

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

ANA LAURA PIRES DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
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 nº 2019/04054-4) e ao Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) Redoxoma (Processo nº 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 α,β -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 Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Leu¹⁴², Val¹⁶⁷, Pro¹⁸¹ e Tyr⁷⁷ e também das cadeias principais de Phe⁴⁵, Leu¹⁴². 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 $2 \pm 0.13 \text{ } \mu\text{M}$. 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 α - β -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 Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Leu¹⁴², Val¹⁶⁷, Pro¹⁸¹ and Tyr⁷⁷ and also of the main chains of Phe⁴⁵, Leu¹⁴². 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 ₅₀ 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 _P 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 Sy de C _p	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</i> <i>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 _p	Cisteína peroxidásica
C _p -SOH	Cisteína ácido sulfênico
C _p -SO ₂ H	Cisteína ácido sulfínico
C _R	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	Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	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 [•]	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
Ohr	<i>Organic hydroperoxide resistance protein</i>
ONOO ⁻	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 ₅₀	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).

A) Reações de Fenton:	$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ (reação 1)
	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet}$ (reação 2)
B) Reação de Haber-Weiss:	$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + OH^- + HO^{\bullet}$

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 ($\text{ONOO}^{\bullet}$), 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 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 glutationalas 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 H_2O_2 , as Prx são capazes de reduzir o H_2O_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 α -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 α -hélice para que seja formado o dissulfeto (Fig. 2B e 2C). Neste contexto, quando a C_P está reduzida, a α -hélice se encontra enovelada em uma conformação denominada de *fully folded* (FF) e, após a reação com um hidroperóxido, ocorre o desenovelamento parcial da α -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 hidróperóxido (Discola et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Jaeger e Flohé, 2006).

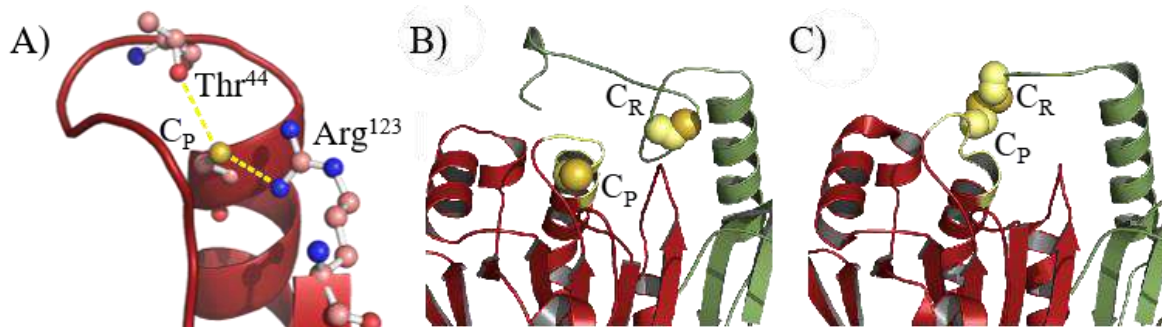


Figura 2: Tríade catalítica e representação das alterações estruturais entre o estado reduzido (FF) e oxidado (LU). **A)** Representação da tríade catalítica de Prx 2-Cys típicas composta pela C_P , Thr e Arg (Tsa1 de *S. cerevisiae*; PDB = 3SBC), onde a proteína está representada em *cartoon* (vermelho) 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).

1.3 Transições da estrutura quaternária

Normalmente, as Prx 2-Cys típicas são consideradas como homodímeros (α_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 hidróperóxidos (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 hidróperóxidos (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_P-SO₂H (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.

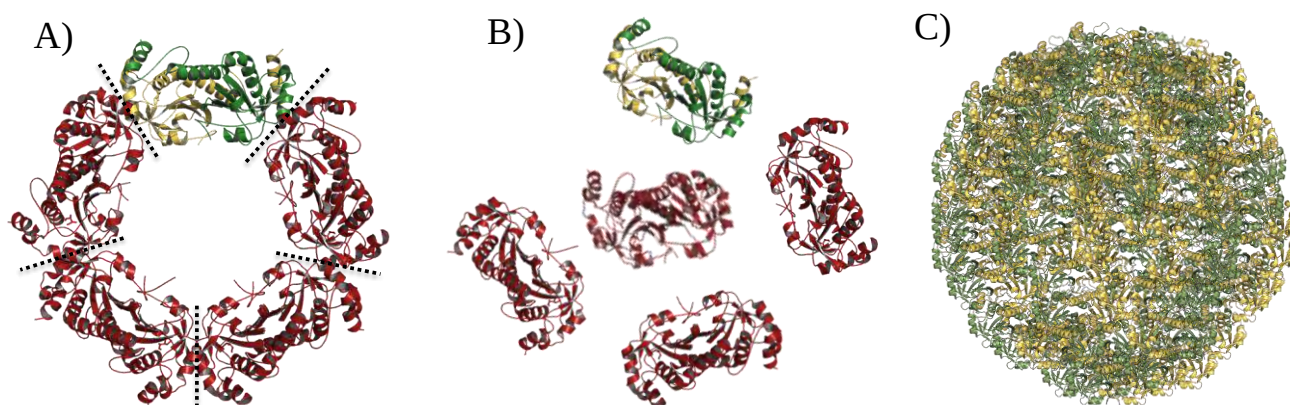


Figura 3: Diferentes estruturas quaternárias apresentadas por Prx 2-Cys típicas. **A)** Estrutura de Prx 2-Cys típica em seu estado reduzido representado pela união de cinco dímeros formando a estrutura do decâmero. No dímero superior um monômero está colorido em verde e outro em amarelo. O restante 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).

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; Góralska 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 H₂O₂, uma vez que linhagens de *C. neoformans* Δ cnts1 possuem sua virulência diminuída (Missall et al., 2004; Upadhyaya 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_2O_2 é capaz de acentuar a morte celular (Ostrosky-Zeichner et al., 2010).

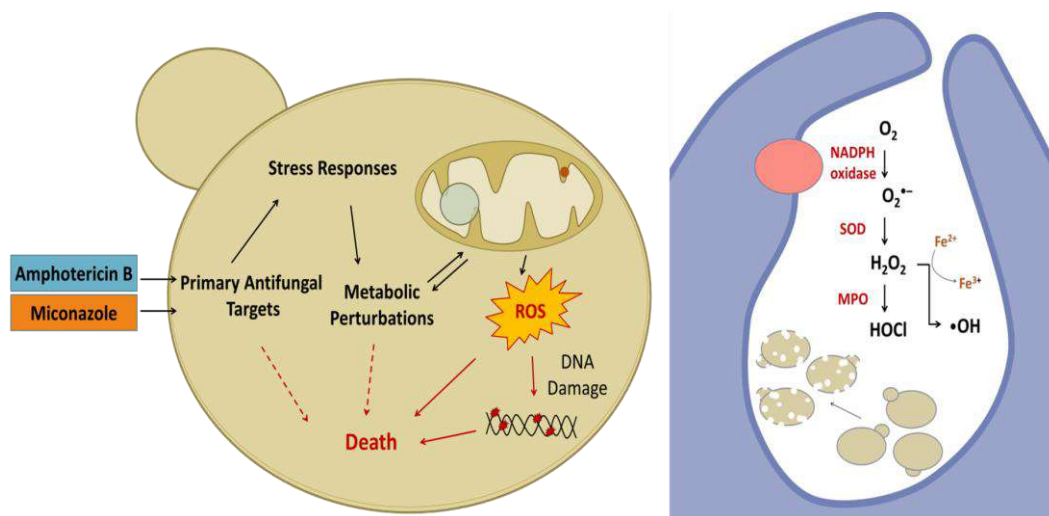


Figura 4: Modo de ação dos antifúngicos comumente usados contra infecções invasivas e sistêmicas e explosão oxidativa em fagócitos. A) A AMB e o MCZ são capazes de causar distúrbios metabólicos que geram o acúmulo de

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[•] pode ser formado através da reação de Fenton e/ou de Haber-Weiss.

Posteriormente, foi demonstrado que a estimulação do aumento intracelular de O₂^{•-}, 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 *Atsa1* 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 O₂^{•-} e H₂O₂, uma vez que são importantes para evitar a formação de espécies radicalares como HO[•], 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_γ 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-- π com o resíduo de Tyr⁷⁷ 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.

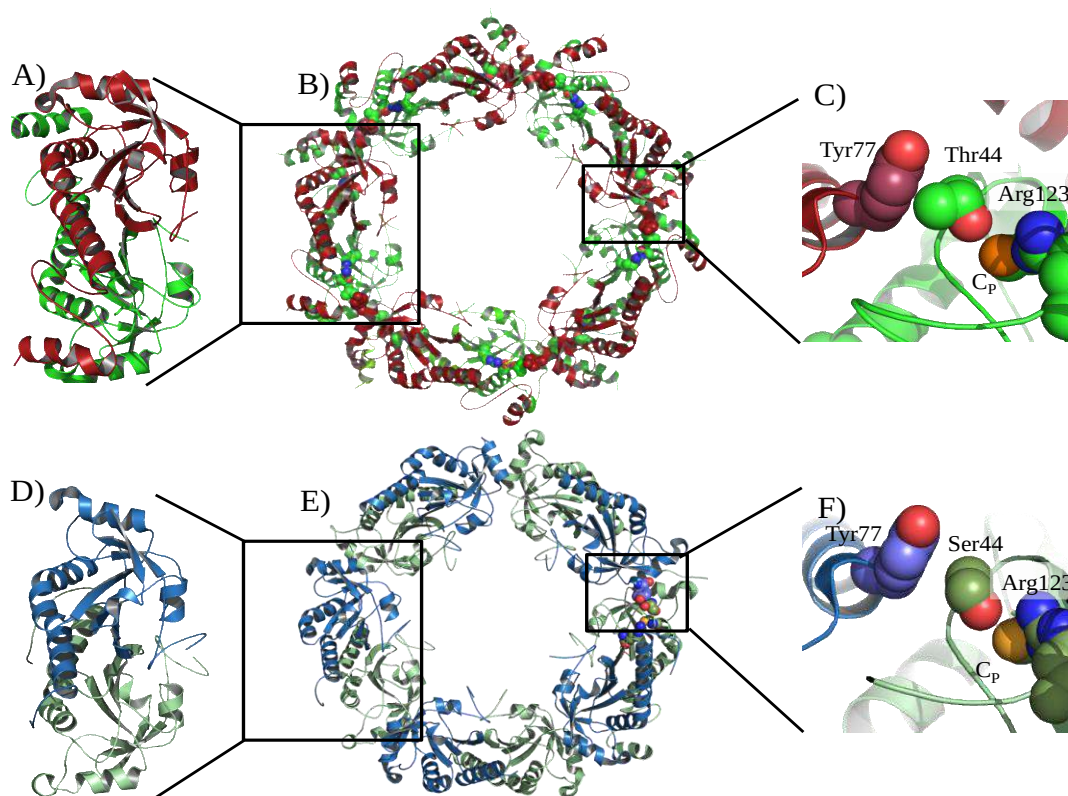


Figura 5: Interações Tsa1 e Tsa2 na interface D. **A)** Homodímero Tsa1 representado em *cartoon* com um monômero colorido em verde e o adjacente em vermelho (PDB = 3SBC). **B)** Decâmero de Tsa1. **C)** Interação entre Thr⁴⁴ e Tyr⁷⁷ na interface D do decâmero de Tsa1. Neste caso, é efetuada uma ligação CH- π 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 Ser⁴⁴ e Tyr⁷⁷. 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).

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.

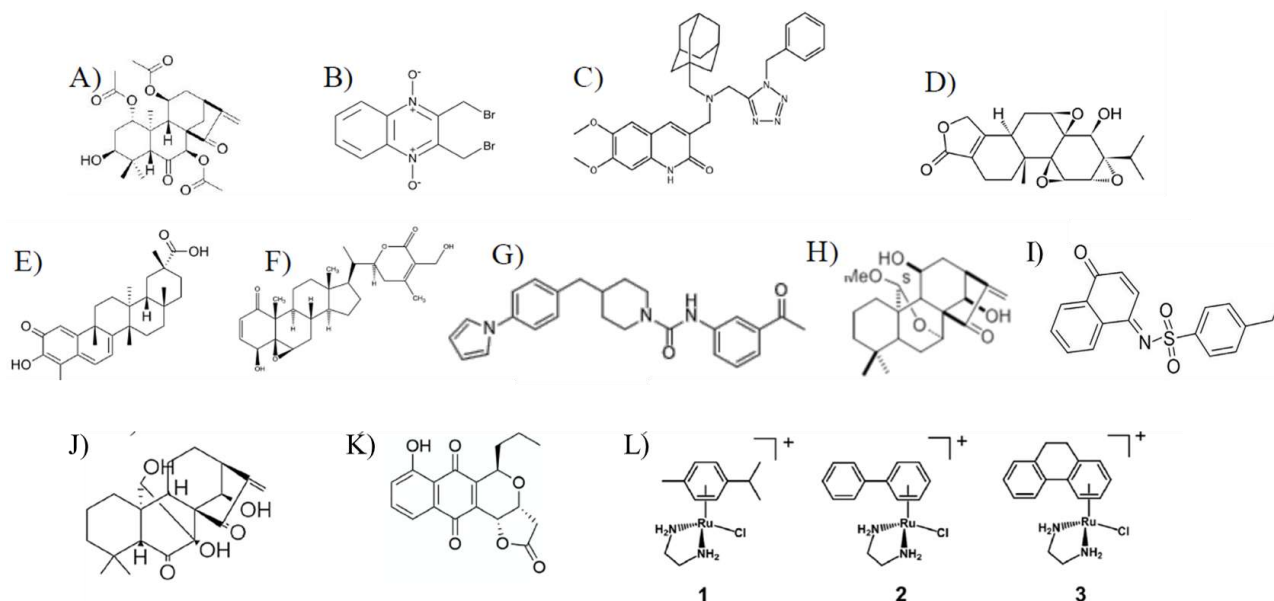


Figura 6: Estruturas químicas de inibidores de Prx2 2-Cys típicas. Adn (A), Conoidina A (B), N,N-disubstituído 3-aminometil quinolona (C), Triptolide (D), Celastrol (E), Withaferina A (F), AMRI-59 (G), JDA-202 (H), H7 (I), PAA (J), Frenolicina B (K) e rutênio organometálico (L3).

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/EBPb, 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 xenoinxertos 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 xenoinxerto (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 α,β -insaturado da Adn e o S_γ 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 IC₅₀ do composto JDA-202, possui uma afinidade ~10× mais acentuada para Prx1, quando comparado com Prx2 (5.3 ± 0.7 e 49.2 ± 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^{T44S}, 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.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho residem na avaliação comparativa do potencial inibitório de moléculas naturais pertencentes à classe dos terpenóides *ent*-caurânicos e lactonas sesquiterpênicas oriundas da biota florística brasileira, sobre a Prx 2-Cys típica fúngica Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *Homo sapiens*, uso de ferramentas *in silico* para analisar a ligação dos potenciais inibidores às enzimas e análise de seus efeitos citotóxicos em cultura de células de levedura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes: Os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos junto a Merck Millipore, Sigma Aldrich, Thermo Scientific e GE Helthcare.

3.2 Moléculas para avaliação da atividade inibitória sobre *Tsa1* e *Prx2*: As moléculas utilizadas neste trabalho foram obtidas da biodiversidade florística do estado de São Paulo através da extração, purificação e seleção realizada pelas equipes dos professores Dr. João Henrique Guilhardi Lago e Dr. Rodrigo L.O.R. Cunha do CCNH da Universidade Federal do ABC. Em síntese, após coleta e processamento do material vegetal, as substâncias foram purificadas através de técnicas cromatográficas e suas estruturas definidas através de análise espectral envolvendo RMN (ressonância magnética nuclear) e EM (espectrometria de massas). O grau de pureza dos compostos foi de 95%.

3.3 Meios de cultura: **Bactérias:** Meio de cultura Luria-Bertani (LB): 1% triptona; 0,5% extrato de levedura (YE); 0,5% NaCl; meio de cultura *Super Optimal Broth* (SOC): 2% triptona; 0,5% YE; 0,058% NaCl; 0,018% KCl; [glicose] final de 20mM; pH 7; ampicilina (Amp) 100 µg/mL; **Leveduras:** YPD: extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%; Meio Sintético: 0.17 % de YNB, 0.5% de (NH₄)₂SO₄, 2% de glicose e 1.3g/L de "dropout powders". SC: 0.67% yeast nitrogen base (sem AA e com sulfato de amônia), 2% da fonte de carbono (e.g. glicose ou rafinose), 0.01% (adenina, Arg, cisteína, leucina, lisina, Thr, triptofano, uracila), 0.005% (ácido aspartico, histidina, isoleucina, methionina, fenilalanina, prolina, Ser, tirosina, valina). SD (Sabouraud Dextrose): Para 1 L de cultura 40 g de glicose e 10 g de peptona (pH = 5.6). *Os meios de cultura sólidos foram preparados adicionando-se ágar para concentração final de 2%.

3.4 Linhagens: *E. coli* DH5αF' - F' (Z80dlacZ₁(lacZ)Adn5)₁(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺); DH10B - F⁻mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80dlacZΔAdn5 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 D (ara, leu) 7697 galK1⁻ rpsLnupG; BL21(DE3) - [F⁻, amp^r T, hsdS_b (r_B⁻m_b⁻), gal, dcm (DE3) (Novagen); B84 DE3 [F⁻, metamp^r T, hsdS_b (r_B⁻m_b⁻), gal, dcm (DE3); *S. cerevisiae* BY4741 - Mat a; His3Δ1; Leu2Δ0; Met15Δ0; Ura3Δ0.

3.5 Mini preparação plasmidial: A metodologia utilizada para extração de todos os plasmídeos deste estudo foi por lise alcalina, descrita Ausubel e colaboradores (Ausubel et al., 1998).

3.6 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo: Os genes das proteínas alvo deste estudo foram clonados em plasmídeos para expressão em bactérias como segue: pET28pp/*tsa1*, pET28a/*prx2*, pPROEX/*trr1* e pET17b/*trx1*.

3.7 Preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes: Os procedimentos para a preparação e transformação de bactérias eletrocompetentes foram realizados de acordo Ausubel e colaboradores (Ausubel et al., 1998).

3.8 Expressão e purificação de proteínas recombinantes: Inicialmente, linhagens de *E. coli* com os plasmídeos de expressão contendo os genes de interesse foram cultivadas em 20 mL de meio LB contendo 200µg/ml de Amp ou 30µg/ml de canamicina (Kan) a 37°C/16hs/250rpm em agitador orbital. Em seguida, a cultura foi transferida para 500 ml de meio LB e cultivada até OD₆₀₀ = 0,6. Nesse estágio, foi adicionado IPTG a fim de atingir a concentração final de 300 µM, desejada na cultura celular. Após o período de indução, o cultivo foi centrifugado a 4°C/20min/5000rpm e ressuspenso em tampão Tris 50 mM – NaCl 500 mM, pH = 7.4. As células foram rompidas por 15 ciclos de sonicação com 30% de amplitude e tratadas com sulfato de estreptomicina para a remoção dos ácidos nucleicos (concentração final = 10%) por 20 minutos. Posteriormente, foi efetuada nova centrifugação (45min/4°C/12000rpm), o precipitado foi descartado e foram coletados somente os extratos celulares proteicos livres de ácidos nucleicos. As proteínas de *S. cerevisiae* (Tsa1 e TrxR1) e de *H. sapiens*, (Prx2), contendo cauda de histidina (inseridas pelos plasmídeos de expressão) foram purificadas por cromatografia de afinidade em colunas Hi-Trap (Amersham - GE Healthcare) ou TALON (Amersham - GE Healthcare) em gradiente de imidazol. Para a proteína Trx1 de *S. cerevisiae*, expressa no plasmídeo pET17b, que não insere cauda de histidinas, foi utilizada a purificação através de fervura (*boiling method*) descrito por Porqué e colaboradores (Porqué et al., 1977).

3.9 Quantificação de proteínas: As proteínas purificadas foram quantificadas espectrofotometricamente, a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar específico de cada uma, sendo 24075 M⁻¹ cm⁻¹ para Tsa1 e 21555 M⁻¹ cm⁻¹ para Prx2, obtido através da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.10 Determinação da atividade antioxidante: Para a determinação de inibição por moléculas bioativas da atividade tiol peroxidásica de Tsa1 e Prx2, utilizou-se o ensaio de oxidação do NADPH, onde a Prx é incubada com H₂O₂ e o sistema Trx, composto por Trx1, TrxR e NADPH. A enzima Prx decompõe o H₂O₂, levando a oxidação do NADPH por TrxR para que possa haver um novo ciclo catalítico, e essa oxidação pode ser medida espectrofotometricamente a 340 nm. Para a realização deste ensaio seguimos protocolos previamente determinados pelo nosso grupo (Tairum et al., 2012).

3.11 Determinação da IC₅₀: Para moléculas que apresentaram atividade inibitória sobre Tsa1 e Prx2 foi definido o IC₅₀ (concentração inibitória dos compostos necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática), baseado na dose-resposta utilizando o programa GraphPadPrism 4.02.

3.12 Análise da ligação de compostos às enzimas por SDS-PAGE: A ligação dos compostos às cisteínas catalíticas de Tsa1 e Prx2, evidenciada pela inibição da formação do dissulfeto intermolecular, foi avaliada através de análise em SDS-PAGE não redutor. Para tanto, as proteínas foram inicialmente reduzidas com 5 mM de DTT por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, o excesso de DTT foi retirado através de dessalinização em coluna PD-10 (GE Healthcare) e as proteínas foram quantificadas a 280 nm pelo coeficiente de extinção molar. Posteriormente, 10 μ M da enzima foi incubada com concentrações crescentes dos compostos por 1 hora à temperatura ambiente e então, tratada com 2 equivalentes molares de H₂O₂ por mais 30 minutos. As reações foram paralisadas pela adição de *stop buffer* (50 mM N-etilmaleimida em solução 4% SDS; glicerol 10%; 62,5 mM tris-HCl pH 6,8) e aplicadas em SDS-PAGE.

3.13 Análises computacionais da estrutura primária e terciária/quaternária de Prx 2-Cys típicas:

Os alinhamentos de AA foram efetuados pelo programa Clustal Ω (Sievers et al., 2011), utilizando sequências depositadas no banco de dados Uniprot (www.uniprot.org), e as representações gráficas utilizando o programa Jalview (Waterhouse et al., 2009). As coordenadas de estruturas proteicas foram obtidas junto ao Protein Data Bank (www.rcsb.pdb.org) e as análises de estruturas foram efetuadas utilizando os programas Coot (Emsley et al., 2010) e PyMOL (www.pymol.org).

3.14 Ensaios de citotoxicidade sobre células de levedura: Foram utilizados métodos de diluição em placa para testar níveis inibitórios de compostos bioativos através da inoculação de cultura (10^6 células de células de levedura/mL) em meio YPD com diluições em série das moléculas (Belenky et al., 2013). Também foi testado o efeito de compostos identificados como inibidores de Tsa1 de levedura em conjunto com o fármaco AMB (Sigma Aldrich, cat. num. A9528), largamente utilizado no combate a fungos patogênicos.

A AMB foi testada em combinação com cada molécula identificada como inibidor de Tsa1 para inibição do crescimento de *S. cerevisiae* em culturas líquidas. Linhagens de *S. cerevisiae* (BY4741) foram estriadas em meio YPD-ágar por 42 horas a 30°C. Em seguida, colônias morfológicamente semelhantes foram diluídas em salina 0.9% e a suspensão de célula foi diluída para OD₆₀₀ = 0,4. Em microplaca foram feitas as diluições seriais de YPD + compostos e, em seguida, a suspensão celular foi adicionada a uma concentração final de 10^6 UFC/mL. Todas as drogas foram adicionadas em concentrações iguais às de MIC₂₅ (concentração inibitória mínima capaz de aniquilar 25% dos micro-organismos) e as taxas de crescimento foram medidas na presença e ausência de compostos bioativos ou em combinação com o fármaco antifúngico. A densidade celular foi acompanhada de 0 a 21 horas para monitorar as taxas de crescimento pela determinação da absorbância a 600 nm em leitora de microplaca (Carry60 - Agilent Technologies). A inibição em cada concentração de fármaco foi

monitorada em triplicata.

Uma vez que todos os agentes antifúngicos utilizados foram dissolvidos em DMSO, a mesma quantidade foi utilizada no controle negativo. Contagens de células viáveis foram monitoradas pela técnica de pour-plate moléculas (Belenky et al., 2013).

3.15 Docking molecular dos compostos naturais com Tsa1 e Prx2: As análises da ligação dos compostos às estruturas de Prx2 e Tsa1, foram executadas por meio de *docking* molecular utilizando o programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) em uma adaptação da metodologia proposta por Forli e colaboradores (2016). As estruturas cristalográficas de ambas as enzimas utilizadas como modelo de estudo neste trabalho já foram determinadas e as coordenadas cristalográficas foram obtidas junto ao *Protein Data bank* (códigos de PDB: Tsa1=3SBC e Prx2=1QMV). As coordenadas dos compostos (CID: Adn = 15011073 e NC-LS1 = 66551442) foram obtidas pelo PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e dos compostos NC-EK2 e NC-ABP1 foram construídas utilizando o software MolView (<https://molview.org/>). Uma vez que para os procedimentos de *docking* é necessário utilizar as coordenadas para proteína nativa (sem mutações ou modificações pós traducionais), foram executadas alterações tanto pra Tsa1, cuja a estrutura determinada é de um mutante onde C_P foi mutada por Ser, quanto para Prx2, onde nesta estrutura C_P se encontra hiperoxidada (sulfinilada = C_P-SO₂). Portanto, os AA modificados foram substituídos por cisteínas com o auxílio do programa PyMOL (www.pymol.org). Adicionalmente, em razão das limitações de processamento de dados devido ao tamanho das proteínas (os decâmeros possuem cerca de 2.000 resíduos de AA), as proteínas foram submetidas ao *docking* na forma de tetrâmeros, uma vez que estudos estruturais demonstram que o sítio ativo das Prx 2-Cys típicas se localiza na interface dos dímeros do decâmero (Schröder et al., 2000; Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016). Para os procedimentos de docking, os tetrâmeros foram previamente preparados utilizando o programa Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera) e para análises de resultados e representações gráficas das interações foram utilizados os programas PyMOL (<https://pymol.org/2/>), e Discovery Studio (BIOvIA, DS, 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Compostos naturais

Os compostos naturais utilizados neste estudo são oriundos de espécies vegetais coletadas na mata atlântica paulista e foram fornecidos pelos professores Dr. João Henrique Ghilardi Lago e Dr. Rodrigo L.O.R. Cunha do CCNH da Universidade Federal do ABC. Foram isolados compostos naturais (*ent*-cauranos e lactonas) de *Baccharis retusa*, *Pentacalia desiderabilis*, *Nectandra cupidata* e *Porcelia macrocarpa* (Fig. 7), onde a presença de um esqueleto caurânico similar a Adn ou a presença de sistemas conjugados carbonílicos α,β -insaturados nortearam a seleção dos compostos utilizados neste trabalho. Portanto, parte dos compostos são capazes de efetuar reação de Michael com C_P de Prx, como descrito para a Adn e JDA-202 (Liu et al., 2012; Shi et al., 2017), enquanto outras não possuem a presença de sistemas conjugados carbonílicos α,β -insaturados, de forma a avaliar a importância de aspectos como hidrofobicidade, na inibição de Prx 2-Cys típicas. Apesar de possuírem, em comum, anéis aromáticos, os compostos apresentam estruturas distintas, o que auxilia em um maior entendimento da ligação de inibidores nas Prx 2-Cys típicas.

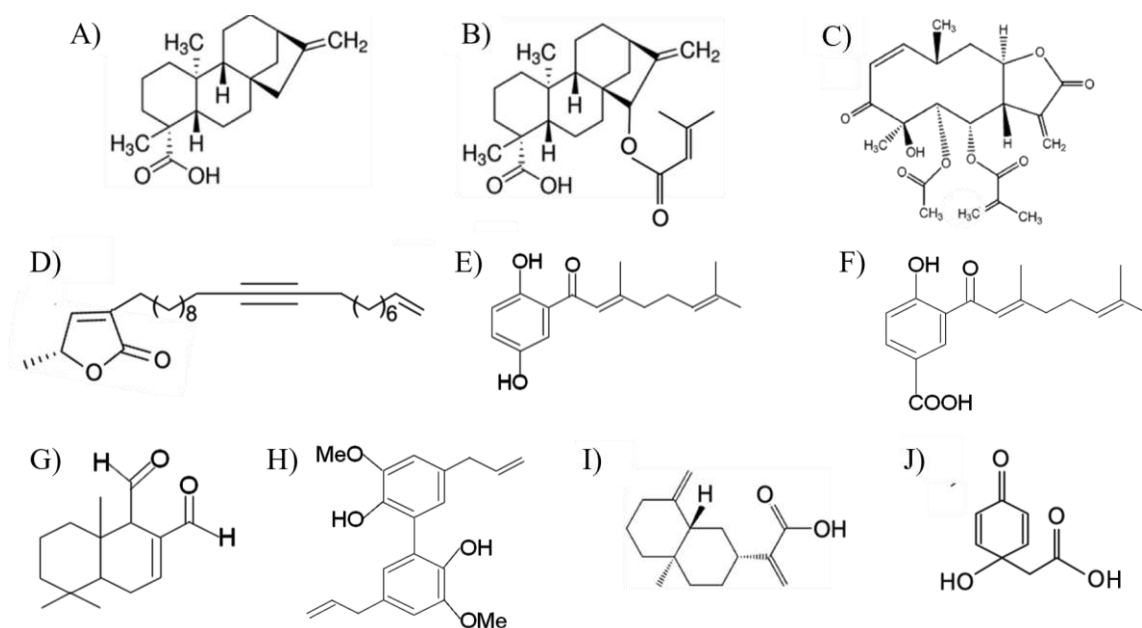


Figura 7: Estrutura dos compostos naturais, isolados da biota florística de São Paulo, selecionados para o desenvolvimento do estudo. A) ácido caurenóico de *Baccharis retusa* (NC-EK1) (MW=302.7); **B)** ácido 15-senecioloxi-caurenóico de *Baccharis retusa* (NC-EK2) (MW=400.4); **C)** caleína C de *Calea pinnatifida* (NC-LS1) (MW=420.4); **D)** acetogenina de *Porcelia macrocarpa* (NC-LS2) (MW=425.0); **E)** NC-HP1 (hidroquinonina prenilada – MW = 260 g/mol); **F)** NC-ABP1 (ácido benzóico prenilado – MW = 288 g/mol); **G)** NC-LS5 (lactona sesquiterpênica – MW = 234 g/mol); **H)** NC-LG1 (lignana – MW = 326 g/mol); **I)** ácido cóstico de *Nectandra cupidata* (NC-CA1) (MW=234.3) e **J)** jacaranona de *Pentacalia desiderabilis* (NC-LS3) (MW=182.1).

