. 2017. Pro-apoptotic effects of JDA-202, a novel natural diterpenoid, on esophageal cancer through targeting Peroxiredoxin I. *Antioxidants & redox signaling.*, 27(2): 73-92.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W. & Thompson, J.D. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology.*, 7(1): 539.
- Smith, D.; Metzgar, D.; Wills, C. & Fierer, J. 2002. Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. *Journal of clinical microbiology.*, 40(7): 2691-2692.
- Soares, M.P., Teixeira, L. & Moita, L.F. 2017. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nature Reviews Immunology.*, 17(2): 83.
- 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 Radical Biology and Medicine.*, 77: 331-339.
- Sottero, B.; Rossin, D.; Poli, G. & Biasi, F. 2018. Lipid oxidation products in the pathogenesis of inflammation-related gut diseases. *Current medicinal chemistry.*, 25(11): 1311-1326.
- Souza, C.G. & Severo, L. C. 2013. *Saccharomyces cerevisiae* infections. *Revista iberoamericana de micologia.*, 30(3): 205-208.

- Spivak, E.S. & Hanson, K.E. 2018. *Candida auris*: an emerging fungal pathogen. *Journal of clinical microbiology.*, 56(2).
- Springer, D.J.; Billmyre, R.B.; Filler, E.E.; Voelz, K.; Pursall, R.; Mieczkowski, P. A. & Heitman, J. 2014. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. *PLoS pathogens.*, 10(8).
- Staerck, C.; Gastebois, A.; Vandeputte, P.; Calenda, A.; Larcher, G.; Gillmann, L. & Fleury, M.J. 2017. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial pathogenesis.*, 110, 56-65.
- Stöcker, S.; Van Laer, K.; Mijuskovic, A. & Dick, T.P. 2018. The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs. *Antioxidants & redox signaling.*, 28(7): 558-573.
- 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.
- Tairum Jr, C.A.; de Oliveira, M.A.; Horta, B.B.; Zara, F.J. & Netto, L.E. 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(1-2): 28-41.
- Tairum, C.A.; Santos, M.C.; Breyer, C.A.; Geyer, R.R.; Nieves, C.J.; Portillo-Ledesma, S. & Netto, L.E. 2016. Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-Cys peroxiredoxin by distinct mechanisms. *Scientific reports.*, 6: 33133.
- Tairum C.A.; Santos M.C.; Breyer C.A.; de Oliveira A.L.P.; Cabrera V.I.M.; Toledo-Silva G.; Mori G.M.; Toyama M.H.; Netto L.E.S.; de Oliveira M.A. 2021. Effects of Serine or Threonine in the Active Site of Typical 2-Cys Prx on Hyperoxidation Susceptibility and on Chaperone Activity. *Antioxidants (Basel).*, 10(7):1032.
- Tiballi, R.N.; Spiegel, J.E.; Zarins, L.T. & Kauffman, C.A. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* infections and antifungal susceptibility studies by colorimetric and broth macrodilution methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease.*, 23(4): 135-140.
- Troska, P.; Sucharzewska, E.; Dynowska, M. & Ejdy, E. 2017. Fungi of the genus *Rhodotorula* isolated from the oral cavity of oncologic patients with colorectal cancer. *Annals of parasitology.*, 63(1): 57-62.
- Truong, T.; Zeng, G.; Qingsong, L.; Kwang, L.T.; Tong, C.; Chan, F.Y. & Seneviratne, C.J. 2016. Comparative ploidy proteomics of *Candida albicans* biofilms unraveled the role of the AHP1 gene in the biofilm persistence against amphotericin B. *Molecular & Cellular Proteomics.*, 15(11): 3488-3500.
- Truzzi, D.R.; Coelho, F.R.; Paviani, V.; Alves, S.V.; Netto, L.E. & Augusto, O. 2019. The bicarbonate/carbon dioxide pair increases hydrogen peroxide-mediated hyperoxidation of human peroxiredoxin 1. *Journal of Biological Chemistry.*, 294(38), 14055-14067.
- Turner, S.A. & Butler, G. 2014. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.*, 4(9): a019778.
- Underhill, D.M. & Ozinsky, A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology.*, 20(1): 825-852.
- Upadhyay, R.; Campbell, L.T.; Donlin, M.J.; Aurora, R. & Lodge, J.K. 2013. Global transcriptome profile of *Cryptococcus neoformans* during exposure to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *PloS one.*, 8(1).

- Urban, C.; Xiong, X.; Sohn, K.; Schröppel, K.; Brunner, H. & Rupp, S. 2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Molecular microbiology.*, 57(5): 1318-1341.
- von Lilienfeld-Toal, M.; Wagener, J.; Einsele, H.; Cornely, O.A. & Kurzai, O. 2019. Invasive Fungal Infection: New Treatments to Meet New Challenges. *Deutsches Ärzteblatt International.*, 116(16): 271.
- Warris, A. & Ballou, E.R. 2019. Oxidative responses and fungal infection biology. *Seminars in cell & developmental biology.*, 89: 34-46.
- Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.; Clamp, M. & Barton, G.J. 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.*, 25(9): 1189-1191.
- Wei, W.; Ma, C.; Cao, Y.; Yang, L.; Huang, Z.; Qin, D. & Lei, H. 2016. Identification of H7 as a novel peroxiredoxin I inhibitor to induce differentiation of leukemia cells. *Oncotarget.*, 7(4): 3873.
- West, J.D.; Roston, T.J.; David, J.B.; Allan, K.M. & Loberg, M.A. 2018. Piecing together how peroxiredoxins maintain genomic stability. *Antioxidants.*, 7(12): 177.
- Winterbourn, C.C. & Kettle, A.J. 2013. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants & redox signaling.*, 18(6): 642-660.
- Winzeler, E.A.; Shoemaker, D.D., Astromoff, A.; Liang, H.; Anderson, K.; Andre, B. & Chu, A.M. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.*, 285(5429): 901-906.
- Wood, Z.A.; Poole, L.B.; Hantgan, R.R. & Karplus, P.A. 2002. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry.*, 41(17): 5493-5504.
- Wood, Z.A.; Schröder, E.; Harris, J.R. & Poole, L.B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences.*, 28(1): 32-40.
- Wu, F.; Chi, Y.; Jiang, Z.; Xu, Y.; Xie, L.; Huang, F. & Zhang, Y. 2020. Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature.*, 578(7796):577–581.
- Yang, Y.J.; Baek, J.Y.; Goo, J.; Shin, Y.; Park, J.K.; Jang, J.Y. & Lee, S.K. 2016. Effective killing of cancer cells through ROS-mediated mechanisms by AMRI-59 targeting peroxiredoxin I. *Antioxidants & redox signaling.*, 24(8): 453-469.
- Ye, Q.; Zhang, Y.; Cao, Y.; Wang, X.; Guo, Y.; Chen, J. & Wei, Q. 2019. Frenolicin B Targets Peroxiredoxin 1 and Glutaredoxin 3 to Trigger ROS/4E-BP1-Mediated Antitumor Effects. *Cell chemical biology.*, 26(3): 366-377.
- Zeida, A.; Reyes, A.M.; Lebrero, M.C.; Radi, R.; Trujillo, M. & Estrin, D.A. 2014. The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chemical communications*, 50(70): 10070-10073.
- Zeida, A.; Reyes, A.M.; Lichtig, P.; Hugo, M.; Vazquez, D.S.; Santos, J. & Trujillo, M. 2015. Molecular basis of hydroperoxide specificity in peroxiredoxins: the case of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.*, 54(49): 7237-7247.
- Zhao, Q.; Ding, Y.; Deng, Z.; Lee, O.Y.; Gao, P.; Chen, P. & Heck, A.J. 2015. Natural products triptolide, celastrol, and withaferin A inhibit the chaperone activity of peroxiredoxin I. *Chemical Science.*,6(7): 4124-4130.
- Zhu, H.; Wang, B.; Kong, L.; An, T.; Li, G.; Zhou, H. & Puno, P. 2019. Parvifoline AA Promotes Susceptibility of Hepatocarcinoma to Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis by Targeting Peroxiredoxin. *Cell chemical biology.*,26(8): 1122-1132.