4.2 Padronização da expressão e purificação de Tsa1 e Prx2

As proteínas Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *H. sapiens* foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em gradiente de imidazol (seção

Materiais e Métodos). A partir de um litro de cultura, foi possível obter em média ~14.0 mg para Tsa1 e ~5.0 mg para Prx2, todas com alto grau de pureza (> 95%) (Fig. 8).

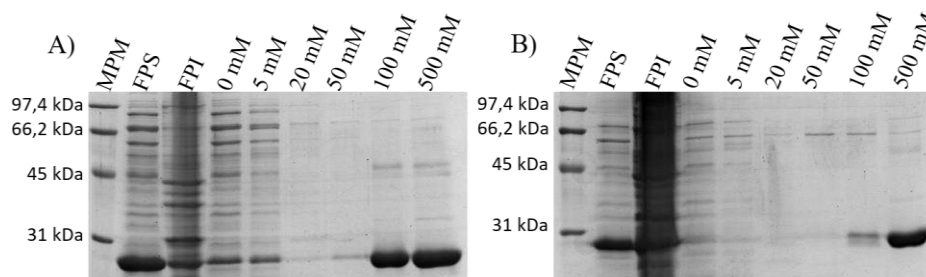


Figura 8: SDS-PAGE contendo os resultados da purificação de Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *H. sapiens* pelo método de IMAC. As alíquotas da purificação foram obtidas em gradiente de imidazol (0-500 mM), aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e coradas com *coomassie blue*. Marcador de peso molecular aplicado: *molecular weight marker* (Bio-Rad), representado por MPM; FPS = fração proteica solúvel; FPI = fração proteica insolúvel. **A)** Tsa1 de *S. cerevisiae* clonada em pET-28pp e expressa na linhagem de *E. coli* Tuner (DE3) e **B)** Prx2 de *H. sapiens* clonada em pET28b e expressa em BL21 (DE3).

4.3 Avaliação da inibição e ligação de compostos naturais à Prx 2-Cys típicas de *S. cerevisiae* e *H. sapiens*

Uma vez que as enzimas foram expressas e purificadas, iniciamos a padronização das metodologias para avaliação do potencial inibitório dos compostos naturais. Inicialmente, utilizamos a metodologia do ensaio de oxidação do DTT, tendo como controle de inibição a iodoacetamida (IAA), um alquilante amplamente utilizado para bloquear cisteínas e neutralizar a formação de dissulfetos ou a atividade enzimática (Hansen et al., 2009) e o inibidor Adn, na mesma concentração utilizada por Liu e colaboradores de 20 equivalentes molares (Liu et al., 2012). Nas condições testadas, nossos resultados indicam que Adn possui maior potencial inibitório sobre a Tsa1 ($47.7 \pm 2.1\%$ de inibição, Fig. 9) quando comparada com Prx2 ($28.4\% \pm 5.5\%$, Fig. 9), este resultado nos parece importante, uma vez que a baixa citotoxicidade de Adn em células sadias de mamíferos pode permitir sua utilização para o tratamento de infecções fúngicas.

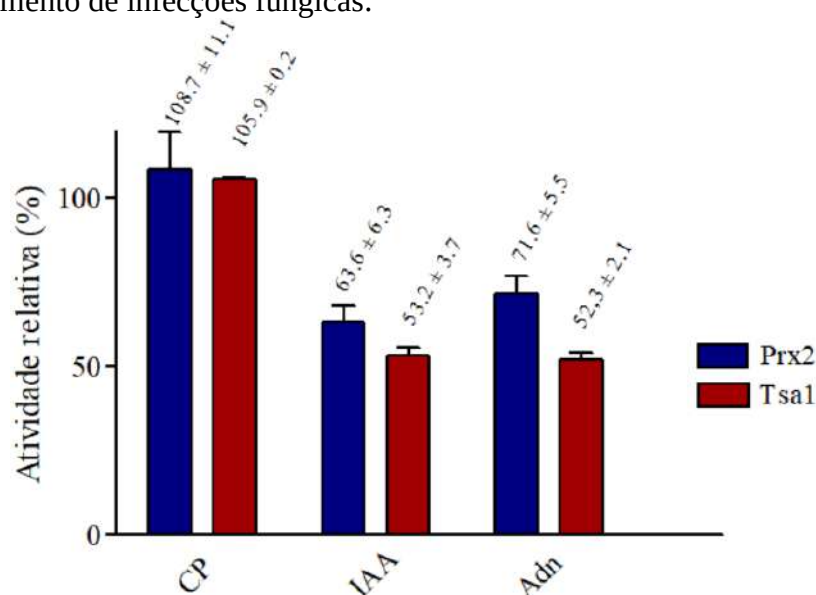


Figura 9: Ensaio de oxidação do DTT para avaliação comparativa inibitória da Adn sobre Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *H. sapiens*. A atividade peroxidásica foi monitorada através da oxidação do DTT, que absorve a 310 nm, e os dados foram plotados após 10 minutos de reação. Nas reações, as enzimas foram previamente reduzidas com 5 mM de

DTT/1h/30°C e o DTT foi removido por filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE heathcare). Em seguida, as enzimas Tsa1 e Prx2 foram tratadas com 20 equivalentes molares de IAA e Adn por 1h e dessalinizadas, para a remoção do excesso de ligante. As reações consistiram de: DTT 10 mM, CHP 2 mM e tampão HEPES 50 mM e foram executadas a 30 °C. Barras azuis = Prx2 e vermelhas = Tsa1; CP = controle positivo (sem adição de compostos).

Embora o ensaio de oxidação do DTT seja um método relativamente rápido e simples para se obter uma avaliação da capacidade inibitória dos compostos, há algumas limitações na técnica, onde o DTT não reduz somente as Prx, este composto também reduz o hidroperóxido utilizado, apesar deste artefato estar sendo minimizado com o uso de hidroperóxido orgânico (CHP) (Tairum et al., 2012). Além disso, no início da reação há uma variação de absorbância abaixo da faixa de confiabilidade do espectro ($< 0,1$), dificultando a credibilidade dos dados obtidos de comparação entre as velocidades iniciais da reação. Uma vez que muitos estudos publicados sobre inibidores das Prx 2-Cys típicas utilizaram a metodologia do ensaio acoplado de oxidação do NADPH (Liu et al., 2012; Wei et al., 2016; Yang et al., 2016; Zhu et al., 2019), optamos por padronizá-la para fins comparativos, pois apesar de ser mais trabalhosa, no sentido de necessitar da expressão de três enzimas distintas, é mais confiável, com uma variação da absorbância significativamente maior do que o ensaio de oxidação do DTT. Neste contexto, novamente a Adn foi utilizada para a padronização da metodologia (Fig. 10), utilizando o sistema redutor de *S. cerevisiae* para Prx2 e Tsa1 e, como controle de inibição, utilizamos o N-etilmaleimida (NEM), um composto reativo aos tióis, amplamente utilizado para bloquear (alquilar) cisteínas e neutralizar a formação de dissulfetos ou a atividade enzimática (Gorin et al., 1966).

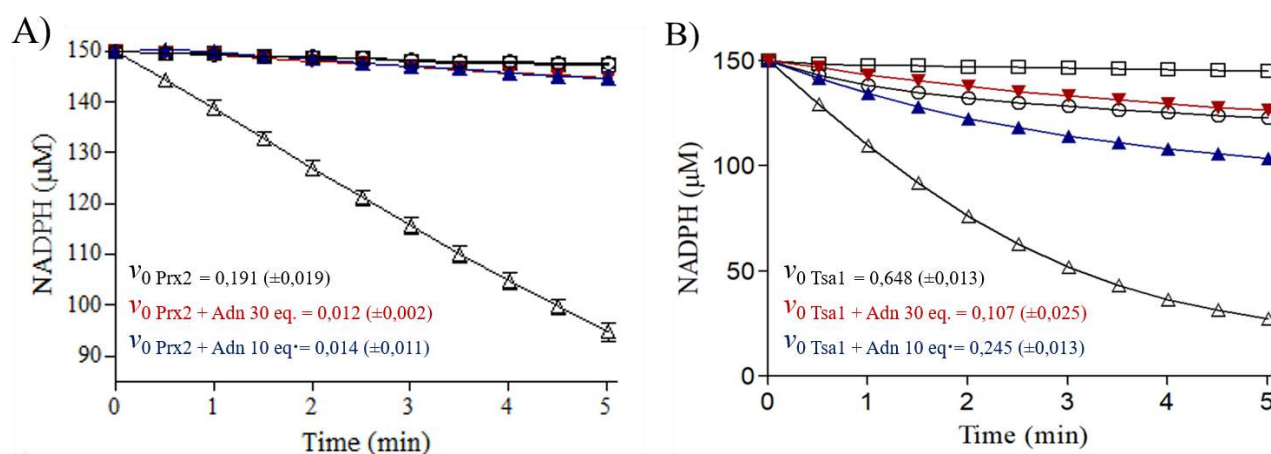


Figura 10: Ensaio de oxidação de NADPH com Prx2 e Tsa1 pré-tratadas com Adn. Prx2 (A) e Tsa1 (B) reduzidas foram tratadas com 10 ($\blacktriangle$) e 30 ($\blacktriangledown$) equivalentes molares de Adn por uma hora à temperatura ambiente, e posteriormente dessalinizadas para a retirada do excesso do ligante. As reações contendo 0,6 μM da proteína tratada, ScTrx1 (5 μM), ScTrxR (0,08 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM) foram pré-incubadas a 30°C por 3 minutos, iniciadas pela adição de 100 μM de H_2O_2 (Prx2) ou 500 μM de H_2O_2 (Tsa1) e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 30°C, por 5 minutos. Controle positivo ($\triangle$): proteínas sem tratamento prévio com os compostos. Controle de inibição ($\circ$): proteínas previamente tratadas com N-Etilmaleimida (30 eq. molares). Controle negativo ($\square$): reações sem adição da Prx.

Nossos resultados revelaram uma inibição diferencial entre as Prx humana e fúngica, onde para Prx2 10 equivalentes molares de Adn inibiram totalmente a atividade enzimática (v_0 Prx2 + Adn 10 eq. = $0,014 \pm 0,011$), enquanto para Tsa1 foram necessários 30 equivalentes molares para que fosse inibida a atividade da enzima de forma semelhante ao controle de inibição (NEM) (v_0 Tsa1 + Adn 30 eq. = $0,107 \pm 0,025$). Nestas condições testadas, notamos uma divergência quanto ao que foi observado por Liu e colaboradores, onde o IC_{50} para Prx2 foi determinado como $15\mu M$ (Liu et al., 2012), pois nossos dados indicaram uma inibição total com 10 equivalentes molares ($\sim 6\mu M$) de Adn para Prx2. Neste contexto, ainda não está claro se o excesso de Adn utilizada no tratamento das enzimas foi retirado neste trabalho (Liu et al., 2012) e, dados posteriores demonstram que Adn também pode se ligar ao seu sistema redutor, que é utilizado no ensaio acoplado de oxidação do NADPH (Muchowicz et al., 2014). Portanto, redeterminamos o IC_{50} para Prx2 como $2.00 \pm 0.13 \mu M$ (Fig. 11), sempre retirando o excesso de Adn antes de iniciar a reação com o sistema Trx.

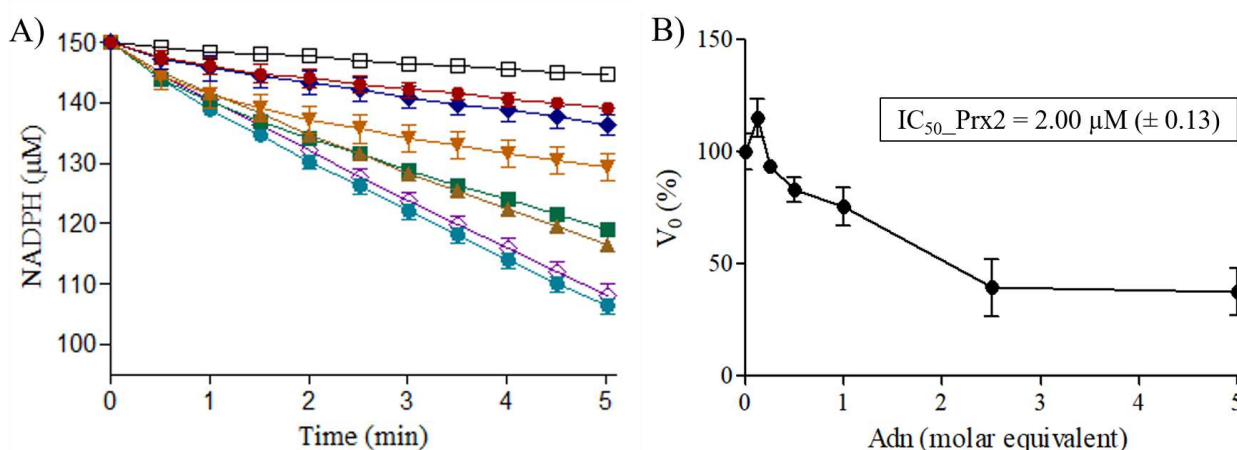


Figura 11: Determinação do IC_{50} de Prx2 + Adn pelo ensaio acoplado de oxidação de NADPH. **A)** Ensaio de oxidação do NADPH foi realizado para avaliar a atividade peroxidásica de Prx2, após tratamento com concentrações crescentes de Adn (0.125 (●) – 0.25 (■) – 0.5 (▲) – 1 (▼) – 2.5 (◆) e 5 (●) equivalentes molares). As reações contendo $0,6 \mu M$ da proteína tratada, ScTrx1 ($5 \mu M$), ScTrxR ($0,08 \mu M$), NADPH ($150 \mu M$), HEPES (50 mM , $pH=7.0$), DTPA ($100 \mu M$) e azida sódica (1 mM) foram pré-incubadas a $30^\circ C$ por 3 minutos, iniciadas pela adição de $100 \mu M$ de H_2O_2 e monitoradas espectrofotometricamente a 340 nm , $30^\circ C$, por 5 minutos. Controle positivo (◇): Prx2 sem tratamento prévio com Adn. Controle negativo (□): reações sem adição de Prx2. **B)** O IC_{50} para Prx2 foi determinado, nessas condições, em $2\mu M$, utilizando as velocidades iniciais para os cálculos necessários e o programa GraphPadPrism 4.02.

Após padronizada a metodologia do ensaio acoplado de oxidação do NADPH, iniciamos a avaliação do potencial inibitório dos compostos naturais com características distintas, oriundos de plantas do estado de São Paulo, selecionados para este estudo, sobre nossas enzimas de interesse (Fig. 12 e 13).

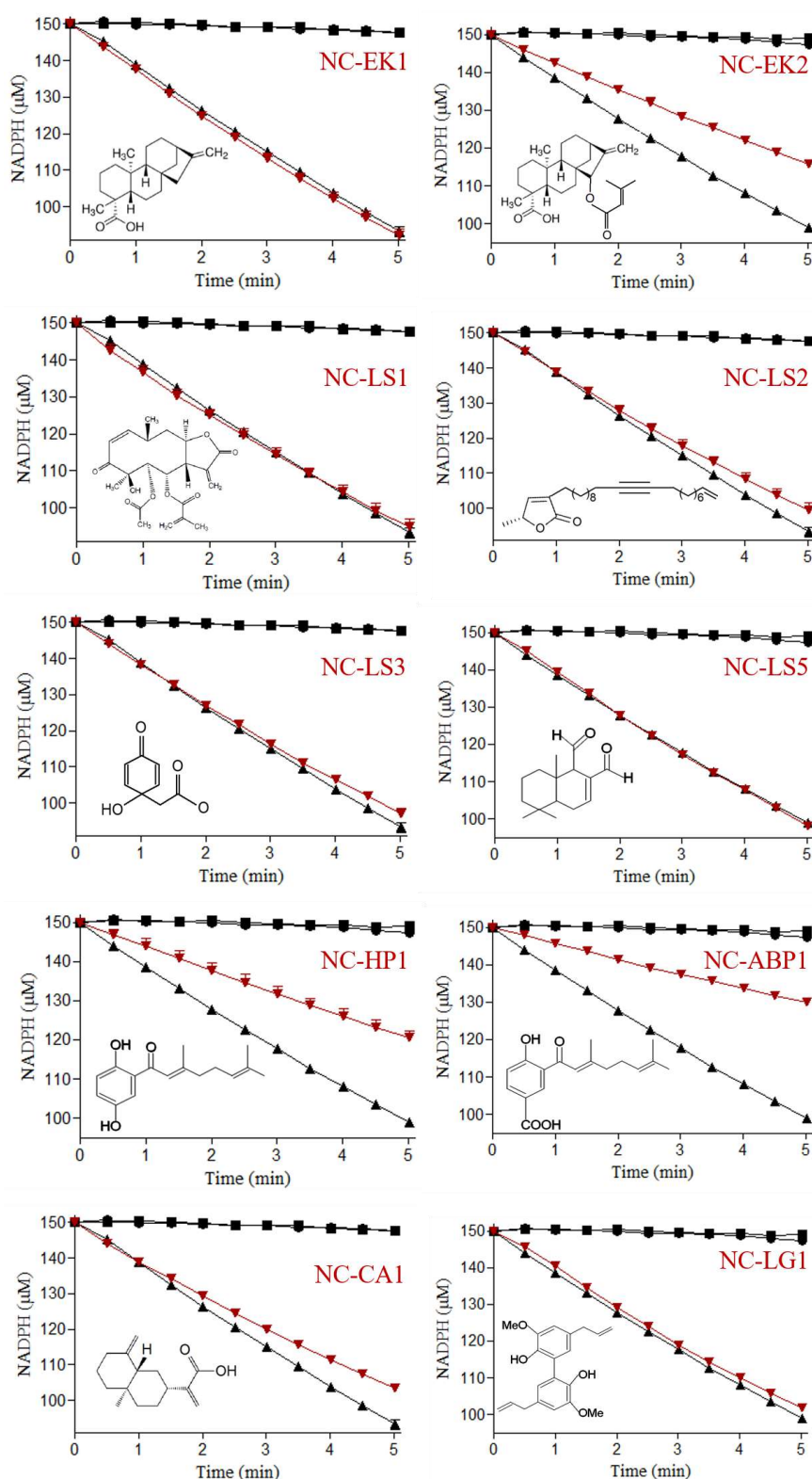


Figura 12: Ensaio de oxidação do NADPH utilizando a proteína Prx2 pré tratada com compostos naturais. O ensaio de oxidação do NADPH foi realizado para avaliar a atividade peroxidásica de Prx2 após tratamento com 30 equivalentes molares dos compostos naturais (▼) NC-EK1, NC-EK2, NC-LS1, NC-LS2, NC-LS3, NC-LS5, NC-HP1, NC-ABP1, NC-CA1 e NC-LG1. As reações contendo 0,6 μM da proteína tratada, ScTrx1 (5 μM), ScTrxR (0,08 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7,0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM) foram pré-incubadas a 30°C por 3 minutos, iniciadas pela adição de 100 μM de H₂O₂ e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 30°C, por 5 minutos.

Controle positivo (▲): proteínas sem tratamento prévio com os compostos. Controle de inibição (●): proteínas previamente tratadas com NEM (30 eq. molares). Controle negativo (■): reações sem adição de Prx2.

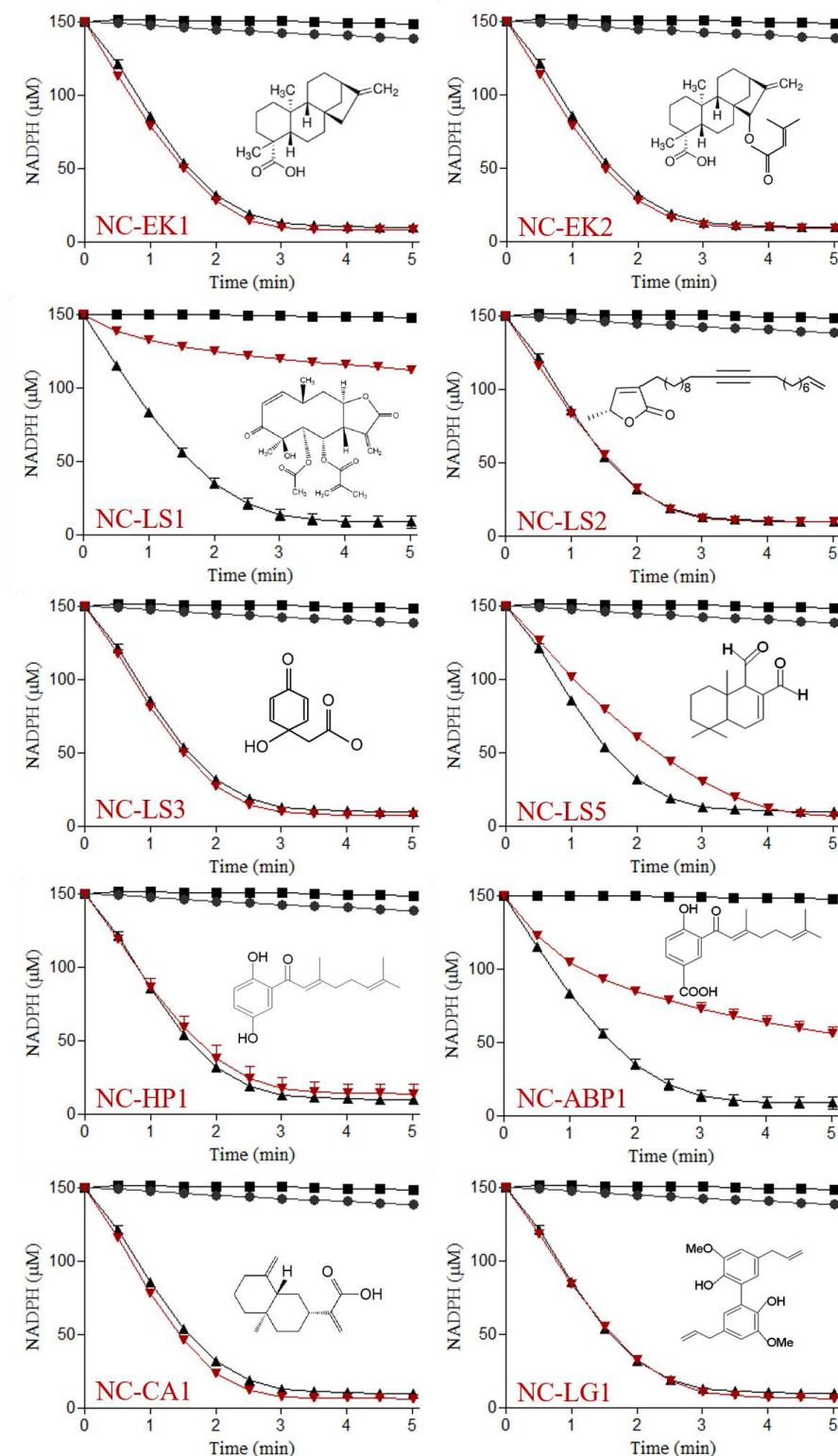


Figura 13: Ensaio de oxidação do NADPH utilizando a proteína Tsa1 pré tratada com compostos naturais. O ensaio de oxidação do NADPH foi realizado para avaliar a atividade peroxidásica de Tsa1 após tratamento com 30 equivalentes molares dos compostos naturais (▼) NC-EK1, NC-EK2, NC-LS1, NC-LS2, NC-LS3, NC-LS5, NC-HP1, NC-ABP1, NC-CA1 e NC-LG1. As reações contendo 1 μM da proteína tratada, ScTrx1 (2 μM), ScTrxR (0,3 μM), NADPH (150 μM), HEPES (50 mM, pH=7.0), DTPA (100 μM) e azida sódica (1 mM) foram pré-incubadas a 30°C por 3 minutos,

iniciadas pela adição de 500 μM de H_2O_2 e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 30°C, por 5 minutos. Controle positivo ($\blacktriangle$): proteínas sem tratamento prévio com os compostos. Controle de inibição ($\bullet$): proteínas previamente tratadas com NEM (30 eq. molares). Controle negativo ($\blacksquare$): reações sem adição de Tsa1.

Nossos resultados demonstram, nas condições testadas, que os compostos NC-EK2 e NC-HP1 apresentaram uma inibição diferencial entre as enzimas, inibindo significativamente a atividade peroxidásica de Prx2, mas não de Tsa1 (Fig. 12B e 13B) e, em contraste, o composto NC-LS1 apresentou uma alta taxa de inibição para Tsa1 (decréscimo de $\sim 79\%$ na velocidade inicial da reação - Tabela 1) e nenhuma alteração na atividade de Prx2. Por último, o composto NC-ABP1 apresentou uma taxa de inibição significativa para ambas as enzimas, que pôde ser mensurada por dois métodos: cálculo da velocidade inicial da reação (Tabela 1) e cálculo da porcentagem relativa do consumo de NADPH (Fig. 14).

Tabela 1. Velocidade inicial (v_0) das reações das enzimas Tsa1 e Prx2 tratadas com os compostos naturais da biota florística brasileira. Foram utilizados os dados do ensaio acoplado de oxidação do NADPH para obter as velocidades iniciais das reações pelo software GraphPad Prism. As variações correspondem ao valor dos tratamentos das enzimas com os compostos, retirando o valor de v_0 da enzima sem tratamento. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

v_0 ($\mu\text{M/s}$)				
Tratamento	Tsa1	Variação (Tsa1)	Prx2	Variação (Prx2)
Sem composto	1,114 ($\pm 0,035$)	0,052 ($\pm 0,035$)	0,198 ($\pm 0,010$)	0 ($\pm 0,010$)
NEM	0,039 ($\pm 0,004$)	1,127 ($\pm 0,004$)	0,009 ($\pm 0,001$)	0,189 ($\pm 0,001$)
NC-EK1	1,108 ($\pm 0,020$)	0,058 ($\pm 0,020$)	0,212 ($\pm 0,014$)	-0,015 ($\pm 0,014$)
NC-EK2	1,152 ($\pm 0,025$)	0,014 ($\pm 0,025$)	0,175 ($\pm 0,008$)	0,023 ($\pm 0,008$)
NC-LS1	0,233 ($\pm 0,022$)	0,934 ($\pm 0,022$)	0,205 ($\pm 0,016$)	-0,007 ($\pm 0,016$)
NC-LS2	1,0743 ($\pm 0,022$)	0,092 ($\pm 0,022$)	0,170 ($\pm 0,008$)	0,028 ($\pm 0,008$)
NC-LS3	1,168 ($\pm 0,033$)	-0,002 ($\pm 0,033$)	0,191 ($\pm 0,003$)	0,007 ($\pm 0,003$)
NC-LS5	0,811 ($\pm 0,009$)	0,355 ($\pm 0,009$)	0,208 ($\pm 0,007$)	-0,011 ($\pm 0,007$)
NC-HP1	1,0461 ($\pm 0,122$)	0,120 ($\pm 0,122$)	0,138 ($\pm 0,009$)	0,059 ($\pm 0,009$)
NC-ABP1	0,615 ($\pm 0,050$)	0,551 ($\pm 0,050$)	0,109 ($\pm 0,018$)	0,089 ($\pm 0,018$)
NC-CA1	1,181 ($\pm 0,013$)	-0,015 ($\pm 0,013$)	0,173 ($\pm 0,006$)	0,024 ($\pm 0,006$)
NC-LG1	1,099 ($\pm 0,026$)	0,067 ($\pm 0,026$)	0,164 ($\pm 0,003$)	0,033 ($\pm 0,003$)

Para avaliar a ligação desses compostos às cisteínas das Prx foi utilizado SDS-PAGE não redutor (sem adição de DTT às amostras), onde o tratamento com um inibidor capaz de se ligar covalentemente a C_P ou C_R pode ser detectado através do monitoramento da forma dimérica e monomérica das Prx 2-Cys por meio do SDS-PAGE (Liu et al., 2012). De fato, estas enzimas se apresentam em solução como decâmeros, mantidos por interações fracas de caráter polar e hidrofóbica, as quais são rompidas pelas propriedades denaturantes do SDS. A forma reduzida da

proteína é detectada em SDS-PAGE não redutor como monômeros de ~23 kDa (Fig. 15). Quando a proteína é oxidada por hidroperóxidos há formação de dímeros mantidos por ligação dissulfeto entre C_P e C_R de diferentes monômeros ($C_P S-SC_R$), portanto nessas condições ocorre um predomínio das formas diméricas (Fig. 15).

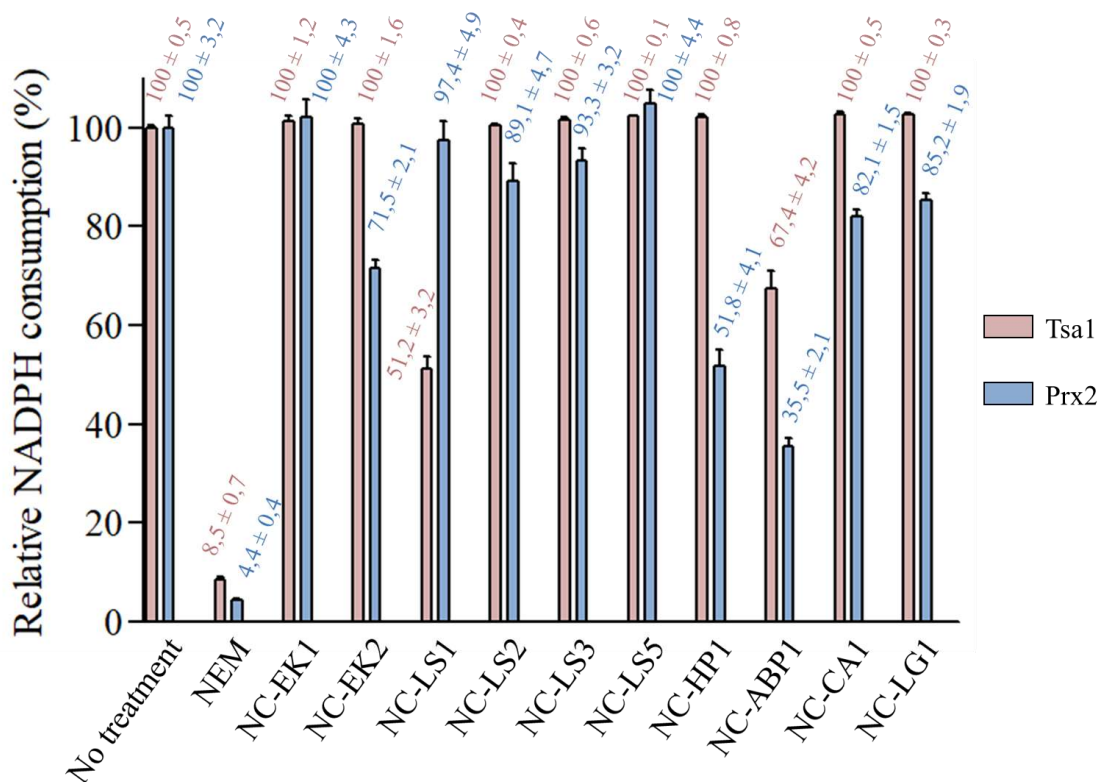


Figura 14: Consumo relativo do NADPH após tratamento das enzimas os com compostos naturais. Foram utilizados os dados finais das reações do ensaio acoplado de NADPH com as enzimas tratadas, para plotar o gráfico comparativo de consumo relativo do NADPH de acordo com a atividade máxima de cada enzima. Em rosa e azul estão representados os dados referentes a Tsa1 e Prx2, respectivamente.

Por fim, quando ocorre uma ligação covalente (formação de espécies $C_P S$ -Inibidor ou $C_R S$ -Inibidor) podem ser observadas duas diferentes formas em SDS-PAGE: dimérica e monomérica. Na forma dimérica ocorre a ligação do inibidor somente a uma subunidade do dímero, sendo que o tratamento com hidroperóxidos leva a formação de dissulfeto na outra subunidade. Esta espécie possui resistência aumentada de migração no SDS-PAGE fazendo com que a proteína apareça levemente superior a forma oxidada. Quando um inibidor reage com ambas as cisteínas do dímero ocorre o aparecimento de formas monoméricas. Os resultados com os compostos naturais são apresentados na figura 16.

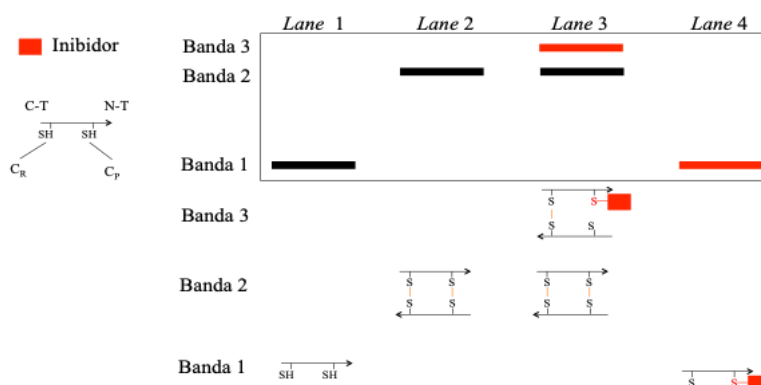


Figura 15: Diagramas de formas reduzidas, oxidadas e contendo um inibidor ligado à C_P de Prx 2-Cys típicas. A esquerda é representado um inibidor pelo quadrado vermelho e um monômero de Prx 2-Cys típica com a localização de C_P na posição N-terminal. A direita está representado um diagrama de gel de poliacrilamida, sendo que a banda 1, lane 1, corresponde à proteína reduzida a qual é detectada como monômero em SDS-PAGE. A banda 2, na lane 2, representa um dímero totalmente oxidado, situação que ocorre após tratamento com H₂O₂. Na lane 3 está representado o resultado de uma proteína tratada com inibidor e em seguida oxidada com H₂O₂, em que somente parcela de C_P reagiu com o inibidor gerando a banda 3 (vermelha), a qual possui migração mais lenta em SDS-PAGE quando comparado com a forma mais compacta que possui dois dissulfetos, novamente representada pela banda 2. Por fim, na lane 4, está representado o resultado esperado em uma situação em que o inibidor reage totalmente com as C_P, e um posterior tratamento com H₂O₂ não é capaz de produzir dissulfetos intermoleculares em razão do bloqueio das cisteínas peroxidásicas pelo inibidor.

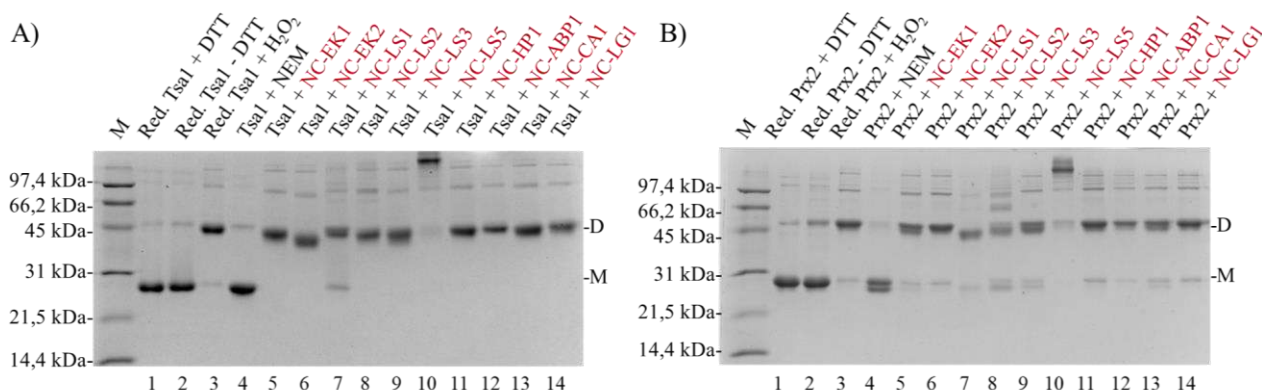


Figura 16: Resultado de SDS-PAGE não redutor para avaliação da ligação dos compostos naturais com as cisteínas de Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *H. sapiens*. As alíquotas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e coradas com coomassie blue. Para a ligação dos compostos às cisteínas envolvidas na catálise de Tsa1 (A) e Prx2 (B), as proteínas foram reduzidas com DTT e uma alíquota contendo DTT foi diretamente aplicada ao gel de poliacrilamida (lanes 1). Para o restante das amostras, o excesso de DTT foi removido por cromatografia de filtração em gel, e uma alíquota foi aplicada no gel (lanes 2) e outra alíquota foi tratada com H₂O₂ para formação de dissulfetos (lanes 3). Em seguida, as amostras foram submetidas a tratamentos com NEM (controle de ligação à cisteínas) ou com os compostos naturais. O excesso das moléculas foi removido por filtração em gel e a amostra foi tratada com H₂O₂ para formação de dissulfetos (lanes 4).

Os resultados revelaram que quando o DTT é mantido na amostra, as enzimas são detectadas essencialmente como monômeros (Fig. 16, lane 1). No entanto, quando o DTT é removido por filtração em gel, parcela da enzima reduzida é detectada como dímero (Fig. 16, lane 2). Este resultado é explicado pela oxidação de C_P pelo O₂ atmosférico ou por sua reação com diminutas quantidades de H₂O₂ que podem estar presentes no tampão utilizado (Cox et al., 2010). Este fenômeno já foi observado previamente por nosso grupo para Tsa1 (Cox et al., 2009; Tairum et al., 2012) e por outros pesquisadores para Prx2 humana (Low et al., 2008).

Após tratamento com os compostos naturais e retirada do excesso dos mesmos, foi verificado que o composto NC-LS1 foi capaz de produzir espécies monoméricas em Tsa1, indicando bloqueio das cisteínas da Prx, assim como o controle (NEM). Entretanto, os compostos NC-EK2 e NC-HP1 que apresentaram uma atividade inibitória sobre Prx2 (Fig. 12) ou NC-ABP1 que apresentou atividade inibitória para ambas as enzimas, aparentemente inibem por mecanismos distintos, uma vez que não foram detectadas espécies monoméricas no SDS-PAGE, o que indica uma provável ligação do tipo reversível, que só pode ser investigada através de ensaios bioquímicos de competição enzimática entre substrato e inibidor. Por último, foi evidenciado para ambas as proteínas que o composto NC-LS5 sugere uma alteração na estrutura da proteína, uma vez que não são detectadas espécies diméricas ou monoméricas, e sim, uma banda acima de 97,4 kDa, curiosamente, para Prx2, onde o evento de repete, não há nenhuma inibição aparente da atividade peroxidásica.

Em conjunto, nossos resultados indicam que os compostos naturais NC-EK2, NC-LS1, NC-HP1 e NC-ABP1 são promissores, dentre as moléculas selecionadas neste trabalho, para avaliação do potencial inibitório diferencial entre as Prx, atuando aparentemente de formas distintas.

4.4 Tsa1 de *S. cerevisiae* como modelo biológico para a inibição de Prx 2-Cys de leveduras patogênicas

Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a determinar a estrutura de uma Prx 2-Cys típica contendo um ligante no sítio ativo (Oliveira et al., 2007; Tairum et al., 2012). A estrutura determinada foi a de Tsa1 decamérica (Fig. 17A-C) ligada a uma molécula de ditioneitol (DTT) (Fig. 17E). Análises realizadas no âmbito deste estudo revelam que o sítio ativo está localizado na região de junção entre os dímeros do decâmero e a Thr⁴⁴ faz interações CH-- π com Tyr⁷⁷ (Fig. 17E). Também determinamos quais são os AA responsáveis pela estabilização do ligante (Fig. 17F). Os resíduos Pro⁴⁰, Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Val⁴⁶, Pro¹⁴³, Val¹⁶⁷ e Pro¹⁸¹ estão envolvidos em uma rede de interações hidrofóbicas que permitem acomodar o ligante no bolsão do sítio ativo de Tsa1. Adicionalmente, átomos das cadeias principais dos resíduos Leu⁴¹ e Leu¹⁴², e das cadeias laterais de Thr⁴⁴, Cys⁴⁷ (C_P), Tyr⁷⁷ e Arg¹²³, respondem por interações polares. É importante ressaltar que os resíduos que compõe a tríade catalítica (Thr⁴⁴, C_P e Arg¹²³) realizam interações polares diretas ou indiretas com o ligante, e que a Tyr⁷⁷ efetua uma ligação polar com um átomo de S da molécula de DTT, o que evidencia a importância deste resíduo na interação com substratos.

Em seguida, avaliamos a conservação dos resíduos responsáveis pela estabilização do ligante no sítio ativo de Tsa1 em leveduras patogênicas. Os resultados revelam que no gênero *Candida* (com exceção de *C. krusei* que apresenta a substituição Leu⁴²→Met⁴²) e em *R. mucilaginosa*, todos os AA envolvidos na estabilização do substrato em Tsa1 de *S. cerevisiae* são totalmente conservados, o que sugere fortemente que Tsa1 de *S. cerevisiae*, bem como o próprio organismo, possa ser utilizado

como modelo biológico para o estudo de inibidores de Prx 2-Cys típicas de leveduras patogênicas (Fig. 18).

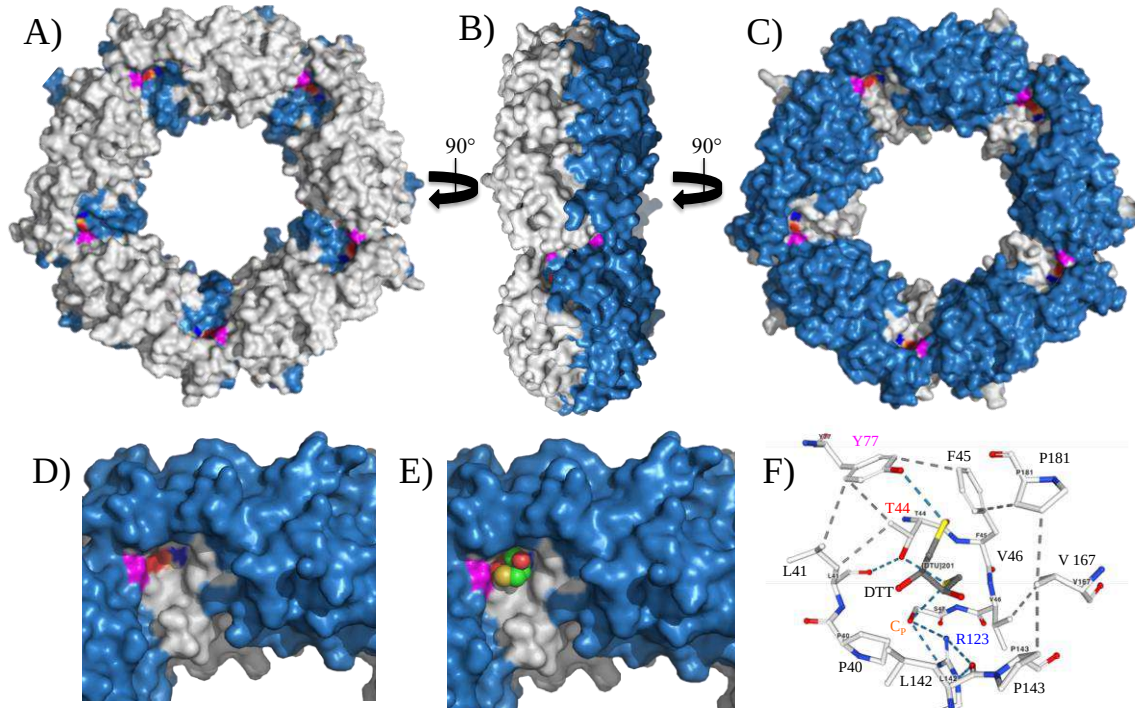


Figura 17: Superfície molecular e interações de resíduos de AA do sítio ativo de Tsa1 de *S. cerevisiae*. A-C) Diferentes orientações do decâmero de Tsa1 de *S. cerevisiae* (PDB = 3SBC), onde cada monômero do dímero obrigatório está colorido em branco ou azul. Os AA da tríade catalítica estão coloridos em vermelho (Thr), laranja (C_P) e azul (Arg). O resíduo de Tyr⁷⁷ que faz interação CH--π com Thr está representado em lilás. D) Detalhe do sítio ativo de Tsa1 onde a molécula de DTT foi omitida. E) Decâmero de Tsa1 com molécula de DTT representada em esferas (C = verde; O = vermelho; N = azul e S = laranja). F) AA envolvidos na estabilização do ligante (DTT) no sítio ativo da enzima. As linhas cinzas representam interações de caráter apolar e as linhas azuis claro, interações polares. Os resíduos estão representados pelo código de uma letra. As cores das fontes para os resíduos da tríade catalítica bem como da Tyr⁷⁷ seguem as cores estabelecidas nas figuras de A-E.

Sc_Tsa1/1-196	1	-----MVAQVQKQAP	1	KKTAVVDGV	1	DEVS	1	DKYK	1	QYVVLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	AFSEAAKK	1	EEQGAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KEGCLGP	1	INIP	1	100
Sc_Tsa2/1-196	1	-----MVAEQVQKQAP	1	KKTAVVDGI	1	DEEIS	1	LEKYK	1	QYVVLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	AFSEAAKK	1	EDQGAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VKVP	1	100
Ca_Tsa1/1-196	1	-----MAPVQVQKQAP	1	KKTAVVDGV	1	EEVTL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSDAVKK	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	TWLLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VDVP	1	100
Cau_Tsa1/1-196	1	-----MTAIIQKPA	1	KKTAVVDGV	1	EEVTL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSDAVKK	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	100
Cg_Prx/1-198	1	-----MVAQVQKQAP	1	KKTAVVDGV	1	EEVTL	1	LEQYK	1	QYVVLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	AFSEAAKK	1	EDQGAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VDIP	1	100
Cgu_Tsa1/1-196	1	-----MVAIIQKPA	1	KKTAVVDGV	1	EEVTL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSDAVKK	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	100
Cl_Tsa1/1-196	1	-----MVVPSIQKPA	1	KKTAVVNGT	1	EEVSL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSEAKKE	1	KEKNCEI	1	LMAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	AEGLGP	1	101
Cp_Prx/1-196	1	-----MAAIIQKPA	1	KKTAVVDGV	1	EEVSL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSEAAKK	1	ADKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	100
Cp_Tsa1/1-196	1	-----MAPVQVQKQAP	1	KKTAVVDGV	1	EEVSL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSDAVKK	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	100
Rm_Tsa1/1-200	1	-----MVARVQKPA	1	EATAVVDGF	1	ETVKL	1	LEQYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	LAFAERLAD	1	EKLGEV	1	LVAV	1	TDSEY	1	SHLAWANTH	1	NEGLGP	1	101
Bb_Tsa1/1-195	1	-----MTLTIEKPA	1	KKTAVVNGE	1	KTVSL	1	SDYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	IAYSDAVKK	1	AEKNCKI	1	LFAS	1	TDSEY	1	DLAWTNIP	1	ADGLGP	1	100
Cn_Tsa1/1-197	1	-----MATYTLPIQKPA	1	AGTAVKES	1	EEIKL	1	ADYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	LAFAERLAD	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	105
Cgt_Tsa1/1-197	1	-----MATYTLPIQKPA	1	AGTAVKES	1	EEIKL	1	ADYK	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	LAFAERLAD	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	105
Rd_Tsa1/1-201	1	-----MVIQIARVQKPA	1	STAPAVGDE	1	KDLS	1	KDYS	1	QKWLAF	1	LAFTFVCPTEI	1	LAFAERLAD	1	AEKDAQVLFAS	1	TDSEY	1	LLAWTNIP	1	KDGGCLGP	1	VNIP	1	98

Figura 18: Alinhamento das sequências de AA de Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx 2-Cys típicas de leveduras patogênicas. O alinhamento das sequências de AA foi executado utilizando o Clustal Ω e as figuras foram geradas com o programa Jalview. Resíduos idênticos estão realçados em vermelho e tons mais claros representam a conservação entre as espécies.

As setas indicam AA conservados necessários para estabilização do ligante no sítio ativo de Tsa1 de *S. cerevisiae*, sendo as pretas para interações hidrofóbicas e as azuis para interações polares. AA da tríade catalítica são discriminados pelo asterisco (*) sendo azul para Arg, vermelho para Thr e laranja para C_p. As caixas verdes denotam AA conservados entre *S. cerevisiae* e todos as espécies de *Candida* e de *R. mucilaginosa*. As abreviações utilizadas e códigos de acesso ao Uniprot (www.uniprot.org) são: Tsa1 de *S. cerevisiae* = Sc_Tsa1 (Uniprot: P34760); Tsa1 de *C. albicans* = Ca_Tsa1 (Uniprot: Q9Y7F0); Tsa1 de *C. auris* = Cau_Tsa1 (Uniprot: A0A0L0P0E1); Tsa1 de *C. glabrata* = Cg_Tsa1 (Uniprot: Q6FMP9); Tsa1 de *C. guilliermondii* = Cgu_Tsa1 (Uniprot: A5DHN0); Tsa1 de *C. krusei* = Ck_Tsa1 (Uniprot: A0A099NYV6); Tsa1 de *C. parapsilosis* = Cp_Tsa1 (Uniprot: G8BJ65); Tsa1 de *C. tropicalis* = Ct_Tsa1 (Uniprot: C5M9R4); Tsa1 de *Clavispora lusitaniae* = Cl_Tsa1 (Uniprot: C4Y612); Tsa1 de *Brettanomyces bruxellensis* = Bb_Tsa1 (Uniprot: I2JY42); Tsa1 de *C. neoformans* = Cn_Tsa1 (Uniprot: A0A225Y4R0); Tsa1 de *C. gattii* = Cgt_Tsa1 (Uniprot: A0A095C9F1); Tsa1 de *Rhizopus deleamar* = Rd_Tsa1 (Uniprot: I1CHP1); Tsa1 de *R. mucilaginosa* = Rm_Tsa1 (obtido pelo transcriptoma da levedura realizado por nosso grupo de pesquisa).

No caso de *C. lusitaniae*, *C. neoformans* e *C. gattii*, dos doze AA identificados somente dois são substituídos em *C. lusitaniae* (Leu⁴²→Met⁴²; Tyr⁷⁷→Phe⁷⁷) e três são substituídos em *C. neoformans* e *C. gattii* (Leu⁴²→Met⁴²; Tyr⁷⁷→Phe⁷⁷; Pro¹⁸¹→Thr¹⁸¹). Para *R. deleamar*, ocorre a substituição Leu⁴²→Met⁴² e a deleção de cinco AA que exclui Tyr⁷⁷. Neste contexto, as diferenças ainda são sutis e podem resultar em uma maior/menor afinidade de ligação de inibidores de Prx 2-Cys típicas de fungos.

4.5 Avaliação das interações enzima-inibidor in silico

Para avaliar a interação entre os compostos com potencial inibitório e as proteínas alvo do trabalho, foi utilizado o *docking* molecular, utilizando o programa AutoDock (seção Materiais e Métodos). Tanto Tsa1, quanto Prx2, possuem estrutura cristalográfica resolvida (Schröder et al., 2000; Tairum et al., 2012), disponíveis no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), sendo utilizadas as coordenadas 3SBC e 1QMV, respectivamente (Fig. 19A e 19B) preparadas de acordo com os procedimentos descritos na seção Materiais e Métodos. Inicialmente, foram selecionados os compostos Adn e NC-LS1, pois demonstraram inibição sobre atividade peroxidásica das enzimas (Fig. 12 e 13) e interferem na formação de dissulfeto em ensaio de SDS-PAGE não redutor (Fig. 15). Posteriormente, foi realizado o estudo com o composto NC-EK2, também pertencente a classe dos *ent*-caurânos e identificado como inibidor de Prx2. As estruturas foram obtidas através do PubChem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) para Adn e NC-LS1 e construídas utilizando o MolView (<https://molview.org/>) para NC-EK2 (Fig. 19C, 19D e 19E).

Uma vez que há limitações computacionais em razão do tamanho das proteínas (os decâmeros possuem cerca de 2.000 resíduos de AA), foram submetidos ao *docking* as proteínas na forma tetramérica, para que pudessem ser analisadas as interações que também ocorrem na interface D, pois estudos anteriores revelaram que o sítio ativo destas enzimas se encontra nessa interface D do decâmero (Schroder et al., 2000; Tairum et al., 2016), realizando interação com resíduos do dímero

adjacente (Fig. 19A e 19B, inserto) e, ressaltam a importância do decâmero para a decomposição catalítica do substrato (Wood et al., 2002; Wood et al., 2003). Portanto, para as simulações de *docking*, os tetrâmeros foram previamente preparados utilizando o programa Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera).

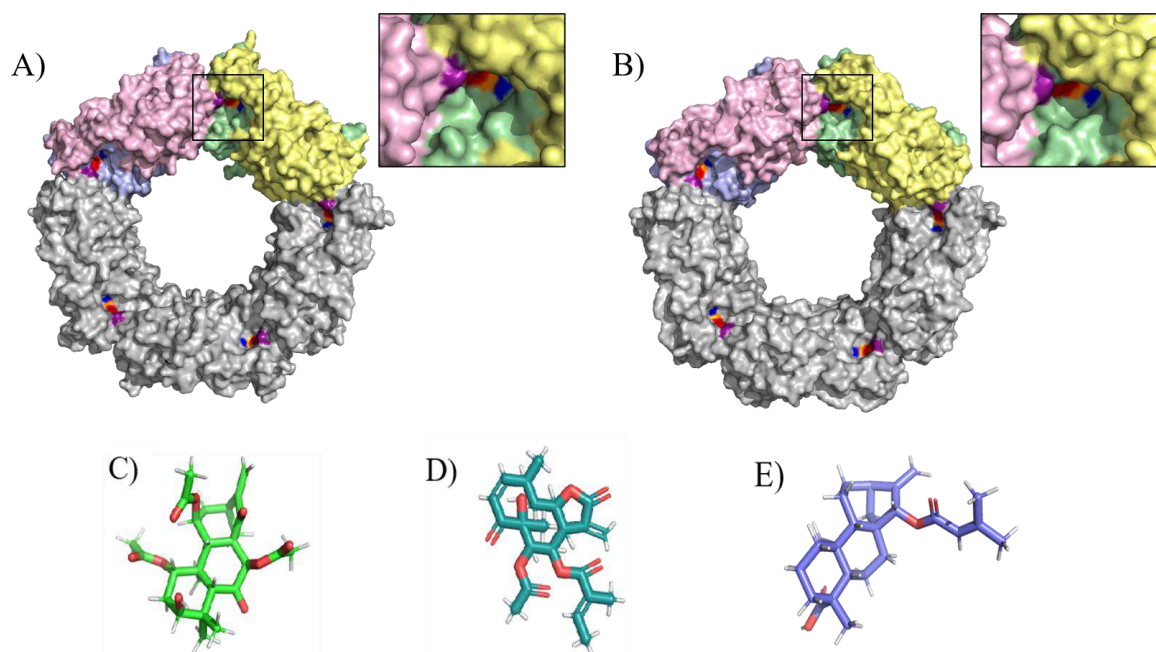


Figura 19: Estruturas cristalográficas de Tsa1 de *S. cerevisiae* e Prx2 de *H. sapiens* e estruturas tridimensionais dos compostos que apresentaram atividade inibitória sobre as proteínas deste estudo. Superfície molecular do decâmero de Tsa1 (A) e Prx2 (B) em que os dímeros do decâmero estão representados por diferentes cores (rosa, cinza, verde e purpura claro). Os AA da tríade catalítica estão colorizados da seguinte forma: C_P = laranja, Arg = azul e Thr = vermelho. Em preto está representada a Tyr⁷⁷ de Tsa1 (ou equivalente de Prx2) que foi demonstrado que é essencial para a atividade e *switching* oligomérico dímero-decâmero (Tairum et al., 2016). O inserto representa o microambiente do sítio catalítico. Estruturas moleculares da Adn (C), NC-LS1 (D) e NC-EK2 (E) representadas por *sticks* e colorizadas da seguinte forma: C = verde/azul; O = vermelho; H = branco. As representações gráficas foram geradas utilizando o programa PyMOL.

Inicialmente foram padronizadas as análises, onde os resultados de *docking* molecular geraram resultados positivos independentes, distribuídos em 16 moléculas individuais do composto, posicionadas em locais energeticamente favoráveis para a estabilização do inibidor, assim como um maior número de interações para estabilização da molécula no sítio de ligação. Para seleção e análise das melhores soluções, foram aplicados 3 critérios de seleção, onde, primeiramente, foram escolhidos, de forma geral, os *clusters* localizados próximos às cisteínas (C_P e C_R) visto que Adn e NC-LS1 impedem a formação de dímeros em SDS-PAGE (Fig. 15). Em seguida, foram selecionadas as orientações adequadas dos grupos reativos dos compostos, onde para NC-LS1 haviam 3 possíveis grupos reativos (Fig. 20D) e, para Adn, o grupo reativo já foi descrito como um Cα-β insaturado que atua como acceptor de Michael para interagir com Sγ de C_P ou C_R (Fig. 20F) (Liu et al., 2012;

Muchowicz et al., 2014). Por último, foram apuradas as soluções com distâncias de até 7 Å entre o C α - β insaturado e o S γ de C $_P$ ou C $_R$.

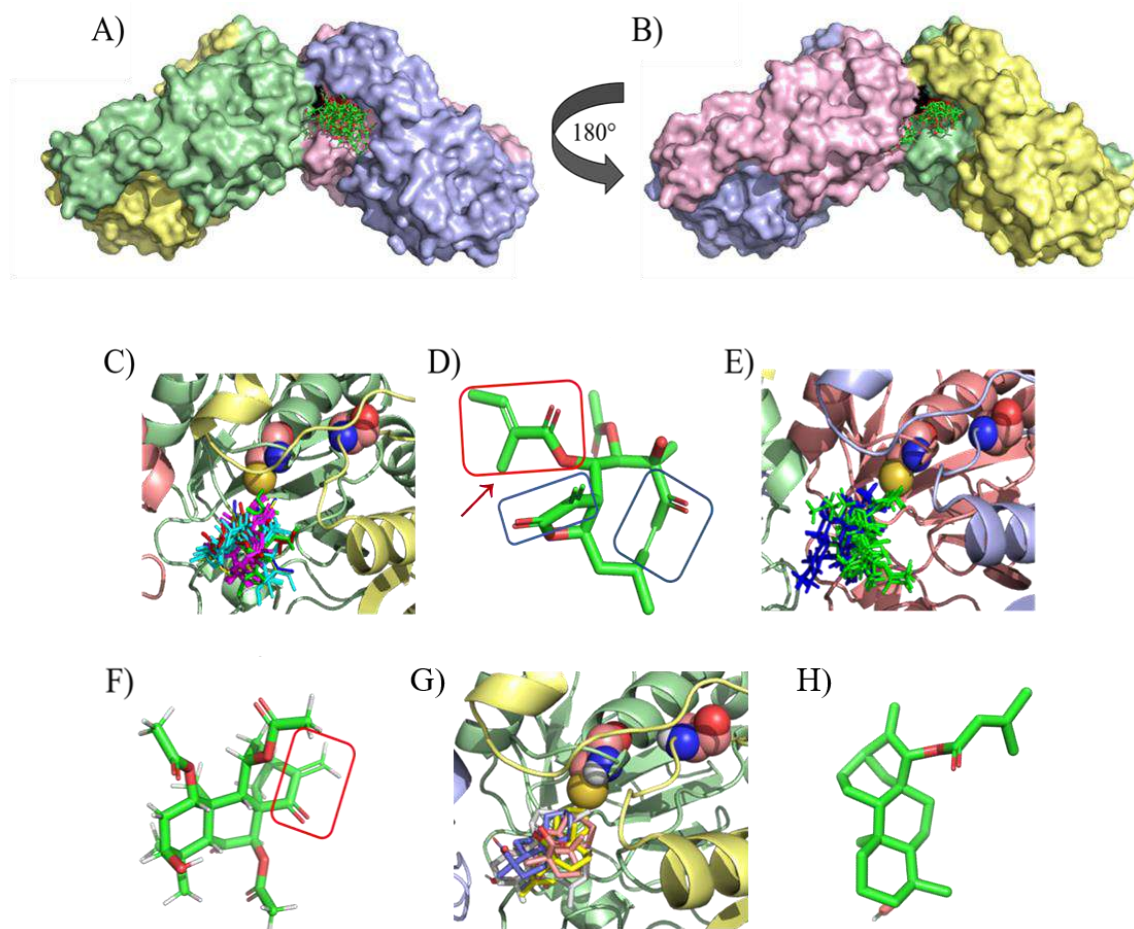


Figura 20: Distribuição dos compostos pelo tetrâmero de Prx2 e interações entre grupo funcional dos compostos e S γ de C $_P$. (A-B) Representação dos resultados de Adn disponíveis para análise representados em *lines* com colorações distintas, sobre o tetrâmero representado por superfície e colorizado de acordo com as cadeias de AA distintas. (C, E e G) Seleção de moléculas de NC-LS1, Adn e NC-EK2, respectivamente, próximos à C $_P$ ou C $_R$ da interface D, indicando uma tendência maior para C $_P$. (D) Possíveis grupos funcionais de NC-LS1, com uma seta vermelha indicando C19. (F) Grupo funcional da Adn α - β insaturado que atua comoceptor de Michael. (H) Estrutura do composto NC-EK2. As representações gráficas foram geradas com o programa PyMOL (www.pymol.org).

Após análise dos resultados obtidos em tetrâmeros distintos das enzimas e seleção das soluções que atenderam aos 3 critérios estabelecidos previamente, os resultados revelaram que todas as soluções favoráveis, para todos os compostos, se encontram próximas à C $_P$ localizada na interface D (Fig. 20C, 20E e 20G) e que, entre os possíveis grupos reativos de NC-LS1, o que recebe um destaque está colorido em vermelho envolvendo o C19 (Fig. 20D) sendo o mais recorrente nas respostas, orientado para o S γ de C $_P$. Em seguida, foram analisados os resíduos de AA envolvidos na estabilização dos compostos no sítio ativo de Tsa1 e Prx2 e os tipos de interações que ocorrem, utilizando os programas PyMOL e Discovery Studio (Fig. 21).

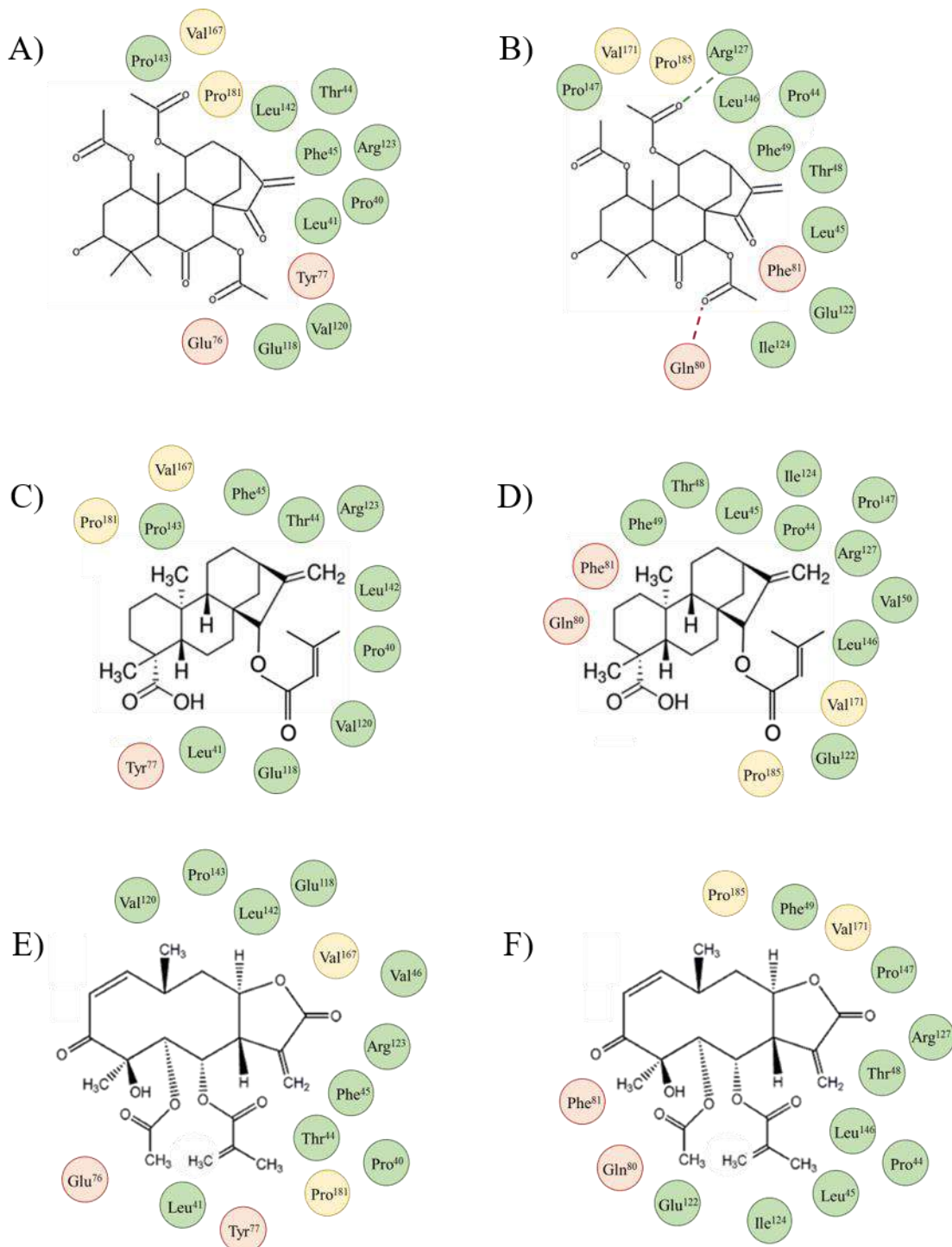


Figura 21: Resíduos de AA de Ts1 e Prx2 que estabilizam os inibidores no sítio ativo. São representadas as estruturas de Adn (A, B), NC-EK2 (C, D) e NC-LS1 (E, F) por *lines*, com os resíduos de AA que estabilizam os compostos representados por círculos, onde os resíduos pertencentes ao monômero onde se encontra a C_p de interação estão colorizados em verde, o monômero complementar em amarelo e os AA pertencentes ao dímero adjacente, colorizados em vermelho. Todos os resíduos de AA representados efetuam interações apolares com os compostos, exceto os que possuem uma linha tracejada junto ao ligante, estes representam interações polares do tipo ligação de hidrogênio.

Com os resultados obtidos com a descrição dos resíduos de AA que estabilizam os compostos na cavidade do sítio ativo da enzima, indicando a qual cadeia polipeptídica os mesmos pertencem, foi

confirmada a importância da análise e seleção das soluções favoráveis que se encontram na interface D, uma vez que todas as nossas soluções, nestas condições, interagem com os resíduos de AA Glu^{76#} e Tyr^{77#} da cadeia adjacente ao dímero em que se encontram (denotados pelo símbolo #) (Fig. 22), reafirmando a importância do *docking* ser realizado com o tetrâmero e não somente o dímero como vem sendo apresentado para os inibidores de Prx 2-Cys típicas humanas até o momento (Liu et al., 2012; Shi et al., 2017; Zhu et al., 2019), pois ainda não foram identificadas propriedades funcionais para decompor hidroperóxidos, uma vez que o sítio ativo das enzimas se encontra na interface D e é estabilizado por AA do dímero adjacente (Nelson et al., 2018; Parsonage et al., 2005; Tairum et al., 2012), sendo, o decâmero, altamente importante na manutenção da enzima ativa (Wood et al., 2002; Wood et al., 2003) e, portanto, apta a interagir com substratos.

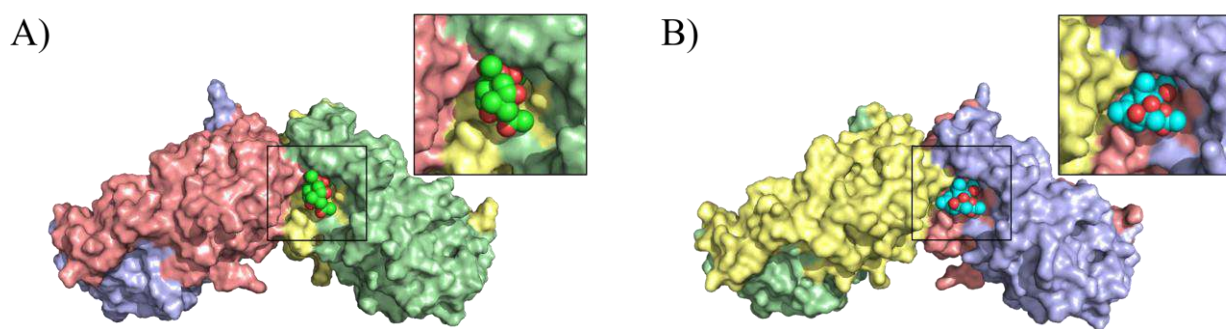


Figura 22: Importância da interface D para estabilização de ligantes. São demonstradas as estruturas do tetrâmero nomeado de ABCD de Tsa1, interagindo com as moléculas Adn (A) e NC-LS1 (B). Os tetrâmeros são representados por superfície com cada monômero colorizado diferentemente (A= azul, B = rosa; C = verde e D = amarelo), Adn e NC-LS1 são representadas em *spheres*, onde os átomos estão colorizados da seguinte forma: C = verde (Adn) ou azul (NC-LS1); O = vermelho. Os inserts representam a superfície dos AA envolvidos na estabilização dos ligantes na cavidade do sítio ativo de Tsa1. As representações gráficas foram geradas utilizando o programa PyMOL (www.pymol.org).

Os resultados das análises das interações que ocorrem entre os inibidores e Tsa1 demonstraram que, para Adn, as interações apolares ocorrem entre as cadeias laterais (SC) dos resíduos Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Glu¹¹⁸, Leu¹⁴², Val^{167*}, Pro^{181*}, Tyr^{77#} e, para o NC-LS1, há também a presença de interações apolares entre as cadeias principais (MC) dos resíduos de AA, onde: Leu⁴¹ (SC), Thr⁴⁴ (MC), Phe⁴⁵ (MC/SC), Arg¹²³ (SC), Leu¹⁴² (MC/SC), Pro¹⁴³ (SC), Val^{167*} (SC), Pro^{181*} (SC) e Tyr^{77#} (SC), indicando a ocorrência de uma rede hidrofóbica comum entre os compostos envolvendo os resíduos Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Leu¹⁴², Val^{167*}, Pro^{181*} e Tyr^{77#} dos monômeros do homodímero obrigatório e também do homodímero adjacente. Além disso, não foram encontradas interações polares significativas (~80% de representatividade entre as soluções analisadas) para para ambos os inibidores, que possuem um esqueleto hidrofóbico bastante volumoso em sua estrutura (Fig. 20D e 20F), assim como todos os inibidores já descritos para as Prx 2-Cys (Fig. 6).

Nos *dockings* executados para Prx1 de humanos e Adn foram detectados como resíduos capazes de efetuar interações com o inibidor: Leu⁴⁶, Thr⁴⁹, Phe⁵⁰, Val⁵¹, Cys⁵²(C_P), Ile¹²⁵, Arg¹²⁸, Pro¹⁴⁸ e Cys¹⁷³ (C_R) (Liu et al., 2012), os quais também foram detectados de forma equivalente em nossos procedimentos para Tsa1 (Leu⁴¹, Thr⁴⁴, Phe⁴⁵, Val⁴⁶, Cys⁴⁷(C_P), Val¹²⁰, Arg¹²³ e Pro¹⁴³) (Fig. 25), exceto por C_R, sugerindo que estes resíduos atuam de forma comum entre as duas enzimas para estabilização da Adn nos sítios ativos. Em procedimentos de *docking* utilizando Prx1 e o inibidor *ent*-caurânio JDA-202 (Fig. 6H), composto similar a Adn, Shi e colaboradores (2017) identificaram como resíduos estabilizadores a Pro⁴⁵, Leu⁴⁶, Thr⁴⁹, Phe⁵⁰, Cys⁵²(C_P), Val⁵¹ e Pro¹⁴⁸. Novamente, é importante ressaltar que apesar de diferenças em relação ao composto e as enzimas, também foram detectados resíduos equivalentes em nossos procedimentos (Pro⁴⁰, Leu⁴¹, Thr⁴⁴, Phe⁴⁵, Val⁴⁶ e Pro¹⁴³). Abordagens similares utilizando outro *ent*-caurânio, a PAA (Fig. 6), e novamente Prx1 (Zhu et al., 2019), levaram a identificação dos resíduos Cys⁵², Pro⁵³, Thr⁵⁴, Glu⁵⁵, Leu¹⁴⁷, Pro¹⁴⁸, Val¹⁴⁹, Glu¹⁵⁰, Arg¹⁵¹, Pro¹⁷⁴ e Ala¹⁷⁵, como sendo importantes para estabilização do composto no sítio ativo da enzima. Curiosamente, apesar de existirem alguns AA em comum com os outros compostos para Prx1 (Cys⁵² e Pro¹⁴⁸) este resultado é bem diferente do observado para os outros *ent*-caurânos (Adn e JDA-202), indicando uma forma de estabilização distinta desse inibidor. É importante ressaltar que em todos os procedimentos citados acima de *dockings* moleculares envolvendo Prx1 e Adn, JDA-202 e PAA, as interações detectadas foram majoritariamente de carácter apolar e poucas interações polares (2-4) foram detectadas para os diferentes compostos, a exemplo do observado também para as enzimas deste estudo.

Estes resultados sugerem elevada importância das interações apolares para estabilização de ligantes, onde todos os inibidores descritos para as Prx 2-Cys possuem uma estrutura bastante hidrofóbica (Fig. 6), o que indica uma tendência quanto aos substratos endógenos das Prx 2-Cys típicas. Neste contexto, é importante mencionar que as tiól peroxidases, incluindo as Prx, são capazes de decompor de forma bastante eficiente os peróxidos orgânicos, e, portanto, bastante hidrofóbicos. De fato, a infecção por patógenos leva a geração de altas quantidades de peróxidos de lipídeo, os quais são gerados de forma direta ou indireta por células de defesa dos hospedeiros (Halliwell & Gutteridge, 2015). Lipídeos insaturados são bastante abundantes em membranas bacterianas (Oliveira et al., 2006) e o tratamento com peróxidos de ácido graxo de cadeia longa é extremamente deletério para bactérias (Alegria et al., 2017). Recentemente demonstramos por meios de estudos estruturais, também envolvendo *docking* molecular, aliados a ensaios bioquímicos e celulares, que uma outra tiól peroxidase bacteriana em *Xylella fastidiosa*, denominada Ohr (*Organic hydroperoxide resistance protein*), é capaz de decompor peróxidos de ácidos graxos de cadeia longa com altíssima eficiência

catalítica ($10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) quando comparado com H_2O_2 ($10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sugerindo fortemente que o substrato preferencial endógeno sejam ácidos graxos de cadeia longa (Alegria et al., 2017). Adicionalmente, já foi demonstrado que uma Prx 1-Cys de *Mycobacterium tuberculosis* também apresenta alta afinidade por peróxido de ácido araquidônico ($10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), um peróxido orgânico altamente hidrofóbico (Zeida et al., 2015). Também já foi demonstrada a importância de uma Prx 2-Cys atípica de *C. albicans* (Bener Aksam et al., 2008) na decomposição de peróxidos de lipídeos, entretanto, estudos envolvendo Prx 2-Cys típicas são praticamente inexistentes.

Voltando aos resultados de Tsa1 e Prx2, é importante mencionar que a maioria dos resíduos de AA encontrados possuem importância tanto do ponto de vista estrutural, quanto funcional das Prx, como por exemplo, os resíduos Thr⁴⁴, Cys⁴⁷ (C_P) e Arg¹²³ que compõem a tríade catalítica de Tsa1, responsável pela decomposição de hidroperóxidos, altamente conservada entre as Prx (Flohé et al., 2011; Tairum et al., 2016), assim como o resíduo Pro⁴⁰ que estabiliza os inibidores no sítio ativo e realiza interação de caráter hidrofóbico com NC-LS1, e compõe o motivo Pxxx(T/S)xxC_P conhecido como C_P-Loop (Kamariah et al., 2018) que, em sua forma reduzida, possui uma dinâmica conformacional essencial para redução eficaz de hidroperóxidos, onde mutantes pontuais dos resíduos que compõem esse motivo afetam a ligação aos substratos, a catálise, oligomerização, estabilidade e hiperoxidação das Prx (Kamariah et al., 2018). Além disso, há um consenso de que Pro⁴⁰ possua um papel importante na proteção de C_P, fornecendo uma superfície hidrofóbica, dificultando reações indesejadas com o solvente (Hall et al., 2010, Wood et al., 2003). Particularmente, Arg¹²³ é fortemente posicionada em direção a C_P, mantendo a estabilização da carga negativa de tiolato por meio da interação com outros dois resíduos: Glu⁵⁰ e Pro¹⁴³ (Zeida et al., 2014), sendo o último também necessário para estabilização da Adn e NC-LS1 no sítio ativo de Tsa1. Adicionalmente, já foi descrito que Phe⁴⁵ é um resíduo importante para a especificidade da interação entre Prx e seu substrato redutor (Kamariah et al., 2018) e cabe ressaltar que todos os resíduos citados acima que realizam interações, pertencem ao mesmo monômero onde se encontra a C_P alvo dos inibidores.

Em especial, a análise da estrutura cristalográfica de Tsa1 de *S. cerevisiae* na forma reduzida (Tairum et al., 2016) revelou que o decâmero é estabilizado por várias interações não covalentes na interface D, onde, entre essas interações, o átomo C γ da Thr⁴⁴ atua como doador da ligação de H ao sistema- π da Tyr^{77#} (Fig. 17E), localizada na cadeia polipeptídica do homodímero adjacente, onde essa ligação CH- π desempenha importantes contribuições na estrutura e função destas enzimas (Tairum et al., 2012; Tairum et al., 2016). Adicionalmente, como descrito anteriormente neste trabalho, a estrutura cristalográfica de Tsa1 possui uma molécula de DTT em seu sítio ativo (Fig. 17E), o que nos permitiu fazer uma análise dos AA responsáveis pela estabilização do ligante (Fig.

17F). Neste contexto, as interações moleculares majoritariamente são oriundas de um mesmo homodímero, sendo estes os resíduos Pro⁴⁰, Leu⁴¹, Phe⁴⁵, Val⁴⁶, Pro¹⁴³, Val^{167*} e Pro^{181*}, que estão envolvidos em uma rede de interações hidrofóbicas permitindo a acomodação do ligante no bolsão do sítio ativo e, átomos das cadeias principais dos resíduos Leu⁴¹ e Leu¹⁴², e das cadeias laterais de Thr⁴⁴, Arg¹²³ e a Tyr^{77#} do dímero adjacente, respondendo por interações polares. Nossos resultados de *docking* molecular de Tsa1 + Adn/NC-LS1 nos parecem coerentes, uma vez que todos os resíduos de AA envolvidos na estabilização do ligante DTT, cristalizado juntamente a proteína, estão envolvidos também na simulação de ligação com o inibidor, e reproduziram respostas similares em todos os sítios ativos distintos entre os tetrâmeros analisados, reafirmando também o uso de Tsa1 de *S. cerevisiae* como um modelo para o estudo de inibidores de leveduras patogênicas como, por exemplo, as do gênero *Candida*, uma vez que também possuem estes resíduos conservados (Fig. 18). Mais uma vez, é importante ressaltar a importância do homodímero adjacente, onde além da Tyr^{77#} também foram detectadas interações com Glu^{76#}, indicando a importância das interações com o dímero adjacente para acomodação dos substratos.

4.6 Avaliação do potencial fungicida dos compostos identificados como inibidores de Tsa1 sobre *S. cerevisiae*

Uma vez que os compostos NC-LS1, NC-LS5 e NC-ABP1 apresentaram uma atividade inibitória sobre Tsa1 de *S. cerevisiae*, iniciamos a padronização da metodologia para avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) dos compostos e avaliar seus efeitos sobre esta levedura (seção Materiais e Métodos). Os resultados indicaram uma ação citotóxica apenas para o composto NC-LS5, uma vez que a inibição do crescimento celular não está relacionada a citotoxicidade gerada pelo veículo (DMSO) onde estes compostos estão diluídos (Fig. 23).

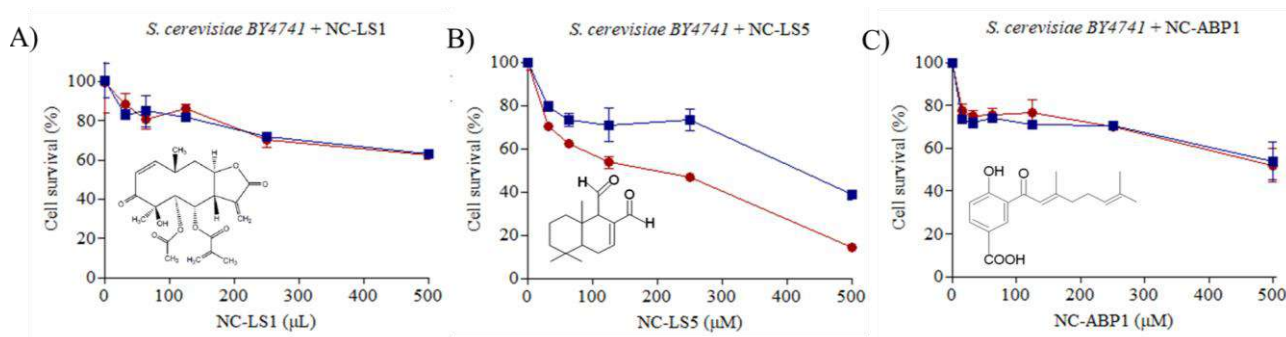


Figura 23: Avaliação da concentração inibitória mínima dos compostos naturais inibidores de Tsa1 sobre *S. cerevisiae* BY4741. Para o ensaio de MIC, as células de *S. cerevisiae*, na concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio YPD contendo concentrações crescentes de NC-LS1 (0, 31.25, 62.5, 125, 250 e 500 μM) e incubados por 18 horas à 30°C e 250 rpm em agitador orbital, e depois quantificados espectrofotometricamente a 600nm.

Como já citado anteriormente, a anfotericina B (AMB) é um fármaco amplamente utilizado no combate aos fungos patogênicos, impedindo a biossíntese de ergosterol e o crescimento celular, e também já foi descrito por Belenky e colaboradores que eleva os níveis intracelulares de EROs. Neste contexto, uma abordagem interessante seria a avaliação da citotoxicidade na atuação de antifúngicos que elevam os níveis de EROs, em conjunto com inibidores das enzimas antioxidantes destes micro-organismos. Portanto, inicialmente, determinamos o MIC₅₀ de AMB sobre *S. cerevisiae* BY4741 como 196.33 ± 7.56 ng/mL (Fig. 24) e, em seguida, foi avaliada a sua ação em conjunto com os compostos inibidores de Tsa1 de *S. cerevisiae* (Fig. 25).

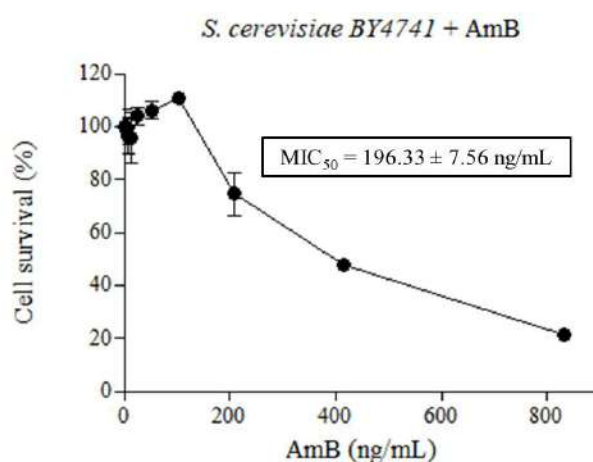


Figura 24: Determinação da concentração inibitória mínima de AMB sobre *S. cerevisiae* BY4741. Para o ensaio de MIC, as células de *S. cerevisiae*, na concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio YPD contendo concentrações crescentes de AMB (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 ng/mL) e incubados por 18 horas à 30°C e 250 rpm em agitador orbital, e depois quantificados espectrofotometricamente a 600nm.

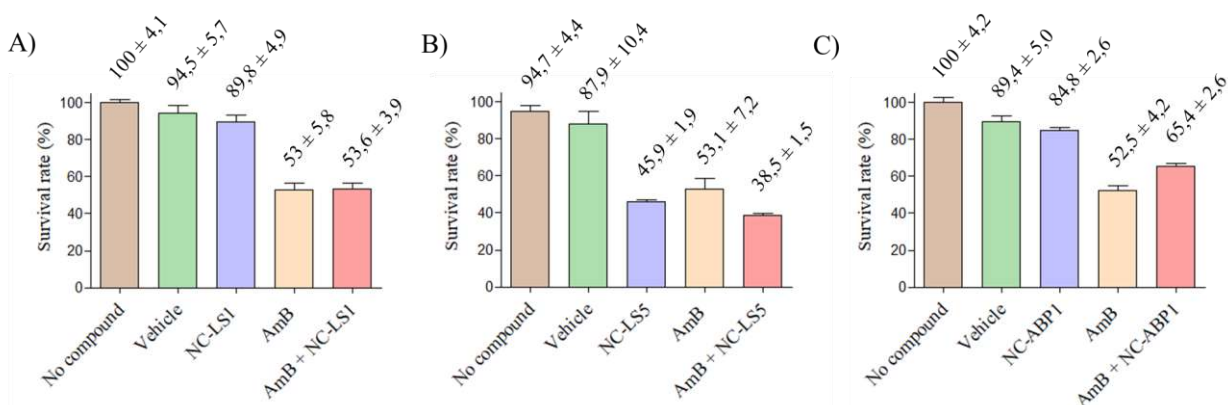


Figura 25: Atuação em conjunto do antifúngico AMB e compostos naturais inibidores de Tsa1 de *S. cerevisiae* in vivo. Para este ensaio, as células de *S. cerevisiae*, na concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio YPD contendo 125 μ M dos compostos NC-LS1, NC-LS5 e NC-ABP1 ou 200 ng/mL de AMB ou os dois em conjunto, e incubados por 18 horas à 30°C e 250 rpm em agitador orbital, e depois quantificados espectrofotometricamente a 600nm.

De forma geral, apesar da abordagem promissora da utilização dos compostos bioativos, não foi possível detectar significativamente uma queda na sobrevivência celular quando realizado o tratamento dos compostos naturais em conjunto com o antifúngico AMB. Entretanto, outras

abordagens devem ser investigadas, como por exemplo, a utilização de outras linhagens de *S. cerevisiae*. O composto NC-LS5, pertencente a classe das lactonas sesquiterpenicas, apresentou uma ação citotóxica para a levedura (Fig. 23), inibindo diferencialmente a atividade da enzima Tsa1 (Fig.15) e aparentemente, interferindo na estrutura da enzima, sendo apresentada em SDS-PAGE não redutor como estruturas acima de 97,4 kDa (Fig. 16).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o desenvolvimento deste projeto foram padronizadas e executadas metodologias do ensaio de oxidação do DTT e ensaio acoplado de oxidação do NADPH, assim como a determinação de IC₅₀, para averiguação da inibição da atividade das enzimas Tsa1 e Prx2 por compostos naturais oriundos da biota brasileira, avaliando as interações desses compostos com as cisteínas das enzimas por meio de SDS-PAGE não redutor. O isolamento e caracterização dos compostos foi efetuado em parceria com os grupos de pesquisa dos Profs. Dr. João H. G. Lago e Dr. Rodrigo L.O.R. Cunha da Universidade Federal do ABC (UFABC). Foi possível identificar cinco compostos oriundos da biota costeira do Brasil que apresentaram propriedades inibitórias sobre as Prx 2-Cys típicas de humano e/ou levedura: NC-EK2, NC-LS1, NC-LS5, NC-HP1 e NC-ABP1. É importante ressaltar que estes compostos possuem como característica comum um esqueleto hidrofóbico volumoso, assim como a maioria dos inibidores já descritos para esta classe de proteínas (Fig. 6). Estes resultados nos parecem bastante importantes, uma vez que esta característica é bastante recorrente para os inibidores identificados até o presente momento. Outro ponto importante se refere ao modo de inibição desses compostos, onde NC-LS1, NC-LS5, NC-HP1 e NC-ABP1 possuem sistemas carbonílicos α,β -insaturados, que podem efetuar reações químicas do tipo adição de Michael e bloquear resíduos de cisteína, o que caracteriza um inibidor do tipo irreversível, assim como inibidores já identificados para as Prx de humanos como Adn, JDA-202 e PAA. Já o NC-EK2 não possui esse sistema α,β -insaturado, mas possui uma estrutura similar a de Adn, JDA-202 e PAA, uma vez que pertence a mesma classe química (*ent-caurânio*), o que sugere mecanismos de inibição distintos, possivelmente por meio de uma inibição reversível competitiva. Entretanto, para chegar a quaisquer conclusões, análises bioquímicas adicionais são necessárias. Efetuamos também ensaios para avaliar o MIC (*minimal inhibitory concentration*) utilizando células de *S. cerevisiae* (BY4741) e os compostos identificados como inibidores de Tsa1 e o composto NC-LS5 revelou-se capaz de inibir o crescimento da levedura em baixas concentrações.

Em razão da pandemia do COVID-19 foi inevitável que as atividades práticas de pesquisa fossem comprometidas e, mesmo com retomadas de atividade, ocorreram interrupções em razão de novas variantes, segunda onda e o adoecimento de membros do laboratório e familiares. De forma a evitar grandes prejuízos no desenvolvimento do projeto e para a pós-graduação, optamos por desenvolver atividades não previstas inicialmente no projeto. Neste contexto, todos os créditos necessários para obtenção do título de mestre foram integralizados e, como alternativa das atividades práticas, optamos por efetuar um treinamento em análises computacionais inicialmente envolvendo o *docking* molecular com os compostos identificados como inibidores de das enzimas que se ligam

às cisteínas (Adn e NC-LS1) e pertencentes a classe dos *ent*-caurânos (NC-EK2). Os resultados das simulações revelaram que todos os compostos se alojaram majoritariamente próximos à C_P e demonstram que existem pequenas diferenças entre os AA envolvidos na estabilização dos compostos, entretanto, para ambos os compostos (Adn e NC-LS1), as interações são majoritariamente de caráter apolar envolvendo cadeias laterais (SC) e/ou principais (MC) de AA como Leu⁴¹ (SC), Phe⁴⁵ (MC/SC), Tyr^{77#} (SC), Leu¹⁴² (MC/SC), Val^{167*} (SC) e Pro¹⁸¹ (SC). Comparações com resultados obtidos de Adn ou compostos similares (JDA-202 e PAA) efetuados por outros grupos de pesquisa, utilizando Prx1 de humanos, revelam que AA equivalentes desempenham função similar na estabilização dos compostos no sítio ativo da enzima. Em conjunto, os resultados indicam que interações de caráter hidrofóbico, não só do dímero contendo os resíduos catalíticos, mas também de aminoácidos do dímero adjacente, são de grande importância para a estabilização de inibidores no sítio ativo das Prx 2-Cys típicas, o que também leva a especulações sobre os substratos endógenos dessas enzimas. De fato, as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor uma grande variedade de hidroperóxidos, incluindo peróxidos de lipídeos altamente hidrofóbicos, e já foi identificada a interação de Prx2 de humanos com elementos da membrana celular (Bayer et al., 2016). 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. Neste contexto, o trabalho abre perspectivas para o maior entendimento das interações moleculares de ligantes e Prx 2-Cys típicas.

Outra estratégia que utilizamos neste momento de pandemia foi a concentração na produção de material acadêmico com finalidade de treinamento de elaboração de material acadêmico. Foi elaborado um material didático para a graduação, onde elaborei um capítulo de livro sobre Replicação do DNA (ISBN: 9786599252921). Adicionalmente, também colaborei, através de experimentos de termoestabilidade de Prx 2-Cys típicas (executados previamente a pandemia) e elaboração de figuras e texto, com um artigo que investigou diferenças na afinidade por substratos e consequências funcionais e estruturais sobre as Prx 2-Cys de leveduras e bactérias, indicando que os peróxidos de lipídeos são melhores substratos para Tsa1 (Tairum CA et al., 2021. *Antioxidants*. 10(7), 1032 – Apêndice A) e uma revisão sobre a relevância das Prx em micro-organismos patogênicos, em que fui responsável pela seção que abordou o efeito de deleções de Prx. O trabalho também aborda aspectos estruturais e substratos preferenciais destas enzimas, indicando que as características intrínsecas dessas enzimas podem auxiliar no desenvolvimento de novas drogas para combater microrganismos patogênicos (de Oliveira et al., 2021. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(14-15), 5701–5717 – Apêndice B).

6. PERSPECTIVAS

O presente trabalho levanta diversas perspectivas para o desenrolar de novas pesquisas, dentre elas:

- Avaliação dos efeitos da ligação do inibidor sobre a estabilidade de Tsa1 e Prx2 por meio de deslocamento térmico diferencial (DSF);
- Determinação do tipo de inibição enzimática das moléculas identificadas por meio de ensaios bioquímicos;
- Avaliação dos efeitos da ligação dos compostos bioativos identificados como inibidores sobre a estrutura quaternária das enzimas por cromatografia de exclusão molecular (SEC);
- Avaliação dos efeitos da ligação do inibidor sobre a estrutura secundária e estabilidade das enzimas por meio de espectroscopia de dicroísmo circular (CD);
- Avaliação da ligação a resíduos de cisteína efetuada pelos compostos por espectrometria de massas;
- Análises de docking molecular dos compostos NC-ABP1, NC-HP1 e NC-LS5, identificados como inibidores para as proteínas Prx2 e Tsa1.
- Avaliação da citotoxicidade dos compostos naturais sobre células de mamíferos.
- Determinação de estruturas cristalográficas de inibidores em complexo com Prx2 e Tsa1.

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 Mg²⁺ 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.; Raudonikienė, 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.
- Ghaemmaghani, 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.
- Górska, 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.; Cussiol, J.R.R. & Netto, L.E.S. 2010. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Q β 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)/O₂ 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/ β -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. β -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_2O_2 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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.

APÊNDICES

Apêndice A

Artigo publicado no periódico *Antioxidants* (2021. 10(7), 1032).

Tairum, C.A., Santos, M.C., Breyer, C.A., de Oliveira, A., Cabrera, V., Toledo-Silva, G., Mori, G. M., Toyama, M. H., Netto, L., & 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".

Article

Effects of Serine or Threonine in the Active Site of Typical 2-Cys Prx on Hyperoxidation Susceptibility and on Chaperone Activity

Carlos A. Tairum ^{1,2,†} , Melina Cardoso Santos ^{1,†} , Carlos Alexandre Breyer ^{1,†} , Ana Laura Pires de Oliveira ¹, Vitoria Isabela Montanhero Cabrera ¹ , Guilherme Toledo-Silva ³ , Gustavo Maruyama Mori ⁴ , Marcos Hikari Toyama ¹ , Luis Eduardo Soares Netto ^{2,*}  and Marcos Antonio de Oliveira ^{1,*} 

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São Vicente 01049-010, Brazil; tairumjr@usp.br (C.A.T.); melina.css@hotmail.com (M.C.S.); carlosbreyer@gmail.com (C.A.B.); alp.oliveira@unesp.br (A.L.P.d.O.); vitoria.isabela.montanhero@gmail.com (V.I.M.C.); marcos.toyama@unesp.br (M.H.T.)

² Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 01049-010, Brazil

³ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil; guilherme.toledo@ufsc.br

⁴ Laboratório de Ecologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São Vicente 01049-010, Brazil; gustavo.mori@unesp.br

* Correspondence: nettoles@ib.usp.br (L.E.S.N.); marcos.a.oliveira@unesp.br (M.A.d.O.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: 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. Effects of Serine or Threonine in the Active Site of Typical 2-Cys Prx on Hyperoxidation Susceptibility and on Chaperone Activity. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1032.

<https://doi.org/10.3390/antiox10071032>

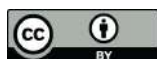
Academic Editor: Bruce Morgan

Received: 5 May 2021

Accepted: 10 June 2021

Published: 25 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Typical 2-Cys peroxiredoxins (2-Cys Prx) are ubiquitous Cys-based peroxidases, which are stable as decamers in the reduced state, and may dissociate into dimers upon disulfide bond formation. A peroxidatic Cys (C_P) takes part of a catalytic triad, together with a Thr/Ser and an Arg. Previously, we described that the presence of Ser (instead of Thr) in the active site stabilizes yeast 2-Cys Prx as decamers. Here, we compared the hyperoxidation susceptibilities of yeast 2-Cys Prx. Notably, 2-Cys Prx containing Ser (named here Ser-Prx) were more resistant to hyperoxidation than enzymes containing Thr (Thr-Prx). In silico analysis revealed that Thr-Prx are more frequent in all domains of life, while Ser-Prx are more abundant in bacteria. As yeast 2-Cys Prx, bacterial Ser-Prx are more stable as decamers than Thr-Prx. However, bacterial Ser-Prx were only slightly more resistant to hyperoxidation than Thr-Prx. Furthermore, in all cases, organic hydroperoxide inhibited more the peroxidase activities of 2-Cys Prx than hydrogen peroxide. Moreover, bacterial Ser-Prx displayed increased thermal resistance and chaperone activity, which may be related with its enhanced stability as decamers compared to Thr-Prx. Therefore, the single substitution of Thr by Ser in the catalytic triad results in profound biochemical and structural differences in 2-Cys Prx.

Keywords: 2-Cys Prx; catalytic triad; organic hydroperoxides; oligomerization; hyperoxidation; chaperone

1. Introduction

Typical 2-Cys peroxiredoxins (2-Cys Prx) of the AhpC/Prx1 sub-family are peroxidases widely distributed in prokaryotes and eukaryotes that reduce hydroperoxides with high efficiency [1–4]. These enzymes are very abundant, representing 0.1–1.0% of all soluble proteins in the cells [5–8] and capable of decomposing distinct hydroperoxides [9,10]. Additionally, typical 2-Cys Prx are mediators of redox signaling and can act as molecular chaperones [11–15].

The 2-Cys Prx use a fully conserved N-terminal cysteine residue (peroxidatic cysteine-C_P), which is responsible for the nucleophilic attack on the hydroperoxide and then becomes oxidized into a sulfenic acid (C_P-SOH), which can condensate with a second Cys residue (resolving cysteine, C_R-SH) forming an intermolecular disulfide (C_P-S-S-C_R). In most cases,

these disulfide bonds are reduced by thioredoxin (Trx) [16–19]. The high reactivity of the C_P is related to the microenvironment in which it is found. C_P is in close proximity to other two fully conserved residues (Thr/Ser and Arg), forming polar interactions that increase the electrophilicity of H_2O_2 , and facilitate the nucleophilic attack by the thiolate on C_P [20]. As expected, C_P [21–23], as well as Thr/Ser and Arg [3,23–25], are essential for the efficient reduction of hydroperoxides. Thus, these three residues (C_P , Thr/Ser, and Arg) compose the so-called catalytic triad [3,22,26].

Under high hydroperoxide concentrations, C_P can undergo further oxidation generating hyperoxidized species (C_P-SO_2H or C_P-SO_3H) rather than forming the disulfide bond, inactivating Prx turnover by Trx [27,28]. However, the enzyme sulfiredoxin (Srx) can reduce C_P-SO_2H to C_P-SOH in a process dependent on ATP hydrolysis for typical 2-Cys Prx [27,28]. Hyperoxidized 2-Cys Prx are frequently associated with a molecular chaperone (holdase) function and may impact signaling pathways, like cell growth and circadian rhythm [29–32]. In addition to C_P hyperoxidation, high temperatures can also confer chaperone function to these enzymes [33–36].

A remarkable feature of 2-Cys Prx is the structural rearrangement that are triggered by C_P oxidation. Reduced 2-Cys Prx enzymes (C_P-S^-) are stabilized as decamers [$(\alpha_2)_5$] and can assume the so called fully folded (FF) state (Figure 1A), in which C_P is located in the first turn of an α -helix near to N-terminal region of the protein and far away from C_R (10–16 Å), which is located in the C-terminus of these enzymes. Upon oxidation, partial unfolding of the α -helix containing C_P-SOH (the so-called locally unfolded = LU state) allows its approximation to C_R with the consequent intermolecular disulfide bond formation [37]. In the disulfide form, the 2-Cys Prx decamers tend to dissociate into low molecular weight (LMW) species, mainly dimers [38–40] (Figure 1B). Moreover, when C_P is hyperoxidized or when subjected to heat shock, 2-Cys Prx can switch from decamers to higher molecular weight (HMW) species [32,33,35,41,42] (Figure 1C). Therefore, two reversible structural switches (FF–LU and decamers dissociation) are inter-connected and the stabilities of distinct conformers are influenced by thermal and/or redox factors.

The transitions and stability of distinct oligomers also rely in structural peculiarities of these enzymes. In the 2-Cys Prx from *Escherichia coli* (EcAhpC) mutations close to the C-terminal region precludes the decamer formation [43]. Factors as pH, ionic strength, and protein concentration can influence directly the quaternary state of 2-CysPrx, indicating that the oligomeric rearrangements are directly related to specialized functions of these enzymes in different organisms and cell compartments [39,44–47]. In that regard, we have shown that the presence of Thr or Ser in the catalytic triad influences the stabilities of distinct oligomeric states that 2-Cys Prx can assume [3]. Yeast Tsa1 and Tsa2 contain Thr or Ser in the active site, respectively. Both enzymes are decamers in the reduced state, but Tsa1 is mainly a dimer when oxidized and some are intermediate species (e.g., tetramers), while Tsa2 remains as decamer even after oxidation [3]. In addition, the mutation of catalytic Thr to Ser stabilizes Tsa1 in the decameric form even when oxidized [3]. The substitution of catalytic triad Thr to Ser also stabilizes typical 2-Cys Prx from *Salmonella typhimurium* and *Enterococcus faecalis* as decamers [48,49].

Here, we described that the presence of Thr and Ser in the active site also affected the sensibility of 2-Cys Prx to hyperoxidation. Previously, other structural features were described to confer sensibility of C_P to hyperoxidation, namely a GGLG motif (close to the active site) and a YF motif (found in a α -helix in the C-terminal portion) that are present almost uniquely in eukaryotic enzymes [40]. Posteriorly, the presence of the motif A (D-X₈-N/G-X₁₀-H-X₂₇-S/G) and of the motif B (T-X₃-S/T) were associated with increased resistance of 2-Cys Prx to hyperoxidation [50]. We show that yeast 2-Cys Prx (AhpC/Prx1 subfamily) with Ser in the catalytic triad (named here Ser-Prx) are more resistant to hyperoxidation than those containing Thr (named here Thr-Prx). Moreover, analysis of all the sequences of typical 2-Cys Prx present in the NCBI GenBank revealed that occurrence of Ser-Prx is rare in multicellular eukaryotes and more frequent in eubacteria. Therefore, we describe that bacterial Ser-Prx were also more stable as decamers and

displayed more resistance to thermal inactivation than bacterial Thr-Prx. Furthermore, we found that cumene hydroperoxide (CHP) was more efficient than H_2O_2 to inactivate both Ser-Prx and Thr-Prx. Finally, we showed that bacterial Ser-Prx retained peroxidase activity and acquired molecular chaperone activity more readily than Thr-Prx after treatment at high temperatures.

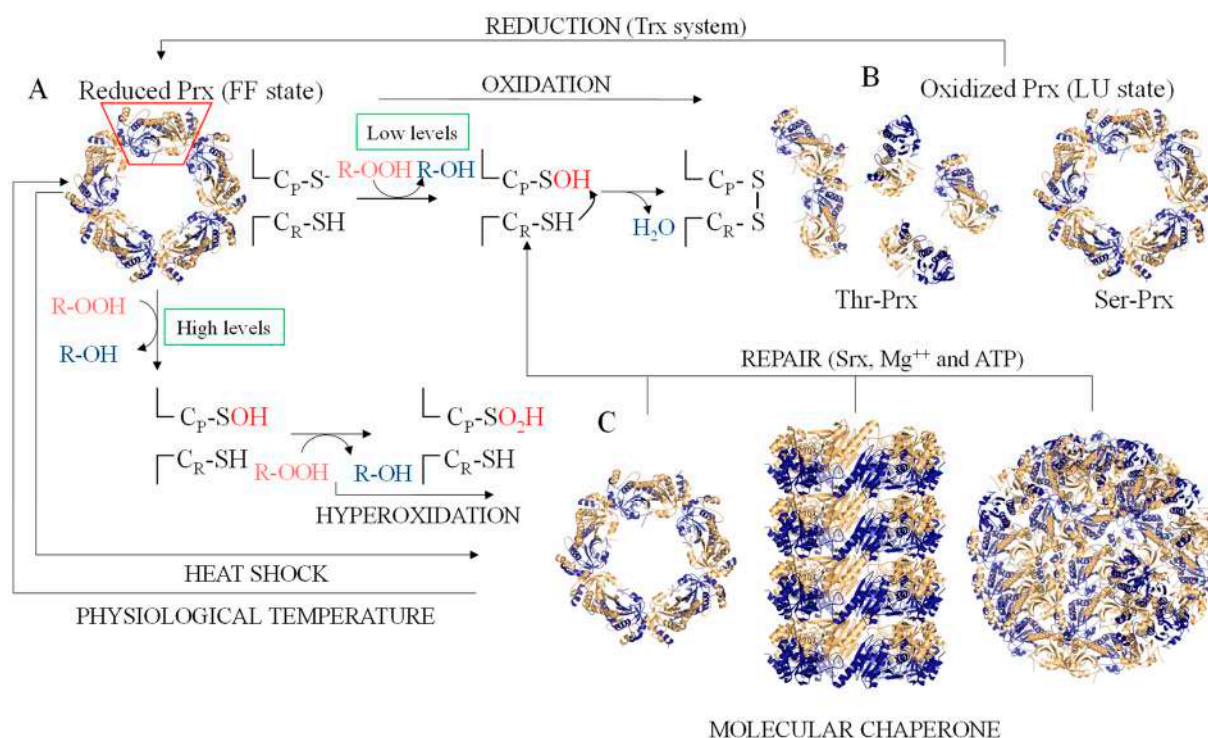


Figure 1. Structural and functional transitions of 2-Cys Prx. (A) In reduced ($\text{C}_\text{P}\text{-S}^-$) and in the fully folded (FF) state, 2-Cys Prx are decamers formed by association of five homodimers ($\alpha_2[5]$). The red trapeze denotes one of the homodimers that compose the decamer. The monomers of each homodimer are depicted in dark blue and light orange, represented in cartoon. At low hydroperoxides level, C_P is oxidized to sulfenic acid ($\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$) and then the condensation with C_R occurs, resulting in the formation of an intermolecular disulfide bond and locking the 2-Cys Prx in the locally unfolded (LU) state. (B) In 2-Cys Prx containing Thr (Thr-Prx), the disulfide formation results in decamer dissociation, while in 2-Cys Prx containing Ser (Ser-Prx), the decamers are stable even in the disulfide form. (C) At high levels of hydroperoxides, $\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$ can react with another(s) hydroperoxide molecule(s) resulting in hyperoxidized species ($\text{C}_\text{P}\text{-SO}_2\text{H}$ or $\text{C}_\text{P}\text{-SO}_3\text{H}$) and in the functional switch from peroxidase to chaperone. This functional switch may be accompanied by the appearance of species with molecular weight higher than the decamer. This process can be reversed by Srx, with ATP hydrolysis. The functional transition from peroxidase to chaperone can also be triggered by high temperatures and the peroxidase activity is restored at physiological temperatures. The 2-Cys Prx representations were made using the crystallographic coordinates of *Saccharomyces cerevisiae* enzyme (PDB = 3SBC).

2. Materials and Methods

2.1. Amplification, Cloning and Sequencing

Yeast wild type proteins (Tsa1, Tsa2, Trx1, and TrxR1) were obtained as previously described [3,51]. Bacterial AhpC and the corresponding thiol reductive systems were amplified by PCR from the genomic DNA of the following species/strains: *Escherichia coli*/ATCC25922, and *Pseudomonas aeruginosa*/ATCC29853. The *ahpC* gene from *Staphylococcus epidermidis*/ATCC12228 was synthesized by GenScript, based on the sequence SE_2357 from KEGG database, with optimized codons for expression in *E. coli*, and flanked with *Nde* I and *Bam* HI restriction sites. Amplified DNA fragments and synthetic gene were digested with *Nde* I and *Bam* HI and cloned into pET15b vector previously digested with the same enzymes. The resulting recombinant vectors were sequenced in an ABI 3730 DNA

Analyzer (Applied Biosystems) using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and then were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) or *E. coli* Tuner (DE3) strain (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).

2.2. Site Directed Mutagenesis

The mutagenesis protocols were performed using Quick Change II Kit (Stratagene), following manufacturer's instructions. The products were used to transform *E. coli* XL1-Blue strain (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and single colonies were grown on Luria Bertani (LB) medium for 16 h. Then, plasmids were extracted, purified, and sequenced. Plasmids containing the expected single substitutions were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) or *E. coli* BL21 Tuner (DE3) expression strains (Sigma-Aldrich). The BL21 (DE3) strain containing the plasmid pET15b/*tsa1*^{t44s} was previously obtained [3]. All strains used in this work are summarized in Table 1.

Table 1. List of strains used in this work.

Species	Strain/Plasmid	Source
<i>E. coli</i>	ATCC25922	ATCC *
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>ahpc</i> (Pa)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>ahpc</i> (Se)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>trx</i> (Ec)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>trxr</i> (Ec)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>tsa1</i> (Sc)	[52]
<i>E. coli</i>	BL21 DE3 Tuner/pET15b- <i>tsa2</i> (Sc)	[3]
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>tsa1t44s</i> (Sc)	[3]
<i>E. coli</i>	BL21 DE3 Tuner/pET15b- <i>tsa2s44t</i> (Sc)	This work
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>trx1</i> (Sc)	[51]
<i>E. coli</i>	BL21 DE3/pET15b- <i>trxr1</i> (Sc)	[51]
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	Agilent
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC29853	ATCC *
<i>S. epidermidis</i>	ATCC12228	ATCC *

* American Type Culture Collection; genes: Ec = *E. coli*, Pa = *P. aeruginosa*, Sc = *S. cerevisiae* and Se = *Staphylococcus epidermidis*.

2.3. Oligonucleotides

The oligonucleotides used to cloning and mutagenesis are shown in Table 2.

Table 2. The oligonucleotides sequences were defined based on NCBI genomic DNA sequences NC_000913.3 (*E. coli ahpc*, *trx* and *trxr*), NC_002516.2 (*P. aeruginosa ahpc*), NZ_CP035288.1 (*S. epidermidis ahpc*) and NC_001136.10 (*S. cerevisiae tsa2*).

Oligonucleotide	Sequence
Ec_Trx_F	5' <u>CGC</u> GAT CCA TAT GAT GAG CGA TAA AAT TAT TCA CCT GAC T 3'
Ec_Trx_R	5' <u>CGC</u> AAG CTT GGA TCC TTA CGC CAG GTT AGC GTC GAG GAA 3'
Ec_TrxR_F	5' <u>CGC</u> GAT CCA TAT GAT GGG CAC GAC CAA ACA CAG TAA ACT G 3'
Ec_TrxR_R	5' <u>CGC</u> AAG CTT GGA TCC TTA TTT TGC GTC AGC TAA ACC ATC 3'
Pa_AhpC_F	5' <u>CGC</u> GAT CCA TAT GAT GTC CCT GAT CAA CAC TCA AGT CCA A 3'
Pa_AhpC_R	5' <u>CGC</u> AAG CTT GGA TCC TTA GAT CTT GCC GAC CAG GTC CAG G 3'
Pa_AhpC_T43S_F	5' GCT GCC TTC TCC TTC AAC TGC 3'
Pa_AhpC_T43S_R	5' GCA GTT GAA GGA GAA GGC AGC 3'
Se_AhpC_S46T_F	5' GCG GAC TTC ACC TTT GTT TGC 3'
Se_AhpC_S46T_R	5' GCA AAC AAA GGT GAA GTC CGC 3'
Tsa2S44T_F	5' ATT GGC TTT TAC TTT TGT CTG TC 3'
Tsa2S44T_R	5' GAC AGA CAA AAG TAA AAG CCA AT 3'

* Underlined bases indicate *Nde* I and *Bam* HI cloning adapters.

2.4. Expression and Purification of Recombinant Proteins

Single colonies of *E. coli* BL21 (DE3) strain containing the expression plasmids were inoculated in LB medium (20 mL) containing 0.1 mg ampicillin/mL overnight at 37 °C/250 rpm, transferred to 1 L of fresh LB medium, and cultured further until OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. Then the expressions of all proteins were induced by the addition of 0.3 mM IPTG at 37 °C/3 h/250 rpm in orbital shaker. Tsa2 and Tsa2^{S44T} were expressed using similar protocols; however, *E. coli* Tuner (DE3) was used instead.

Cells were harvested by centrifugation and pellets were resuspended in start buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 50 mM NaCl, 20 mM imidazole, and 2 mM PMSF) and disrupted by sonication. The cell extracts were kept in ice during streptomycin sulfate 1% treatment for 20 min. The supernatants clarified by centrifugation were homogenized by filtration and purified by IMAC using HisTrap column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Imidazole was removed by gel filtration using PD10 Desalting column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and the purity of recombinant proteins was verified by SDS–PAGE. The yeast Trx1 was purified by boiling method as described previously [53].

2.5. NADPH Oxidation Assay

The NADPH to NADP⁺ oxidation was monitored at A_{340nm} in 100 µL reaction mixtures containing 50 mM HEPES pH 7.4, 100 µM DTPA, 1 mM sodium azide, 1 µM Prx (Tsa1, Tsa2, or reciprocal mutants), 2 µM Trx1, 0.3 µM TrxR1, and 150 µM NADPH. In some cases, yeast enzymes were replaced by bacterial enzymes (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* AhpC; *Escherichia coli* Trx and TrxR) at the concentrations described in the legend of the figures. The reactions were initiated by H₂O₂ or CHP addition and the reaction mixtures were incubated at 30 °C or 37 °C.

2.6. Western Blot Analysis to Evaluate the C_p Hyperoxidation

To confirm if 2-Cys Prx were inactivated by C_p hyperoxidation, we collected samples after NADPH enzymatic assays. Proteins were pre-alkylated with NEM (50 mM) to avoid the formation of artifactual disulfides before non-reducing SDS–PAGE. Samples were then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and were incubated with an anti-Prx-SO₃ (dilution 1:2500; AbFrontier, Seoul, Korea; #LF-PA0004) diluted 1000 times in TBST containing 3% skimmed milk and incubated on a rocking platform for 16 h at 4 °C. A HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare—Little Chalfont, UK) was employed and samples were detected by chemiluminescence detection (ECL Prime Western Blot, GE Healthcare—Little Chalfont, UK). Images were obtained by ChemiDoc equipment (Bio-Rad—Hercules, CA, EUA).

2.7. In Silico Screening of the Typical 2-Cys Prx and Phylogenetic Analyses

The sequences of the *S. cerevisiae* Tsa1 (UniProtKB: P34760), Tsa2 (Q04120), *Salmonella typhimurium* AhpC (P0A251), and *Staphylococcus aureus* AhpC (P0A0B7) were used as eukaryotic and prokaryotic prototypes of typical 2-Cys Prx containing Thr or Ser in the catalytic triad. These amino acid sequences were used as query against TREMBL database using blastp [54] with a cutoff e-value of 10^{−3}. Then, to minimize misidentification issues, we identified Pfam domains out of the putative unique orthologs and retained only those presenting the domains found in Tsa1 and Tsa2, AhpC/Prx1 (Pfam: PF00578), redoxin (PF08534) and 1-Cys Prx_C (PF10417) with hmmscan (v.3.1b2) [55]. Sequences presenting other domains, except for SCO1-SenC (PF026300), which we observed in the *S. aureus* AhpC, were excluded. Additionally, because Prx superfamily presents a conserved active-site cysteine P-X-X-X-(T/S)-X-V-C-P-T-E motif [56], known as C_p-loop [20], we removed sequences lacking this motif. After these filtering steps, we retrieved taxonomic information of the accessions we obtained from the NCBI taxonomy database (database resources of the National Center for Biotechnology Information; June 2018).

2.8. Size Exclusion Chromatography (SEC) of Bacterial Typical 2-Cys Prx

To obtain reduced samples, 30 μ M of bacterial 2-Cys Prx were treated with TCEP 5 mM for 60 min and the TCEP excess was removed using the PD 10 column (reduced samples). To oxidize samples, reduced 2-Cys Prx (30 μ M) were treated with H_2O_2 (36 μ M) for 30 min, at room temperature. SEC was performed in an analytical Jasco-HPLC system composed by a PU 2880 Plus injector and a PDA MD 2018 detector. Samples (30 μ M in 100 mM Tris-HCl at pH 7.4) were separated by a Phenomenex BioSep-SEC-S2000 column (7.8 $\times$ 300 mm, 5 μ m, resolution range of 15 to 2000 kDa) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA), using a flow of 1 mL/min in 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 monitored by absorbance (280 nm). Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B₁₂ (1.35 kDa) were used as molecular standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, VA, USA).

2.9. Differential Scanning Fluorimetry

The thermal unfolding of bacterial 2-Cys Prx were analyzed by using differential scanning fluorimetry (DSF) [57]. Briefly, proteins (final concentration 3 μ M in 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl) were mixed with 5.25 μ L of SYPRO Orange dye diluted 200 times in DMSO. Reactions mixtures were equilibrated at 25 $^\circ\text{C}$ for 30 s and then monitored from 25–95 $^\circ\text{C}$ with increments of 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$ for 240 min using an Mx 3005P Real-Time System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA,) with excitation and emission filters set to 465 and 590 nm, respectively. The melting temperature (T_m) of AhpCs were obtained with the MxPro software and curves fit in GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using the Boltzmann equation to determine the midpoint of thermal denaturation (T_m). All measurements were carried out in triplicate and presented as mean $\pm$ SD.

2.10. Chaperone Activity Assay

Chaperone (holdase) activities of bacterial 2-Cys Prx were analyzed by their ability to inhibit thermally induced aggregation of citrate synthase (CS) as previously described [34]. Briefly, CS (2 μ M) was mixed with AhpC at molar ratio 20:1 in 40 mM HEPES-KOH pH 7.5. We also evaluated the differences in chaperone ability of enzymes that were previously heated (48 $^\circ\text{C}$ for 1 h). As negative control, samples without the 2-Cys Prx were used. CS aggregation was monitored by light scattering at 360 nm using a Synergy H1 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The assay was executed at 43 $^\circ\text{C}$, with continuously shaking (fast double orbital), with reads at each 15 s for 90 min.

2.11. Analysis of Crystallographic Structures

The Prx quaternary structures were accessed from the protein structure database (www.rcsb.org accessed on 5 May 2021). The molecular 3D representations were generated using the PyMOL tool (www.pymol.org accessed on 5 May 2021).

3. Results

3.1. Presence of a Ser in the Catalytic Triad Increased Resistance of Yeast 2-Cys Prx to Hyperoxidation

Previously, we observed that the presence of a Ser residue in the catalytic triad stabilized yeast 2-Cys Prx in the decameric state even in the disulfide form [3]. Here, we investigated if the presence of a Ser or Thr in the catalytic triad might also affect the hyperoxidation susceptibilities of these enzymes.

The decrease of NADPH consumption at increasing hydroperoxides concentrations (H_2O_2 in Figure 2 and CHP in Figure 3) is consistent with 2-Cys Prx inhibition by C_P hyperoxidation. Tsa1 (a Thr-Prx) was remarkably more susceptible to inactivation (Figure 2A) when compared to Tsa2 (a Ser-Prx) (Figure 2C). At concentrations higher than 1 mM, H_2O_2 significantly inhibited Tsa1 (Figure 2A), while high doses of H_2O_2 (10 mM) did not inactivate Tsa2 (Figure 2C). Then, NADPH assays with mutant proteins (Tsa1^{T44S} and Tsa2^{S44T})

were performed. Tsa1^{T44S} (Figure 2B) was more resistant to H₂O₂ inactivation than wild type Tsa1 (Figure 2A). In contrast, Tsa2^{S44T} (Figure 2D) was more susceptible to inactivation than wild type Tsa2 (Figure 2C). Therefore, these results indicated that Thr-Prx are more susceptible to hyperoxidation than Ser-Prx.

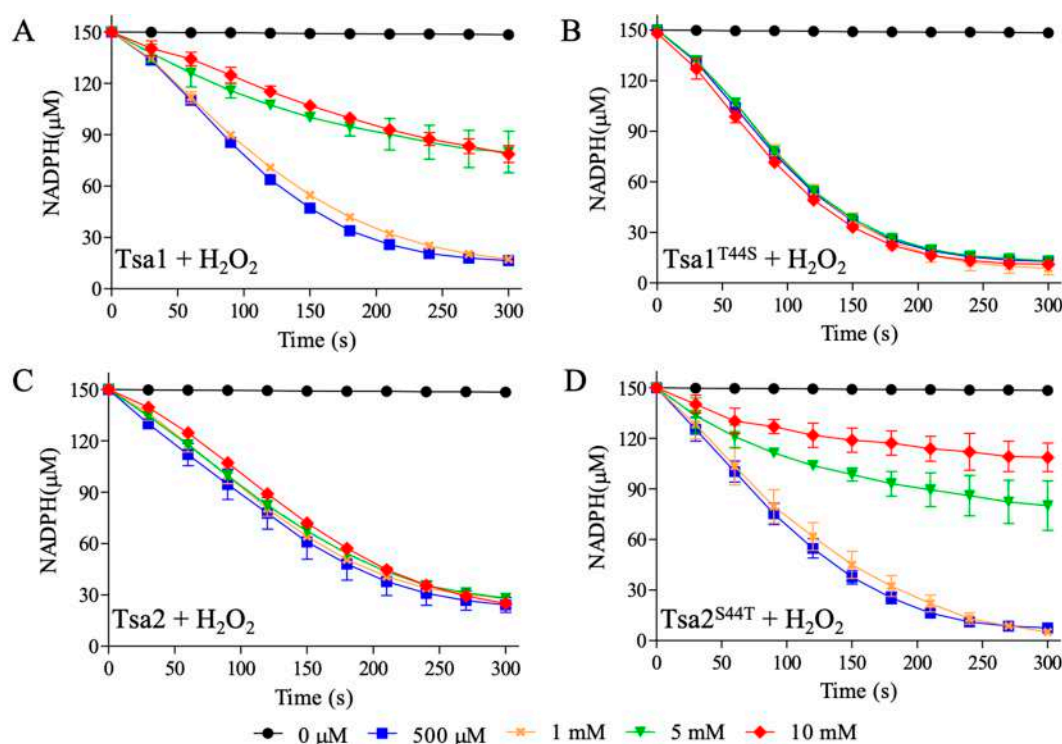


Figure 2. Tsa1, Tsa2, and mutant inhibition by H₂O₂. *S. cerevisiae* Tsa1 (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa2 (C), or Tsa2^{S44T} (D) were exposed to increasing amounts of H₂O₂. The assays were performed with 1 μM Prx, 2 μM Trx1, 0.3 μM TrxR1, and increased amounts of H₂O₂ (0 μM = ● black, 500 μM = ■ blue, 1 mM = × orange, 5 mM = ▼ green and 10 mM = ◆ red) in buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 100 μM DTPA, 1 mM sodium azide and 150 μM NADPH. The decrease in NADPH absorbance was followed at 340 nm. The error bars represent the standard deviation. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times with similar results.

We then verified the susceptibilities of these yeast 2-Cys Prx to hyperoxidation by an organic hydroperoxide (CHP). The peroxidase activities of Thr-Prx were almost abolished in all concentrations tested for Tsa1 (Figure 3A) and Tsa2^{S44T} (Figure 3D). In contrast, Ser-Prx were considerably more resistant to inactivation (Figure 3B,C).

We confirmed that 2-Cys Prx inactivation occurred due to C_P hyperoxidation, by western blot assays using anti-SO₃H antibody (Supplementary Material, Figure S1) from aliquots of samples described in Figures 2 and 3. Hyperoxidized 2-Cys Prx migrated as a dimer (~46 kDa) in non-reducing SDS-PAGE, when one of the active sites was in the disulfide form and the other with the C_P hyperoxidized (C_P-SO₃H) or as monomer, when all C_Ps were hyperoxidized.

Two aspects deserve to be highlighted from these results. As already observed [58], Tsa1 is more sensitive to hyperoxidation by CHP than to H₂O₂ (Figures 2A and 3A). We now observed that the same characteristic for Tsa2 (Figures 2C and 3C). Additionally, we verified that Ser-Prx (Tsa2 and Tsa1^{T44S}) are more resistant to hyperoxidation than Thr-Prx (Tsa1 and Tsa2^{S44T}) (Figures 2 and 3). Accordingly, $\Delta tsa2$ yeast strains are more sensitive to organic hydroperoxides than $\Delta tsa1$ [59].

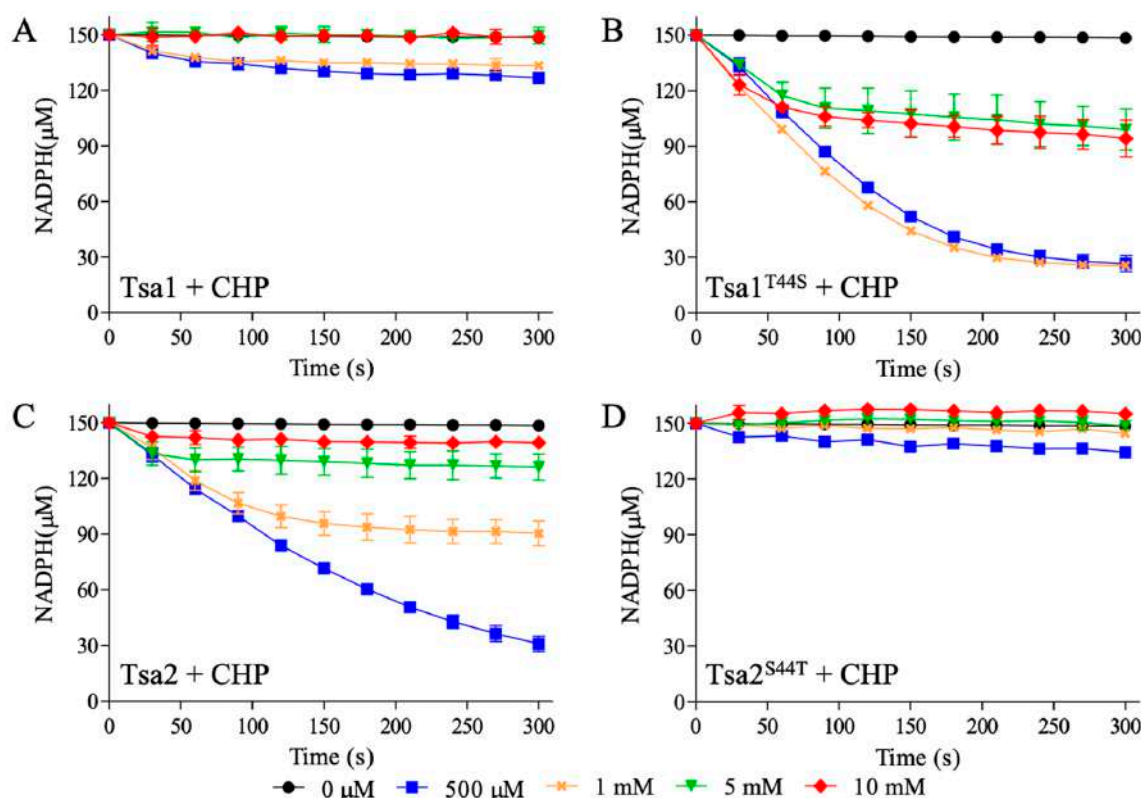


Figure 3. Inactivation of yeast Tsa1, Tsa2, and mutants by CHP. Similar to Figure 2, *S. cerevisiae* Tsa1 (A), Tsa1^{T44S} (B), Tsa2 (C), or Tsa2^{S44T} (D) were treated with growing amounts of CHP and the absorbance of NADPH was monitored at 340 nm. The experiment was executed with 1 μM Prx, 2 μM Trx1, 0.3 μM TrxR1 and increased amounts of CHP (0 μM = • black, 500 μM = ■ blue, 1 mM = × orange, 5 mM = ▼ green and 10 mM = ♦ red) in buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 100 μM DTPA, 1 mM sodium azide, and 150 μM NADPH. Error bars represent the standard deviations. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times with similar results.

3.2. Thr-Prx Are More Widely Distributed and Ser-Prx Is More Prevalent in Bacteria

As the presence of Ser or Thr provokes dramatic alterations in the biochemical and structural properties of yeast 2-Cys Prx, we investigated the phylogenetic distribution of Ser-Prx and Thr-Prx. We analyzed 45,939 unique protein sequences, out of which 15,034 accessions presented AhpC-TSA, Redoxin and 1-CysPrx_C domains denominations according to Pfam and no other domain fused, except for SCO1-SenC. Out of the sequences with taxonomic annotation at domain level, Thr-Prx represented the majority (14,092 sequences, approximately 93.7%), whereas the remaining (941 sequences, approximately 6.3%) are Ser-Prx (Table 3). Notably, the proportions between Thr-Prx and Ser-Prx are different in the three domains of life. Ser-Prx sequences are proportionally more representative in bacteria (7.4%) compared to eukaryotes (2.7%) and archaea (1.4%) (Figure 4). We also found 45 Thr-Prx records deposited in the NCBI database obtained by metagenome approaches and three of them were uncategorized.

Table 3. Distribution of Thr-Prx or Ser-Prx among the living groups.

Thr				Ser			
Bacteria		Eukarya		Bacteria		Eukarya	
Acidobacteria	15	Alveolata	107	FCB group *	14	Amoebozoa	1
Aquificae	16	Amoebozoa	83	Proteobacteria	15	Euglenozoa	12
Calditrichaeota	2	Apusozoa	2	PVC group §	12	Opisthokonta	75
Chrysiogenetes	1	Cryptophyta	1	Spirochaetes	2	Rhodophyta	2
Deferribacteres	5	Euglenozoa	105	Synergistetes	1		
Elusimicrobia	18	Heterolobosea	1	Terrabacteria group	803		
Environmental samples	3	Opisthokonta	2079	Unclassified	4		
FCB group *	1455	Parabasalia (parabasalids)	13				
Fusobacteria	78	Rhizaria	4				
Nitrospinae/Tectomicrobia group	11	Rhodophyta	116				
Nitrospirae	15	Stramenopiles	136				
Proteobacteria	4890	Viridiplantae	302				
PVC group	220						
Spirochaetes	149						
Synergistetes	10						
Terrabacteria group	3564						
Thermodesulfobacteria	2						
Unclassified	245						

* Superphylum that comprises Fibrobacteres, Chlorobi, and Bacteroidetes phyla, § Superphylum that comprises Planctomycetes, Verrucomicrobia, and Chlamydiae phyla.

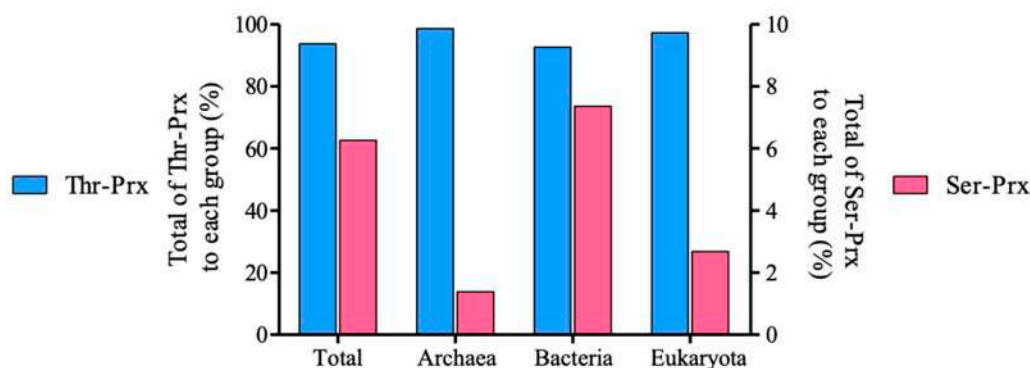


Figure 4. Distribution of the typical 2-Cys Prx containing Thr or Ser as part of the catalytic triad. The analysis of 15,034 unique sequences of typical 2-Cys from the NCBI revealed 14,092 Thr-Prx (93.7%) and 941 Ser-Prx (6.3%) sequences. Considering each domain, Ser-Prx are more abundant at bacteria (7.4%), followed by eukaryotes (2.7%), and archaea (1.4%). The left Y-axis is referent to Thr-Prx, while right Y-axis is related to Ser-Prx.

The number of sequences of Archaea 2-Cys Prx deposited in the database is very low compared to the other domains of life. Nevertheless, the number of Thr-Prx (71) from Archaea is superior to that of Ser-Prx (1). Thr-Prx are also more widely distributed in Eukarya (2949 representatives present in 12 Superphyla groups) than Ser-Prx (90 sequences found in only four groups) (Table 3). For instance, only one species presents Ser-Prx in chordates (killifish *Fundulus heteroclitus*), whereas a wide range of tetrapods presented only Thr-Prx (See Supplementary Material, Spreadsheet S1).

Concerning bacteria, 16 Superphyla groups contain Thr-Prx, with the prevalence of the Proteobacteria followed by Sphingobacteria (FCB group) and Thermodesulfobacteria groups. Conversely, Ser-Prx occurs with striking predominance in the Terrabacteria group (Table 3). Curiously, Thr-Prx are distributed similarly in Gram negative and Gram positive, whereas Ser-Prx are found mostly in Gram negative (Actinobacteria and Firmicutes).

Additionally, as *S. cerevisiae*, some bacteria (e.g., *Bacillus subtilis*) possess both Thr-Prx and Ser-Prx isoforms [60], as *S. cerevisiae*.

3.3. Quaternary Structures Characterization of Bacterial Thr-Prx and Ser-Prx

Considering the higher abundance of Ser-Prx in Bacteria, we evaluated the role of Thr/Ser in AhpC enzymes. We selected to analyze recombinant AhpCs from *Pseudomonas aeruginosa* (PaAhpC—a Thr-Prx) and AhpC from *Staphylococcus epidermidis* (SeAhpC—a Ser-Prx), as they belong to the most abundant groups of Thr-Prx (Proteobacteria) and of Ser-Prx (Terrabacteria). As with yeast 2-Cys Prx, we performed reciprocal Ser-Thr mutations and we carried out SEC analysis of bacterial 2-Cys Prx. While PaAhpC was mostly decamer in the reduced form and dimer when oxidized (Figure 5A), PaAhpC^{T44S} was predominantly decamer when oxidized or reduced (Figure 5B). Similarly, yeast Tsa1 and *Salmonella typhimurium* AhpC (both Thr-Prx) are decamers when reduced and dimers when oxidized in disulfides, while the substitution of Thr to Ser confers higher stability to the decamer even when the 2-Cys Prx are oxidized [3,39,49].

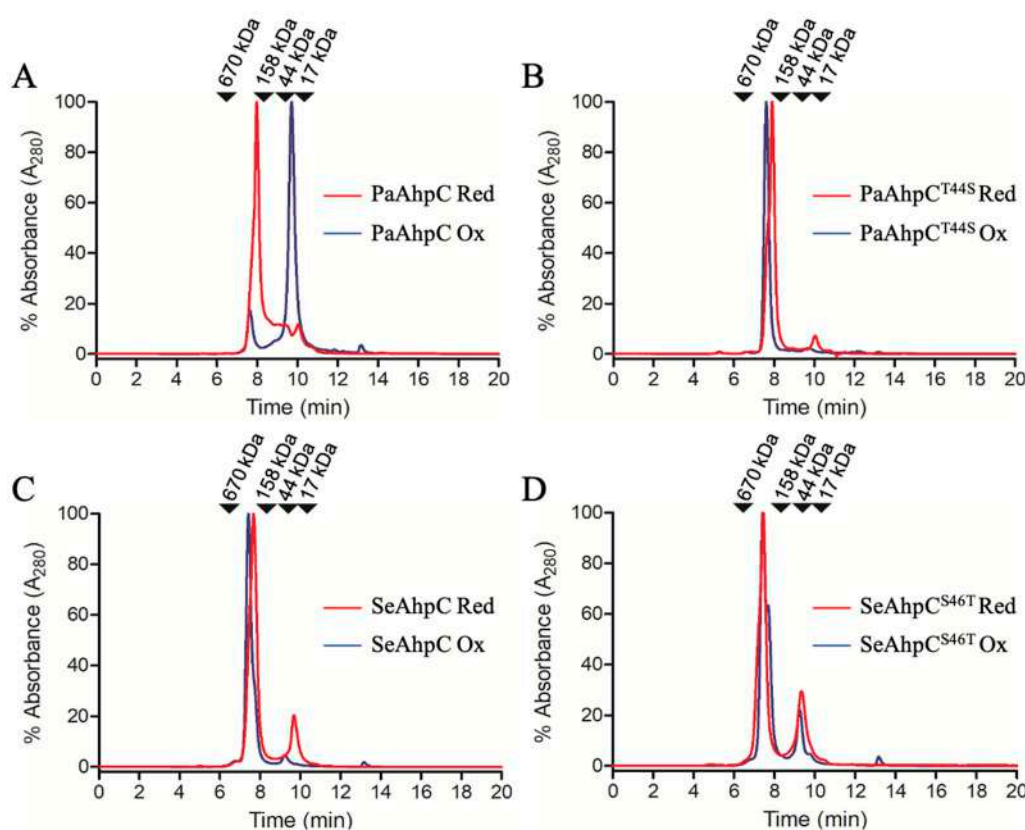


Figure 5. Size exclusion chromatography of PaAhpC and SeAhpC and Thr/Ser mutants. PaAhpC (A), PaAhpC^{T44S} (B), SeAhpC (C), and SeAhpC^{S46T} (D), at a final concentration of 30 μ M, were treated with TCEP 5 mM (red lines) or H₂O₂ 36 μ M (blue lines) for 30 min, at room temperature, before being submitted to SEC. The elution profile was monitored at a wavelength of 280 nm, at flow rate of 1 mL/min. Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), and myoglobin (17 kDa) were used as molecular standards. The experiments were performed at least three times.

Similarly to other Ser-Prx [3,48], SeAhpC was presented mostly as decamer independently of the redox state although a small amount of dimers was present in the reduced form (Figure 5C). Additionally, most of SeAhpC^{S46T} was presented as decamer and only a small fraction of the enzyme was detected as dimers, independently of the redox state (Figure 5D). It has been shown by SEC and TEM that the AhpC from *Enterococcus faecalis*, a naturally Ser-Prx, is a decamer independent of the redox state [43], similarly to yeast

Tsa2 [3]. Thus, our results showed that the presence of Thr or Ser in the catalytic triad is a relevant factor related to the redox sensitive oligomerization, but additional features also interfere with the quaternary assembly of typical 2-Cys Prx [43,45,61].

3.4. Comparative Analysis of the Inactivation of Bacterial Thr-Prx and Ser-Prx by High Hydroperoxide Concentrations and by Thermal Insult

We also investigated if the presence of Thr or Ser in the catalytic triad could affect the susceptibility of bacterial 2-Cys Prx to hyperoxidation. In the experimental conditions tested, H_2O_2 did not inhibit the NADPH consumption in the reaction mixtures containing Thr-Prx (Figure 6A,D) or Ser-Prx (Figure 6B,C) even at the highest doses (10 mM). However, when CHP was the substrate, a slight inhibition was observed to Thr-Prx (compare Figure 6E,F and Figure 6G,H). Again, we confirmed that the inhibition of peroxidase activity was a consequence of the C_P hyperoxidation by western blot analysis performed using anti- SO_3 antibody (Supplementary Material, Figure S2).

As the inhibition to bacterial Thr-Prx was less evident in relation to eukaryotic counterparts, we compared the NADPH consumption after 300 s from the data presented in Figure 2, Figure 3, and Figure 6 (Figure 7). For the yeast enzymes, we observed that NADPH consumption is quite similar between Thr-Prx and Ser-Prx at lower H_2O_2 concentrations, but it is considerably higher in samples containing Ser-Prx when 5 or 10 mM H_2O_2 were used (Figure 7A). When CHP was the substrate, the NADPH consumption was also more evident for Ser-Prx (Figure 7B). For the bacterial enzymes, there was no clear difference among the enzymes (Figure 7C). However, we could detect a lower NADPH consumption for Thr-Prx (PaAhpC and SeAhpC^{S46T}) compared to the reciprocal Ser-Prx (PaAhpC^{T43S} and SeAhpC) (Figure 7D). These results indicate that bacterial Ser-Prx present a subtle resistance to hyperoxidation to CHP, but not to H_2O_2 compared to the bacterial Thr-Prx.

We also evaluated the inactivation of Thr-Prx and Ser-Prx by thermal stress. The differential scanning fluorimetry (DSF) curve for PaAhpC presented a lag phase and the determined T_m was 58.5 ± 1.4 °C, while PaAhpC^{T44S} displayed a sudden increase in the fluorescence and the T_m of 66.1 ± 2.3 °C (Figure 8A). Therefore, replacement of the catalytic triad Thr by Ser resulted in an increase about 8 °C in the T_m (Figure 8A). For SeAhpC and SeAhpC^{S46T}, the shapes of the thermal sigmoidal profiles were very similar, although the Ser to Thr substitution resulted in a decrease of ≈ 9 °C of the T_m (61.3 ± 0.5 and 52.7 ± 0.6 °C, respectively) (Figure 8B). Therefore, the presence of Ser in the catalytic triad increased the thermal stabilities of the AhpCs.

Since the thermal stability increased in Ser-Prx, we tested if the proteins retained their peroxidase activities after the thermal pre-treatments. The Thr-Prx (PaAhpC and SeAhpC^{S46T}) were partially inactivated after being heated to 55 °C (Figure 9A,D).

However, the effect of temperature was much more noticeable for SeAhpC^{S46T}, where the pre-treatment at 55 °C abolished the peroxidase activity of the enzyme (Figure 9D). This result agreed with the determined T_m values, as the enzyme SeAhpC^{S46T} displayed the lowest T_m value. On the other hand, the Ser-Prx (PaAhpC^{T43S} and SeAhpC) retained the activity in all temperatures tested (Figure 9B,C).

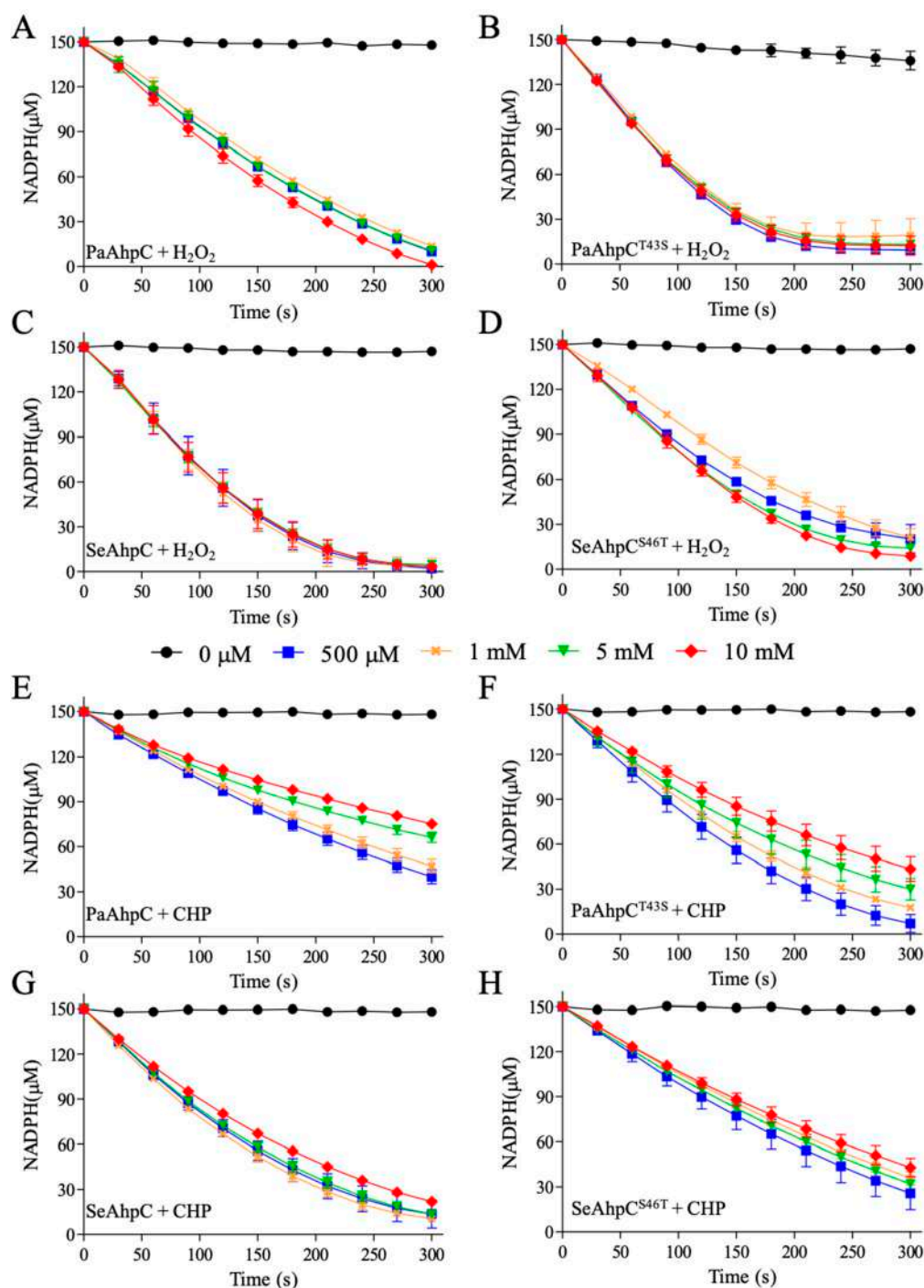


Figure 6. NADPH oxidation assay for evaluation of AhpC hyperoxidation of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* using the heterologous *E. coli* Trx system. Reactions were executed containing PaAhpC (A,E), PaAhpC^{T43S} (B,F), SeAhpC (C,G), or SeAhpC^{S46T} (D,H) (3 μM), EcTrx (6 μM), EcTrxR (0.9 μM), NADPH (150 μM), 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM sodium azide, and 100 μM DTPA. The experiments were started adding growing concentrations of H₂O₂ (A–D) or CHP (E–H) (0 μM = ● black, 500 μM = ■ blue, 1 mM = × orange, 5 mM = ▼ green and 10 mM = ◆ red). The reactions were incubated for 5 min/37 °C. The oxidation of NADPH was monitored spectrophotometrically at 340 nm. The error bars represent the standard deviations. All experiments were performed in triplicate and repeated at least three times, yielding consistent results.

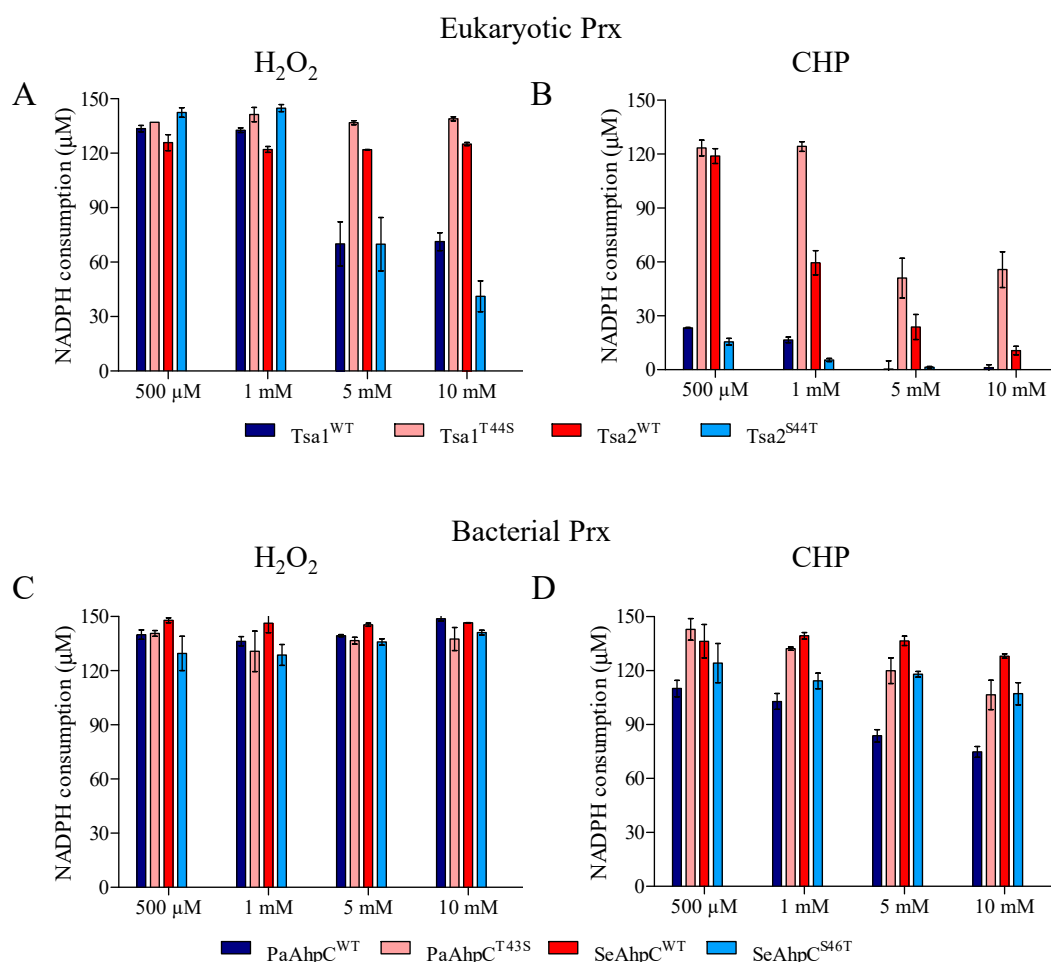


Figure 7. Evaluation of Thr-Prx and Ser-Prx inhibition. The amount of NADPH consumed after 300 s of reaction were obtained in the assays presented in Figure 2, Figure 3, and Figure 6, to H_2O_2 (A, eukaryotic Prx; C, bacterial Prx) and CHP (B, eukaryotic Prx; D, bacterial Prx). Comparing the values obtained to wild type with the reciprocal enzymes, it is possible to estimate which residue in catalytic triad makes the enzyme more resistant to hyperoxidation. Error bars represent the standard deviations.

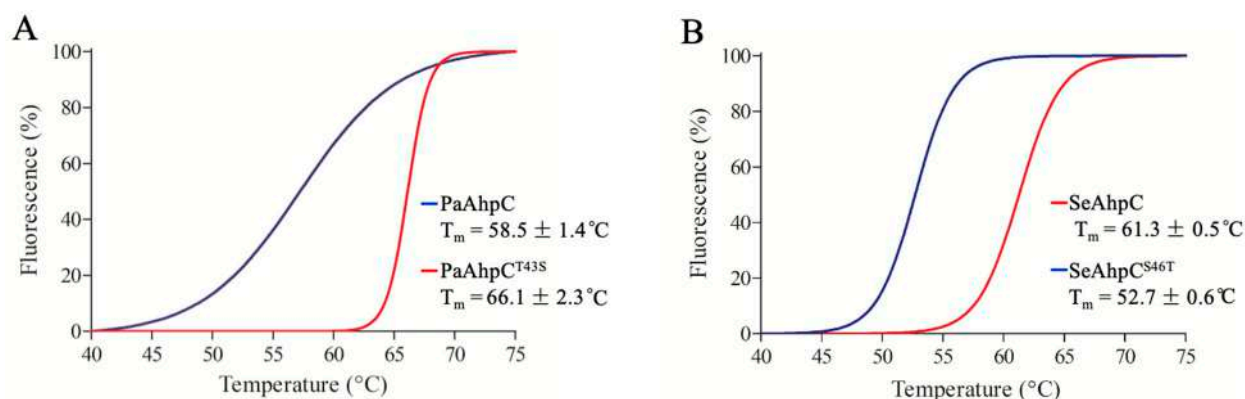


Figure 8. AhpC thermal unfolding monitored by DSF. Differential scanning fluorimetry of PaAhpC (A, blue line), PaAhpC^{T43S} (A, red line), SeAhpC (B, red line), and SeAhpC^{S46T} (B, blue line). Proteins were previously reduced with DTT (20 mM), desalted (PD10, GE Healthcare), and incubated with SYPRO Orange dye. The fluorescence scanning was carried out using a temperature gradient from 25 °C to 95 °C. The melting temperature (T_m) was determined by the Boltzmann equation to determine the midpoint of thermal denaturation. The experiments were performed in triplicate and repeated at least three times with similar results.

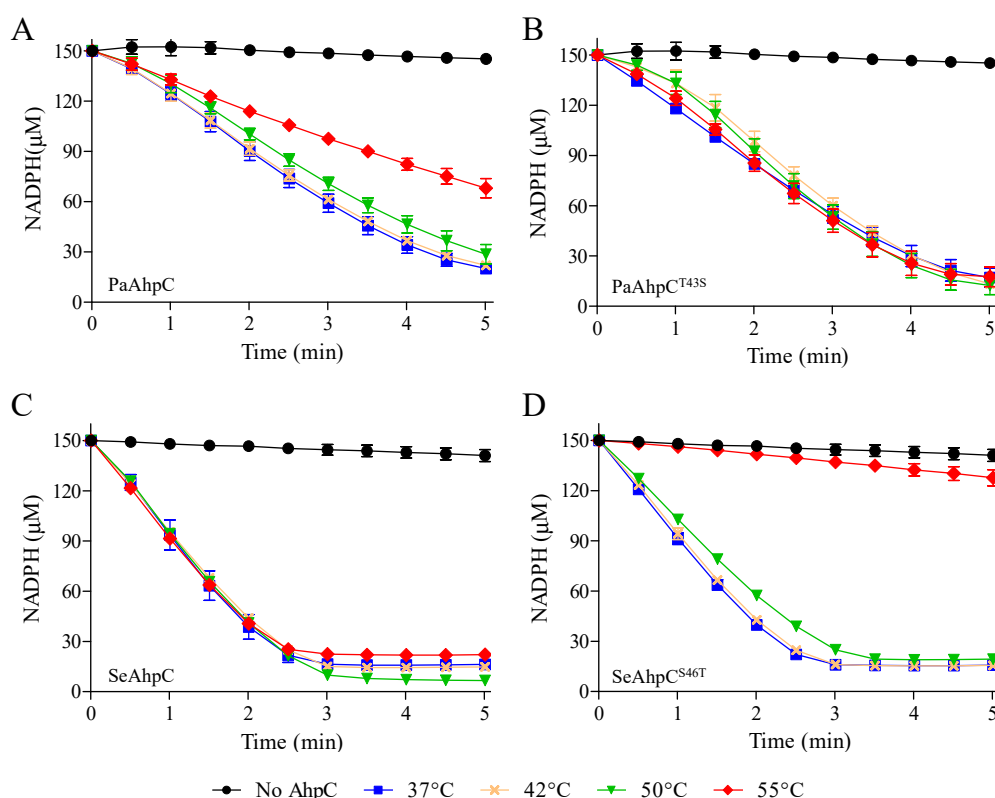


Figure 9. NADPH oxidation assay to assess the effects of thermal inactivation of AhpC enzymes. Aliquots of the PaAhpC (A), PaAhpC^{T43S} (B), SeAhpC (C) and SeAhpC^{S46T} (D) were incubated at different temperatures (37 °C = ■ blue, 42 °C = × orange, 50 °C = ▼ green and 55 °C = ◆ red) for 1 h. Then the enzymes were added to the reactions containing 6 μM EcTrx, 0.9 μM EcTrxR, 150 μM NADPH, 50 mM HEPES (pH 7.0), 100 μM DTPA, and 1mM sodium azide. The reactions were initiated by the addition of 500 μM H₂O₂ and absorbance at 340 nm was monitored at 37 °C, for 5 min. As negative control (● black), reactions were performed without the addition of the AhpC. The standard deviations are represented by the error bars. All experiments were performed at least three times and yielded similar results using replicates.

3.5. AhpC Containing Ser Presented Enhanced Chaperone Activity

We also investigated the abilities of these AhpCs to protect citrate synthase (CS) against thermal insult. CS slowly aggregated when kept at 48 °C as indicated by increased light scattering as a function of time (Figure 10A,B, black lines). In the presence of PaAhpC, the CS aggregation decreased significantly (Figure 10A, blue line). We also tested if the pre-treatment of PaAhpC at 48 °C by 1 h was able to exert additional protection to CS, but no difference was observed in comparison to the untreated enzyme (Figure 10A, red line). In the case of SeAhpC, the sample without thermal pre-treatment presented a more pronounced protection activity (Figure 10B, blue line) than PaAhpC. Notably, pre-heated SeAhpC (48 °C/1 h) protected CS with very high efficiency, because only a negligible amount of CS aggregated (Figure 10B, red line). Therefore, our results suggest that AhpCs containing Ser in the catalytic triad are more prone to act as chaperone induced by heat shock stress than their counterparts containing Thr.

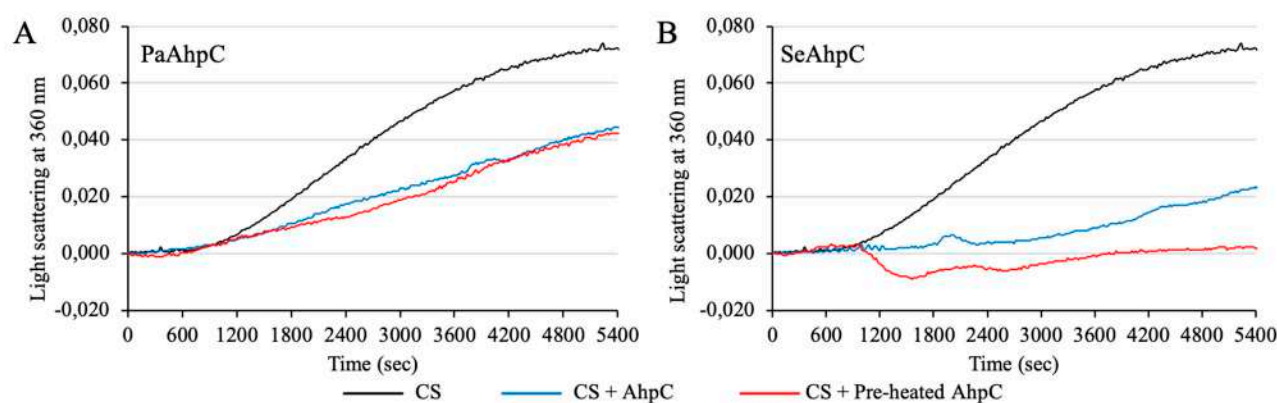


Figure 10. Comparative protection of PaAhpC and SeAhpC to citrate synthase (CS) aggregation by thermal stress. Chaperone activity of PaAhpC and SeAhpC was monitored by its ability to protect citrate synthase (CS) from thermally induced aggregation. The aggregation of 2 μ M of CS in 40 mM HEPES-KOH pH 7.5 was monitored by light scattering ($\lambda = 360$ nm) for 90 min, either alone or in the presence of 40 μ M PaAhpC (**A**) or SeAhpC (**B**). The assays were executed with the enzyme pre-heated at 48 $^{\circ}$ C for 1 h (red lines) or not (blue lines). The CS alone was used as negative control (black lines). The experiments were performed in triplicates under the same conditions.

The ability of the typical 2-Cys Prx to act as chaperone (holdase) was already described for several enzymes from eukaryotes [32,33] and from some bacterial proteins [34,62,63]. These enzymes are able to switch from peroxidase to chaperone in response to oxidative stress, by hyperoxidation of C_P or by thermal stress. Considering the high resistance of AhpC to C_P hyperoxidation, the thermal stress may be the main factor that triggers the chaperone activity, as observed by Kamariah and coworkers (2018) using *E. coli* AhpC (Thr-Prx) as model [34]. Here, we observed the same effect for SeAhpC, which is a Ser-Prx. It is tempting to speculate that chaperone activity may be facilitated in these enzymes because they are stabilized as decamers, irrespective to the oxidative state.

4. Discussion

The roles of Thr or Ser in the catalytic triad of the typical 2-Cys Prx has been considered redundant, but recently, we (and others) showed that Ser-Prx are more stable in the decameric form [3,49]. Here, we demonstrated that the presence of Ser or Thr in the active site affected also the C_P hyperoxidation susceptibilities, especially for yeast 2-Cys Prx, besides being related to thermal resistance and the chaperone activities acquisition of AhpCs. Furthermore, we showed that the vast majority of multicellular organisms have Thr on catalytic triad. Ser-Prx is more prevalent in bacteria, which might be related with diverse ecological strategies in some groups of this domain. Although the typical 2-Cys Prx from bacteria are very resistant to hyperoxidation, we demonstrated that the Thr to Ser substitution slightly increased the resistance to inactivation of AhpC by CHP.

Previously, eukaryotic 2-Cys Prx were described to be highly susceptible to oxidative inactivation in comparison with bacterial counterparts [40]. Accordingly, eukaryotic 2-Cys Prx were named as sensitive, while bacterial enzymes were referred as robust. Furthermore, authors identified the presence of GGLG and YF motifs exclusively in eukaryotic 2-Cys Prx, which were proposed to be positively selected during evolution [40]. The presence of the GGLG and YF motifs near the C_P residue would represent a steric hindrance effect, decreasing the rate of intermolecular disulfide bond formation [37]. According to this model, C_R and H_2O_2 compete for C_P -SOH. Therefore, enzymes with fast rates of condensation reaction between C_R and C_P -SOH would correspond to increased resistance to hyperoxidation. More recently, two other structural elements, named motifs A and B, were identified by conferring resistance to hyperoxidation in 2-Cys Prx [50].

Here, we analyzed the susceptibilities to hyperoxidation of sensitive (Tsa1, Tsa2) and robust (PaAhpC, SeAhpC) 2-Cys Prx carrying Thr or Ser in the catalytic triad. Remarkably, yeast Ser-Prx (Tsa1^{T44S} and Tsa2) are considerably more resistant to inactivation than Thr-

Prx (Tsa1 and Tsa2^{S44T}) by hyperoxidation (Figure 2, Figure 3, and Figure 7) and this effect is only moderate in bacterial enzymes treated with CHP (Figures 6 and 7). Noteworthy, motifs A and B previously described as resistance factors to hyperoxidation [50] are also highly similar among the yeast and bacterial counterparts (Supplementary material, Table S1 and Figure S3). Therefore, the observed differences in inactivation between Tsa1 and Tsa2 or between PaAhpC and SeAhpC are probably not related to the compositions of motifs A and B in these enzymes. In fact, the natural substitution of catalytic triad Thr to Ser stands as a novel trait related to resistance or susceptibility to C_P hyperoxidation.

We also analyzed the crystallographic structures of Tsa1 (PDB = 3SBC) and Tsa2 (PDB = 5DVB) to gain insights on mechanisms underlying differences in the hyperoxidation susceptibilities. In our previous work [3], we observed that the side chain of catalytic Ser presents higher mobility than the Thr in Tsa1. The additional methyl group in Thr side chain interacts with an aromatic ring in the adjacent dimer. Thus, the B-factor of active site regions in the 10 chains of Tsa2 structure are higher than observed to Tsa1. Now, we analyzed the interactions of catalytic Thr and Ser in an attempt to explain the differences in hyperoxidation resistance. We observed that the Ser⁴⁴ in some chains of Tsa2 are in position quite similar to Thr⁴⁴ in Tsa1 (Figure 11A). However, in three chains, the Ser⁴⁴ of Tsa2 are found in an alternative position compared to that one observed to Thr⁴⁴. Consequently, the motif GGLG is moved away from the C-terminal α -helix where YF motif is found (Figure 11B) and a helix upstream to the GGLG motif is also deformed. We propose that the high mobility of Ser side chain makes the interaction between GGLG and C-terminal motif YF more unstable and, therefore, facilitate the approximation between C_P and C_R and disulfide formation. In fact, our data indicated that, in yeast enzymes (displaying the GGLG/YF motifs), the differences in hyperoxidation are more pronounced between Ser-Prx and Thr-Prx. Accordingly, Peskin and colleagues (2021) [61] showed that substitution of human Prx2 C_R by amino acids that disrupts the C-terminal structure is able to affect the enzyme activity, indicating an interconnection between the C-terminal region and the active site microenvironment in eukaryotes. These data indicate that even regions located far from the active site can exert effect in the 2-Cys Prx activity.

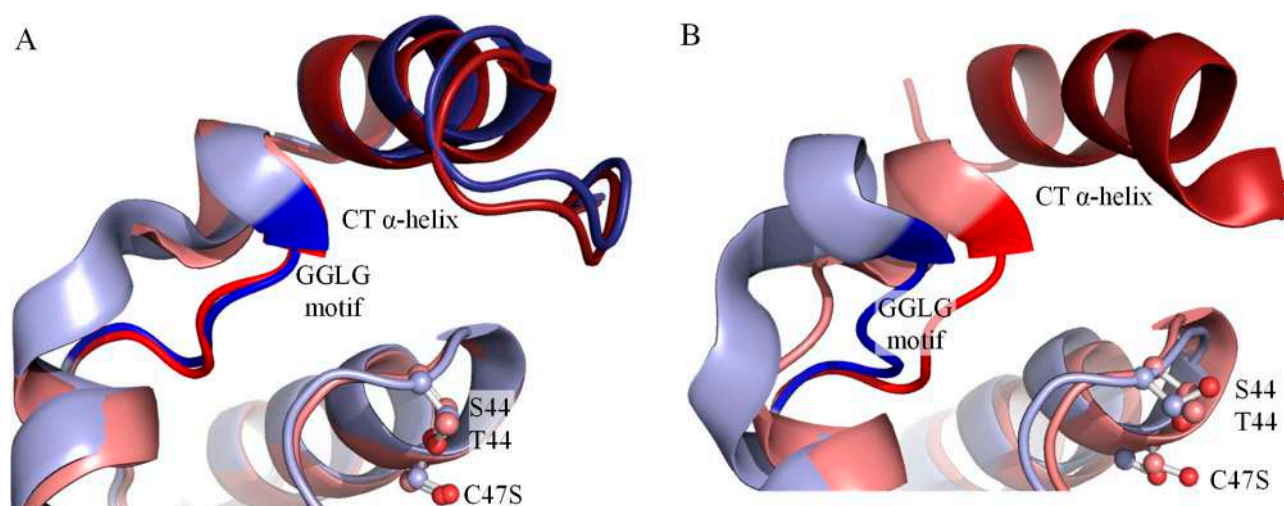


Figure 11. Active site, GGLG and YF motif regions of Tsa1 and Tsa2. (A) Superposition of Tsa1^{C47S} (3SBC = pink) and Tsa2^{C47S} (5DVB = light blue) show similar position of Thr⁴⁴ (Tsa1) and Ser⁴⁴ (Tsa2). Motif GGLG (red in Tsa1 and blue in Tsa2) and CT α -helix (dark red in Tsa1 and dark blue in Tsa2) are also in quite similar position. (B) When Ser⁴⁴ is found in an alternative conformation, GGLG motif is displaced to a further position, while CT α -helix does not appear in the crystallographic structure probably due to being more mobile and, consequently, with low resolution. Crystallographic structures are presented in cartoon and highlighted amino acids are presented as balls and sticks. Graphical models were generated by PyMOL.

In contrast, Thr/Ser substitutions in PaAhpC and SeAhpC produce less pronounced effects on the susceptibilities to hyperoxidation, possibly due to GGLG and YF motifs are absent at these enzymes. We compared the crystallographic structure of a Thr-Prx (*Salmonella typhimurium* AhpC-PDB entry 1YEP) with the only AhpC containing Ser in the PDB database (*Enterococcus faecalis*—PDB entry 5Y63), but we did not observe any major structural differences. However, it is worth to mention that disulfide formation in bacterial AhpC belonging to Thr-Prx group is considerable faster (75 s^{-1}) compared to human enzymes such as Prx2 and Prx3 (1.7 and 22 s^{-1} , respectively) [38,64].

We also observed that 2-Cys Prx are more susceptible to hyperoxidation by organic hydroperoxides than H_2O_2 (Figures 2, 3 and 6), as previously described [34], which may be related with the environment close to the active site pocket. Crystallographic observations revealed the presence of large hydrophobic portions around this region [40,43,48]. In fact, *ahpC* gene inactivation frequently render bacteria with increased sensitivity to organic peroxide and AhpC over-expression invariably leads to a gain of resistance against these oxidants [65–71]. Moreover, *Mycobacterium tuberculosis* and *Helicobacter pylori* mutants for *ahpC* gene accumulated higher levels of lipid hydroperoxides during aerobic growth, when compared to wild type strains [72].

Considering that presence of Ser in catalytic triad makes 2-Cys Prx resistant to C_p hyperoxidation, more stable as a decamer and increase its chaperone activity, we speculate that these enzymes may present complementary functions, protecting cells from severe stressful conditions. Ser-Prx might be more prone to hydroperoxides detoxification and thermal stress defense, while Thr-Prx would be better adapted to cell signaling functions. Notably, Ser-Prx were able to perform both peroxidase and chaperone activities after heat shock and possibly these molecular activities may occur simultaneously. Consistent with this idea, Ser-Prx are more frequent in bacteria, some of them pathogenic. Therefore, Ser-Prx might be considered as target for the development of specific inhibitors to prokaryotic enzymes. Finally, it is amazing to note that a single residue substitution by another with similar properties can confer remarkable functional and structural differences between very homologous enzymes.

5. Conclusions

The single natural substitution of the active site catalytic triad Thr to Ser occurs in several 2-Cys Prx from different organisms and influences the oligomeric redox state, resistance to hyperoxidation, thermostability, and chaperone activity defining two groups among the 2-Cys Prx: Ser-Prx and Thr-Prx. This substitution may have been selected during the evolutive process and can be directly related to differential functions of these enzymes in the cells.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10071032/s1>, Figure S1: Western blot to confirm C_p hyperoxidation of Tsa1 and Tsa2; Figure S2: Evaluation of AhpC hyperoxidation by western blotting; Figure S3: Sequence alignment of Tsa1, Tsa2 and bacterial typical 2-Cys Prx to evaluate the conservation of the hyperoxidation resistance motifs (named A and B) and catalytic triad Thr or Ser distribution; Spreadsheet S1: Distribution of typical 2-Cys Prx among the organisms; Table S1: Conservation of hyperoxidation resistance motifs in typical 2-Cys peroxiredoxins isoforms.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.d.O., L.E.S.N., C.A.B., M.C.S. and C.A.T.; methodology, M.A.d.O., L.E.S.N., C.A.B., M.C.S. and C.A.T.; formal analysis, M.A.d.O., L.E.S.N., M.H.T., C.A.B., A.L.P.d.O., M.C.S., G.M.M., G.T.-S. and C.A.T.; investigation, C.A.B., M.C.S., A.L.P.d.O., G.M.M., G.T.-S., V.I.M.C. and C.A.T.; writing—original draft preparation, M.C.S., C.A.T., L.E.S.N. and M.A.d.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors M.A.d.O., M.C.S., A.L.P.d.O., C.A.T., and L.E.S.N. are members of the CEPID REDOXOMA from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant number 2013/07937-8). This work was also supported by grants from FAPESP to M.A.O. (2007/50930-3; 2017/19942-7) and M.H.T. (2017/20291-0). C.A.B., M.C.S., C.A.T., A.L.P.d.O., and V.I.M.C. were recipients of fellowships from FAPESP (2011/13500-6; 2017/06263-4; 2018/12628-8; 2019/04054-4; and 2020/02868-1).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The sequence of the *S. epidermidis* *ahpc* synthetic gene with the codons optimized for expression in *E. coli* is available at NCBI GenBank (accession code MZ133620).

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be considered a conflict of interest.

References

- Horta, B.B.; de Oliveira, M.A.; Discola, K.F.; Cussiol, J.R.; Netto, L.E. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: Catalytic mechanism and high reactivity. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16051–16065. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D.C.; Netto, L.E.; Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 326–334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tairum, C.A.; Santos, M.C.; Breyer, C.A.; Geyer, R.R.; Nieves, C.J.; Portillo-Ledesma, S.; Ferrer-Sueta, G.; Toledo, J.C., Jr.; Toyama, M.H.; Augusto, O.; et al. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33133. [\[CrossRef\]](#)
- Truzzi, D.R.; Coelho, F.R.; Paviani, V.; Alves, S.V.; Netto, L.E.S.; Augusto, O. The bicarbonate/carbon dioxide pair increases hydrogen peroxide-mediated hyperoxidation of human peroxiredoxin 1. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 14055–14067. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bengtsson-Palme, J.; Alm Rosenblad, M.; Molin, M.; Blomberg, A. Metagenomics reveals that detoxification systems are underrepresented in marine bacterial communities. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 749. [\[CrossRef\]](#)
- Chae, H.Z.; Kim, H.J.; Kang, S.W.; Rhee, S.G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1999**, *45*, 101–112. [\[CrossRef\]](#)
- Ghaemmaghami, S.; Huh, W.K.; Bower, K.; Howson, R.W.; Belle, A.; Dephoure, N.; O'Shea, E.K.; Weissman, J.S. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **2003**, *425*, 737–741. [\[CrossRef\]](#)
- Wood, Z.A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 32–40. [\[CrossRef\]](#)
- Cox, A.G.; Winterbourn, C.C.; Hampton, M.B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* **2009**, *425*, 313–325. [\[CrossRef\]](#)
- Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 278–286. [\[CrossRef\]](#)
- Brown, J.D.; Day, A.M.; Taylor, S.R.; Tomalin, L.E.; Morgan, B.A.; Veal, E.A. A peroxiredoxin promotes H₂O₂ signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 1425–1435. [\[CrossRef\]](#)
- Netto, L.E.; Antunes, F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 65–71.
- Rhee, S.G.; Woo, H.A. Multiple functions of peroxiredoxins: Peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 781–794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stocker, S.; Maurer, M.; Ruppert, T.; Dick, T.P. A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 148–155. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tang, H.M.; Siu, K.L.; Wong, C.M.; Jin, D.Y. Loss of yeast peroxiredoxin Tsa1p induces genome instability through activation of the DNA damage checkpoint and elevation of dNTP levels. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000697. [\[CrossRef\]](#)
- Chae, H.Z.; Chung, S.J.; Rhee, S.G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27670–27678. [\[CrossRef\]](#)
- Jonsson, T.J.; Ellis, H.R.; Poole, L.B. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5709–5721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Netto, L.E.S.; Chae, H.Z.; Kang, S.W.; Rhee, S.G.; Stadtman, E.R. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15315–15321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pineyro, M.D.; Arcari, T.; Robello, C.; Radi, R.; Trujillo, M. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 287–295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hall, A.; Parsonage, D.; Poole, L.B.; Karplus, P.A. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J. Mol. Biol.* **2010**, *402*, 194–209. [\[CrossRef\]](#)

21. Chae, H.Z.; Kim, I.H.; Kim, K.; Rhee, S.G. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16815–16821. [\[CrossRef\]](#)
22. Flohe, L.; Budde, H.; Bruns, K.; Castro, H.; Clos, J.; Hofmann, B.; Kansal-Kalavar, S.; Krumme, D.; Menge, U.; Plank-Schumacher, K.; et al. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *397*, 324–335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Konig, J.; Lotte, K.; Plessow, R.; Brockhinke, A.; Baier, M.; Dietz, K.J. Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24409–24420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Miranda-Vizuet, A.; Damdimopoulos, A.E.; Pedrajas, J.R.; Gustafsson, J.A.; Spyrou, G. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261*, 405–412. [\[CrossRef\]](#)
25. Nagy, P.; Karton, A.; Betz, A.; Peskin, A.V.; Pace, P.; O'Reilly, R.J.; Hampton, M.B.; Radom, L.; Winterbourn, C.C. Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: A kinetic and computational study. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18048–18055. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Portillo-Ledesma, S.; Sardi, F.; Manta, B.; Tourn, M.V.; Clippe, A.; Knoops, B.; Alvarez, B.; Coitino, E.L.; Ferrer-Sueta, G. Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry* **2014**, *53*, 6113–6125. [\[CrossRef\]](#)
27. Bateau, B.; Labarre, J.; Toledano, M.B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **2003**, *425*, 980–984. [\[CrossRef\]](#)
28. Jonsson, T.J.; Johnson, L.C.; Lowther, W.T. Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* **2008**, *451*, 98–101. [\[CrossRef\]](#)
29. Day, A.M.; Brown, J.D.; Taylor, S.R.; Rand, J.D.; Morgan, B.A.; Veal, E.A. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 398–408. [\[CrossRef\]](#)
30. Del Olmo, M.; Kramer, A.; Herzel, H. A Robust Model for Circadian Redox Oscillations. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2368. [\[CrossRef\]](#)
31. Edgar, R.S.; Green, E.W.; Zhao, Y.; van Ooijen, G.; Olmedo, M.; Qin, X.; Xu, Y.; Pan, M.; Valekunja, U.K.; Feeney, K.A.; et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **2012**, *485*, 459–464. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Veal, E.A.; Underwood, Z.E.; Tomalin, L.E.; Morgan, B.A.; Pillay, C.S. Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *28*, 574–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Jang, H.H.; Lee, K.O.; Chi, Y.H.; Jung, B.G.; Park, S.K.; Park, J.H.; Lee, J.R.; Lee, S.S.; Moon, J.C.; Yun, J.W.; et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **2004**, *117*, 625–635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Kamariah, N.; Eisenhaber, B.; Eisenhaber, F.; Gruber, G. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14151. [\[CrossRef\]](#)
35. Moon, J.C.; Hah, Y.S.; Kim, W.Y.; Jung, B.G.; Jang, H.H.; Lee, J.R.; Kim, S.Y.; Lee, Y.M.; Jeon, M.G.; Kim, C.W.; et al. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28775–28784. [\[CrossRef\]](#)
36. Teixeira, F.; Tse, E.; Castro, H.; Makepeace, K.A.T.; Meinen, B.A.; Borchers, C.H.; Poole, L.B.; Bardwell, J.C.; Tomas, A.M.; Southworth, D.R.; et al. Chaperone activation and client binding of a 2-cysteine peroxiredoxin. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 659. [\[CrossRef\]](#)
37. Hall, A.; Nelson, K.; Poole, L.B.; Karplus, P.A. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 795–815. [\[CrossRef\]](#)
38. Peskin, A.V.; Dickerhof, N.; Poynton, R.A.; Paton, L.N.; Pace, P.E.; Hampton, M.B.; Winterbourn, C.C. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: Rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 14170–14177. [\[CrossRef\]](#)
39. Wood, Z.A.; Poole, L.B.; Hantgan, R.R.; Karplus, P.A. Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5493–5504. [\[CrossRef\]](#)
40. Wood, Z.A.; Poole, L.B.; Karplus, P.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **2003**, *300*, 650–653. [\[CrossRef\]](#)
41. Angelucci, F.; Saccoccia, F.; Ardini, M.; Boumis, G.; Brunori, M.; Di Leandro, L.; Ippoliti, R.; Miele, A.E.; Natoli, G.; Scotti, S.; et al. Switching between the alternative structures and functions of a 2-Cys peroxiredoxin, by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4556–4568. [\[CrossRef\]](#)
42. Pastor-Flores, D.; Talwar, D.; Pedre, B.; Dick, T.P. Real-time monitoring of peroxiredoxin oligomerization dynamics in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 16313–16323. [\[CrossRef\]](#)
43. Dip, P.V.; Kamariah, N.; Nartey, W.; Beushausen, C.; Kostyuchenko, V.A.; Ng, T.S.; Lok, S.M.; Saw, W.G.; Eisenhaber, F.; Eisenhaber, B.; et al. Key roles of the *Escherichia coli* AhpC C-terminus in assembly and catalysis of alkylhydroperoxide reductase, an enzyme essential for the alleviation of oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837*, 1932–1943. [\[CrossRef\]](#)
44. Barranco-Medina, S.; Dietz, K.J. Thermodynamics of 2-Cys peroxiredoxin assembly determined by isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.* **2009**, *466*, 409–430.
45. Liebthal, M.; Kushwah, M.S.; Kukura, P.; Dietz, K.J. Single molecule mass photometry reveals dynamic oligomerization of plant and human peroxiredoxins for functional conservation and diversification. *bioRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)

46. Morais, M.A.; Giuseppe, P.O.; Souza, T.A.; Alegria, T.G.; Oliveira, M.A.; Netto, L.E.; Murakami, M.T. How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-Cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 8582–8590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Morais, M.A.B.; Giuseppe, P.O.; Souza, T.; Castro, H.; Honorato, R.V.; Oliveira, P.S.L.; Netto, L.E.S.; Tomas, A.M.; Murakami, M.T. Calcium and magnesium ions modulate the oligomeric state and function of mitochondrial 2-Cys peroxiredoxins in *Leishmania* parasites. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 7023–7039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Pan, A.; Balakrishna, A.M.; Nartey, W.; Kohlmeier, A.; Dip, P.V.; Bhushan, S.; Gruber, G. Atomic structure and enzymatic insights into the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (V583) alkylhydroperoxide reductase subunit C. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *115*, 252–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Nelson, K.J.; Perkins, A.; Van Swearingen, A.E.D.; Hartman, S.; Brereton, A.E.; Parsonage, D.; Salsbury, F.R., Jr.; Karplus, P.A.; Poole, L.B. Experimentally Dissecting the Origins of Peroxiredoxin Catalysis. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *28*, 521–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bolduc, J.A.; Nelson, K.J.; Haynes, A.C.; Lee, J.; Reisz, J.A.; Graff, A.H.; Clodfelter, J.E.; Parsonage, D.; Poole, L.B.; Furdui, C.M.; et al. Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 11901–11912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Oliveira, M.A.; Discola, K.F.; Alves, S.V.; Medrano, F.J.; Guimaraes, B.G.; Netto, L.E. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* **2010**, *49*, 3317–3326. [[CrossRef](#)]
52. Tairum, C.A., Jr.; de Oliveira, M.A.; Horta, B.B.; Zara, F.J.; Netto, L.E. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *J. Mol. Biol.* **2012**, *424*, 28–41. [[CrossRef](#)]
53. Gonzalez Porque, P.; Baldesten, A.; Reichard, P. Purification of a thioredoxin system from yeast. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 2363–2370. [[CrossRef](#)]
54. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
55. Mistry, J.; Finn, R.D.; Eddy, S.R.; Bateman, A.; Punta, M. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hofmann, B.; Hecht, H.J.; Flohe, L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 347–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Huynh, K.; Partch, C.L. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2015**, *79*, 21–28. [[CrossRef](#)]
58. Kriznik, A.; Libiad, M.; Le Cordier, H.; Boukhenouna, S.; Toledano, M.B.; Rahuel-Clermont, S. Dynamics of a Key Conformational Transition in the Mechanism of Peroxiredoxin Sulfinylation. *ACS Catal.* **2020**, *10*, 3326–3339. [[CrossRef](#)]
59. Munhoz, D.C.; Netto, L.E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: Catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35219–35227. [[CrossRef](#)]
60. Zwick, J.V.; Noble, S.; Ellaicy, Y.K.; Coe, G.D.; Hakey, D.J.; King, A.N.; Sadauskas, A.J.; Faulkner, M.J. AhpA is a peroxidase expressed during biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Microbiologyopen* **2017**, *6*, e00403. [[CrossRef](#)]
61. Peskin, A.V.; Meotti, F.C.; Kean, K.M.; Gobl, C.; Peixoto, A.S.; Pace, P.E.; Horne, C.R.; Heath, S.G.; Crowther, J.M.; Dobson, R.C.J.; et al. Modifying the resolving cysteine affects the structure and hydrogen peroxide reactivity of peroxiredoxin 2. *J. Biol. Chem.* **2021**, in press. [[CrossRef](#)]
62. Chuang, M.H.; Wu, M.S.; Lo, W.L.; Lin, J.T.; Wong, C.H.; Chiou, S.H. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2552–2557. [[CrossRef](#)]
63. Lee, J.T.; Lee, S.S.; Mondal, S.; Tripathi, B.N.; Kim, S.; Lee, K.W.; Hong, S.H.; Bai, H.W.; Cho, J.Y.; Chung, B.Y. Enhancement of the Chaperone Activity of Alkyl Hydroperoxide Reductase C from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Resulting from a Point-Specific Mutation Confers Heat Tolerance in *Escherichia coli*. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 594–602. [[CrossRef](#)]
64. Parsonage, D.; Nelson, K.J.; Ferrer-Sueta, G.; Alley, S.; Karplus, P.A.; Furdui, C.M.; Poole, L.B. Dissecting peroxiredoxin catalysis: Separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC. *Biochemistry* **2015**, *54*, 1567–1575. [[CrossRef](#)]
65. Cha, M.K.; Bae, Y.J.; Kim, K.J.; Park, B.J.; Kim, I.H. Characterization of two alkyl hydroperoxide reductase C homologs alkyl hydroperoxide reductase C_H1 and alkyl hydroperoxide reductase C_H2 in *Bacillus subtilis*. *World J. Biol. Chem.* **2015**, *6*, 249–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Charoenlap, N.; Eiamphungporn, W.; Chauvatcharin, N.; Utamapongchai, S.; Vattanaviboon, P.; Mongkolsuk, S. OxyR mediated compensatory expression between *ahpC* and *katA* and the significance of *ahpC* in protection from hydrogen peroxide in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *249*, 73–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Fukumori, F.; Kishii, M. Molecular cloning and transcriptional analysis of the alkyl hydroperoxide reductase genes from *Pseudomonas putida* KT2442. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2001**, *47*, 269–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Loprasert, S.; Atichartpongkun, S.; Whangsuk, W.; Mongkolsuk, S. Isolation and analysis of the *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase gene and the peroxide sensor regulator genes *ahpC* and *ahpF-oxyR-orfX*. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 3944–3949. [[CrossRef](#)]
69. Sherman, D.R.; Mdluli, K.; Hickey, M.J.; Arain, T.M.; Morris, S.L.; Barry, C.E., 3rd; Stover, C.K. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1996**, *272*, 1641–1643. [[CrossRef](#)]

-
70. Wilson, T.; de Lisle, G.W.; Marcinkeviciene, J.A.; Blanchard, J.S.; Collins, D.M. Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that AhpC of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology* **1998**, *144*, 2687–2695. [[CrossRef](#)]
 71. Zhang, B.; Gu, H.; Yang, Y.; Bai, H.; Zhao, C.; Si, M.; Su, T.; Shen, X. Molecular Mechanisms of AhpC in Resistance to Oxidative Stress in *Burkholderia thailandensis*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 72. Wang, G.; Conover, R.C.; Benoit, S.; Olczak, A.A.; Olson, J.W.; Johnson, M.K.; Maier, R.J. Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Apêndice B

Artigo publicado no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2021. 105(14-15), 5701–5717).

de Oliveira, M.A., Tairum, C.A., Netto, L., de Oliveira, A., Aleixo-Silva, R.L., Cabrera, V., Breyer, C.A., & Dos Santos, M.C. 2021. "Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms".



Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms

Marcos Antonio de Oliveira¹ · Carlos A. Tairum² · Luis Eduardo Soares Netto² · Ana Laura Pires de Oliveira¹ · Rogerio Luis Aleixo-Silva² · Vitoria Isabela Montanhero Cabrera¹ · Carlos A. Breyer¹ · Melina Cardoso dos Santos¹

Received: 1 February 2021 / Revised: 11 May 2021 / Accepted: 20 May 2021 / Published online: 14 July 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The oxidative and nitrosative responses generated by animals and plants are important defenses against infection and establishment of pathogenic microorganisms such as bacteria, fungi, and protozoa. Among distinct oxidant species, hydroperoxides are a group of chemically diverse compounds that comprise small hydrophilic molecules, such as hydrogen peroxide and peroxyxynitrite, and bulky hydrophobic species, such as organic hydroperoxides. Peroxiredoxins (Prx) are ubiquitous enzymes that use a highly reactive cysteine residue to decompose hydroperoxides and can also perform other functions, like molecular chaperone and phospholipase activities, contributing to microbial protection against the host defenses. Prx are present in distinct cell compartments and, in some cases, they can be secreted to the extracellular environment. Despite their high abundance, Prx expression can be further increased in response to oxidative stress promoted by host defense systems, by treatment with hydroperoxides or by antibiotics. In consequence, some isoforms have been described as virulence factors, highlighting their importance in pathogenesis. Prx are very diverse and are classified into six different classes (Prx1-AhpC, BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, Prx6, and AhpE) based on structural and biochemical features. Some groups are absent in hosts, while others present structural peculiarities that differentiate them from the host's isoforms. In this context, the intrinsic characteristics of these enzymes may aid the development of new drugs to combat pathogenic microorganisms. Additionally, since some isoforms are also found in the extracellular environment, Prx emerge as attractive targets for the production of diagnostic tests and vaccines.

Key points

- *Peroxiredoxins are front-line defenses against host oxidative and nitrosative stress.*
- *Functional and structural peculiarities differ pathogen and host enzymes.*
- *Peroxiredoxins are potential targets to microbicidal drugs.*

Keywords Peroxiredoxins · Oxidative stress · Antibiotic resistance · Hydroperoxides · Virulence · Structure

Introduction

Microbial pathogen infections trigger several host defense mechanisms (Medzhitov 2007; Numberger et al. 2004), such as the release of large amounts of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS). Among the ROS, hydrogen peroxide and superoxide are not powerful oxidants, but they can be converted to hydroxyl radical which is a highly reactive species (Halliwell and Gutteridge 2015). Furthermore, myeloperoxidase can use hydrogen peroxide to generate highly microbicidal species, such as hypochlorous acid (Winterbourn et al. 2016). Host organisms also produce nitric oxide radicals and derived oxidants (Prolo et al. 2014), such as peroxyxynitrite, a powerful oxidizing hydroperoxide (Radi 2018). Additionally, the oxidation of amino acids, nucleotides, and lipids generate high levels of organic

Marcos Antonio de Oliveira and Carlos A. Tairum contributed equally to this work.

✉ Marcos Antonio de Oliveira
marcos.a.oliveira@clp.unesp.br

✉ Luis Eduardo Soares Netto
nettoles@ib.usp.br

¹ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus do Litoral Paulista, São Vicente 11330-900, Brazil

² Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-090, Brazil

hydroperoxides (OHPs) over the course of the host response. Noteworthy, some evidences indicate that microbicidal drugs can enhance superoxide and hydrogen peroxide production (Dwyer et al. 2014; Lam et al. 2020; Repolès et al. 2020). Therefore, pathogens must remove these oxidants for establishment in a host.

Pathogenic organisms express several antioxidant enzymes to counteract oxidative insults (Staerck et al. 2017). Among them, catalases (Cat) specifically decompose hydrogen peroxide and peroxyxynitrite, while glutathione peroxidases (Gpx) and peroxiredoxins (Prx) can decompose several kinds of hydroperoxides, including hydrogen peroxide, peroxyxynitrite, and OHPs (Staerck et al. 2017). Therefore, antioxidant enzymes gain importance with the emergence of microbial strains resistant to multiple drugs, a global health threat, and the search for novel biological targets is a worldwide concern (Fisher et al. 2017). Since that some evidence indicates that microbicidal drugs can enhance superoxide and hydrogen peroxide production (Dwyer et al. 2014; Lam et al. 2020; Repolès et al. 2020), the search for antioxidant enzyme inhibitors raises as a possible alternative approach. Prx members are important targets due to their diversity and structural differences between isoforms found in pathogenic microbial organisms and hosts. Here, we aim to review several aspects of Prx enzymes such as abundance, substrate diversity, and structural/functional peculiarities that place them as potential targets for novel strategies to combat microbial infections.

Abundance and distribution of peroxiredoxins in microbial cells

Prx are the main scavengers of hydroperoxides in several organisms (Condeles et al. 2020; Seaver and Imlay 2001; Winterbourn and Hampton 2008) and especially in some microbial pathogens that lack both catalase and Gpx (Mastronicola et al. 2014; Richard et al. 2011). The significance of Prx in bacteria is highlighted by the number of different isoforms expressed, ranging from three to ten enzyme isoforms, representing some of the most abundant proteins in several bacteria. Additionally, bacterial Prx are found in the cytosol, associated with the cell membrane or with DNA, in the periplasmic space and even in biofilms (Cha et al. 1995; Enany et al. 2014; Hicks et al. 2010; Murphy et al. 2005; O'Riordan et al. 2012). It is important to mention that bacterial Prx are naturally abundant in basal conditions. Nonetheless, immune cells such as macrophages or neutrophils impose oxidative insults that can enhance Prx levels in *Salmonella typhimurium* and *Mycobacterium avium* (Francis et al. 1997; Zhu et al. 2008). Additionally, Prx are upregulated by distinct bactericidal drugs, such as amikacin, ciprofloxacin, kanamycin, tetracycline, vancomycin among others (Chen et al. 2013; Kumar et al. 2013; Li et al. 2018; Vranakis et al. 2012).

The number of Prx isoforms is also elevated in eukaryotic organisms, achieving up to six isoforms in fungi (Park et al. 2000; Rocha et al. 2018; Skrzypek et al. 2017) and three to five in protozoans (Richard et al. 2011). Several isoforms are distributed throughout diverse cellular compartments, such as the cytosol, mitochondria, nucleus, peroxisomes, protozoan glycosomes, and they are even exported outside cells (Park et al. 2000; Richard et al. 2011; Rocha et al. 2018; Urban et al. 2005; Vallejo et al. 2012). In fungi, extracellular Prx isoforms are also associated with the hypha/cell wall and biofilm (Choi et al. 2003). It is important to highlight that biofilm confers resistance to bacteria and fungi against host immune defenses and antimicrobial drugs (Lynch and Robertson 2008) and the extracellular location of some Prx in pathogenic microorganisms makes these enzymes promising targets for diagnostic tests and vaccines (Fereig et al. 2017; O'Riordan et al. 2012; Rodrigues et al. 2020).

Prx are also abundant in microbial eukaryotes, such as fungi and protozoans. *Saccharomyces cerevisiae*, a model yeast for genetic and biochemical studies, is an opportunistic pathogen in immunocompromised individuals (Souza Goebel et al. 2013). In this yeast, the abundance of Prx isoforms can attain ~ 1% of the total soluble proteins in the cell and are much more abundant than catalases and Gpx (Ghaemmaghami et al. 2003). Proteomic approaches of representative fungi and protozoans revealed a high amount of Prx in these microorganisms (de Godoy et al. 2012; Kaneva et al. 2018).

Similarly to observed in bacteria, Prx expression levels are enhanced in pathogenic fungi and protozoans in response to oxidative burst and to antimicrobial agents. In *Candida glabrata*, the expression of the Prx is strongly enhanced when insulted by the oxidative stress promoted by the host immune system (Gutierrez-Escobedo et al. 2020). In *Trypanosoma cruzi*, ectopic overexpression of Prx isoforms enhances the resistance of the pathogen against peroxyxynitrite and hydrogen peroxide produced by macrophages and pathogen metabolism (Piacenza et al. 2008). Concerning the antimicrobial drugs, it was observed an increased Prx expression for a wide range of antimicrobial drugs, such as amphotericin B, antimony, benznidazole, camphene thiosemicarbazide, caspofungin, flucanazole, fludioxonil, itraconazole, miltefosine, and others (Andrade et al. 2008; Das 2018; Gautam et al. 2016; Gautam et al. 2008; Shishodia et al. 2019; Silva et al. 2018; VEDIYAPPAN et al. 2010). Overall, the data presented in this section highlight the importance of Prx for microbial pathogen survival under oxidative stress conditions.

Catalytic mechanism of Prx

Prx are Cys-based peroxidases that efficiently decompose several kinds of hydroperoxides, achieving rate

constants up to $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Reyes et al. 2011; Tairum et al. 2016). The catalytic cysteine (named peroxidatic cysteine, C_P) reduces the hydroperoxide and is oxidized to sulfenic acid ($C_P\text{-SOH}$) (Hall et al. 2011). Thr (or Ser) and Arg are found with C_P in the active site of all Prx, composing a triad that is essential to the catalytic power of Prx enzymes (Fig. 1) (Hall et al. 2010; Poole and Nelson 2016). The catalytic triad Thr can be substituted by Ser in some Prx, with structural and functional consequences, but with no effect on reactivity under low concentrations of hydroperoxides (Tairum et al. 2016). Interestingly, catalytic Ser is more frequent in Bacteria than in Archaea or in Eukarya domains of life, but the evolutive reasons for this distribution are not clear to date (Tairum et al., 2021, in press).

C_P is very reactive to most hydroperoxides due to the active site microenvironment (Hall et al. 2010). Thr/Ser and Arg of the catalytic triad activate C_P and orientate the substrate in the active site for optimal reactivity (Fig. 1) through a S_N2 mechanism (Hall et al. 2010). The oxidation of C_P by hydroperoxide is common to all Prx, while the subsequent steps define two groups. Some Prx have only one catalytic cysteine (1-Cys Prx), while a second cysteine residue (named resolving cysteine, C_R) is involved in the catalysis of another group (2-Cys Prx) by forming a disulfide bond ($C_P\text{-S-S-}C_R$). 2-Cys Prx can be further divided into atypical, in which both cysteines are in the same subunit; and typical, that have a homodimer as minimal catalytic unit due to C_P and C_R are in different chains (Perkins et al. 2015).

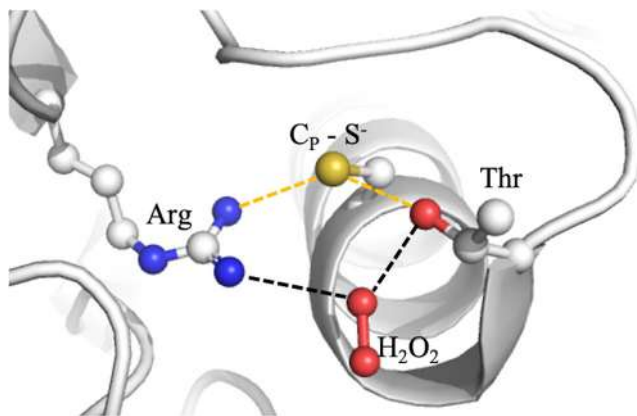


Fig. 1 Catalytic triad of Prx. Polar interactions among Arg, Thr/Ser, and C_P (yellow lines) stabilize the S^- in the deprotonated (thiolate) form. Polar interaction among Arg, Thr/Ser, and substrate (black lines) orientate the hydroperoxide towards the thiolate of C_P . The crystallographic structure of yeast Prx (PDB = 3SBC) is represented as cartoon (light gray), highlighted amino acids are represented as balls and sticks and colored as follows: carbon = light gray, oxygen = red, nitrogen = blue, and sulfur = yellow

Common aspects, structural variability, and alternative functions of Prx

All Prx enzymes display the thioredoxin-fold (Trx-fold) that is composed of four β -sheets surrounded by three α -helices, a structure that is shared with several other redox proteins from the thioredoxin super-family (Hall et al. 2011). Prx enzymes evolved from a common Trx ancestor, with the addition of secondary structural elements (Copley et al. 2004). They are subdivided into six classes: AhpC-Prx1, BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, Prx6, and AhpE (Fig. 2a–f) based on amino acid residues in the active site and structure (Nelson et al. 2011). The AhpC-Prx1 class is mostly composed of the typical 2-Cys Prx, while the atypical 2-Cys Prx are distributed in three classes: BCP-PrxQ, Prx5, and Tpx. Proteins displaying the 1-Cys Prx mechanism are mainly present in the Prx6 group, but there are also 1-Cys Prx in the BCP-PrxQ, Prx5, and AhpE classes (Nelson et al. 2011).

The oligomeric states of these enzymes are also very diverse: monomers, dimers, decamers, and other quaternary species (Fig. 3) (Hall et al. 2011; Jang et al. 2004; Nelson et al. 2011; Tairum et al. 2016). The Prx dimers can assemble in two different ways: A-type (Fig. 3a), presenting unique

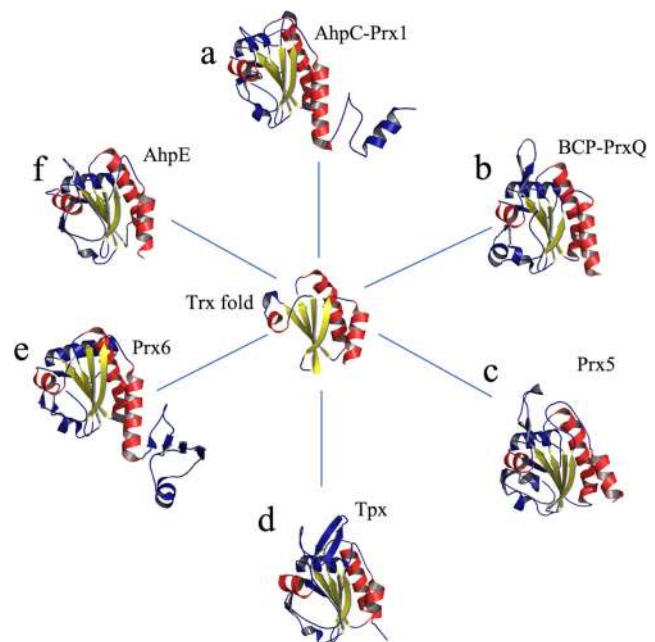


Fig. 2 The common Trx-fold and structural variations among the six Prx classes. Prx from different organisms as representatives of the six classes are derived from a common Trx-fold (PDB = 2J23) (center of image). (a) AhpC-Prx1, yeast Tsa1 (PDB = 3SBC); (b) BCP-PrxQ, *Xylella fastidiosa* BCP (PDB = 3IXR); (c) Prx5, *P. falciparum* AOP (PDB = 1X1Y); (d) Tpx, *E. coli* Tpx (PDB = 3HVV); (e) Prx6, *P. aeruginosa* LsfA (PDB = 6P0W); (f) AhpE, *M. tuberculosis* AhpE (PDB = 4X0X). The structures are represented as cartoon, in which the α -helices that compose the Trx-fold are represented in red and the β -sheets are colored in yellow. Additional elements specific to each class are shown in blue. The structures are represented as monomers for clarity

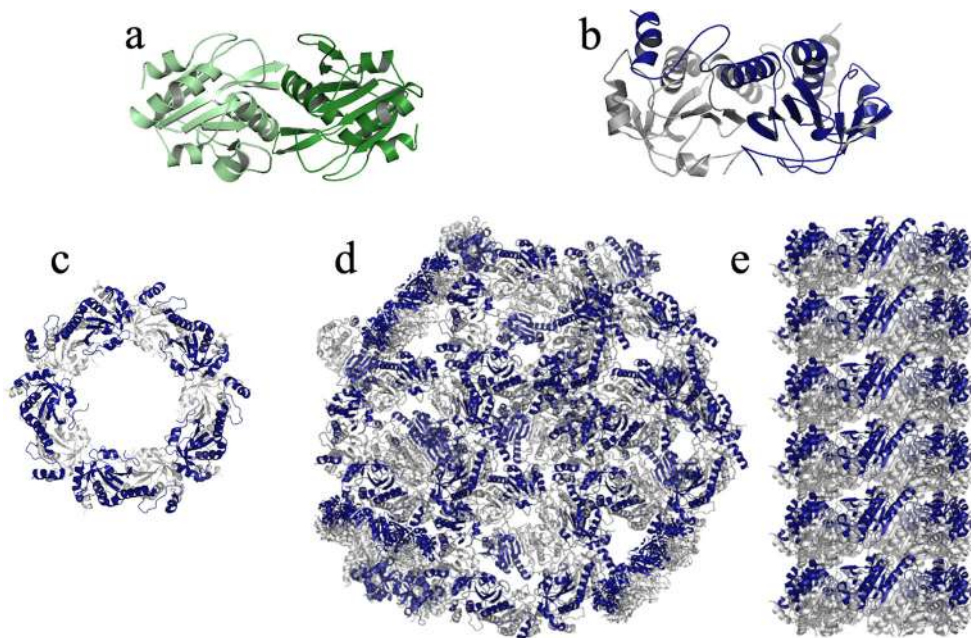


Fig. 3 Representation of the two types of Prx dimers and the quaternary structures diversity of peroxiredoxins. Structures are represented as cartoons, and each monomer is represented by a different color. (a) A-type dimers present in the BCP-PrxQ, Tpx, Prx5, and AhpE classes. The A-type is represented by yeast Ahp1 (PDB = 4OWY), and the monomers are colored in light green and green. (b) B-type dimers are found in the classes AhpC-Prx1 and Prx6 (light gray and dark blue) (PDB = 3SBC).

Some dimeric Prx from the AhpC-Prx1 and Prx6 classes can assemble into toroidal structures formed by pentamers of dimers (decamers) (PDB = 3SBC). (c) Under oxidative or heat stresses, some Prx can organize in high molecular weight (HMW) species as spherical (d) or filamentous multimers (e). The HMW complexes are illustrative and were constructed using the yeast Prx coordinates (PDB = 3SBC). The monomers of the dimers are represented in dark blue and light gray for clarity

globular domain, and B-type (Fig. 3b), in which the central β -sheets of both monomers are aligned (Poole and Nelson 2016). Members of the BCP-PrxQ, Prx5, Tpx, and AhpE classes can form A-type dimers, but there is a wide variation at this organization level. Most proteins of the BCP-PrxQ class are monomers, with a few of them as A-type dimers. Representatives of the Prx5 group are detected as monomers and dimers, and some bacterial members possess Prx5 fused to a glutaredoxin molecule and can form tetramers (Kim et al. 2003; Nelson et al. 2011). The Tpx members are found only as A-type dimers. Finally, the AhpE members assemble as A-type dimers that can further associate as octamers (tetramers of dimers) (Hall et al. 2011).

The B-type dimer is present in members of the AhpC-Prx1 and Prx6 classes, representing the minimum catalytic unit of AhpC-Prx1, since C_P and C_R are present in different monomers. Interestingly, AhpC-Prx1 and Prx6 enzymes can further assemble into tetramers, octamers, decamers, dodecamers, or high molecular weight species (Poole et al. 2011; Poole and Nelson 2016). Additionally, AhpC-Prx1 enzymes with Thr in the catalytic triad possess the particularity of switching between oligomeric states in a redox-dependent manner: decamers in the reduced form (Fig. 3c) and dimers in the disulfide state (Tairum et al. 2016).

The diverse structural features among Prx classes might represent an opportunity for the characterization of inhibitors used as drugs in the combat of pathogens. Part of the diversity

of proteins of the six Prx classes resides in the amino acid composition of the active sites (Hall et al. 2011). Tpx and AhpE members are found almost exclusively in prokaryotes and BCP-PrxQ is absent in animals (Poole and Nelson 2016). For the other three classes, specific features can be taken into account to design molecules that specifically target enzymes from pathogens and not from the hosts.

The amino acid sequences of microbial Prx isoforms (bacteria, fungi, and protozoans) differ considerably from host enzymes (mammals and plants), ranging from 35 to 60% of identity (data not shown). Some of these different residues are found in the active site. These differences can be explored for obtaining specific inhibitors. To illustrate this variation, the structure of representative proteins from pathogens and hosts of the subclasses AhpC-Prx1, BCP-PrxQ, Prx5, and Prx6 were overlapped (Fig. 4). Notably, some of the differences between host and pathogen protein surfaces are close to C_P (Fig. 4a–d). AhpC-Prx1 from eukaryotes possesses a C-terminal α -helix and other specific features involved in the increased susceptibility of C_P to hyperoxidation that are absent in most prokaryotic proteins (Wood et al. 2003) (Fig. 4a). The catalytic triad Thr residue is replaced by a Ser residue in some pathogenic bacteria (*Staphylococcus* sp. and *Bacillus* sp., among others), fungi (Saccharomycetales), and protozoans (*Leishmania* sp.), but is almost absent in hosts (unpublished data). This single substitution confers considerable structural and functional differences between Prx containing Thr or Ser

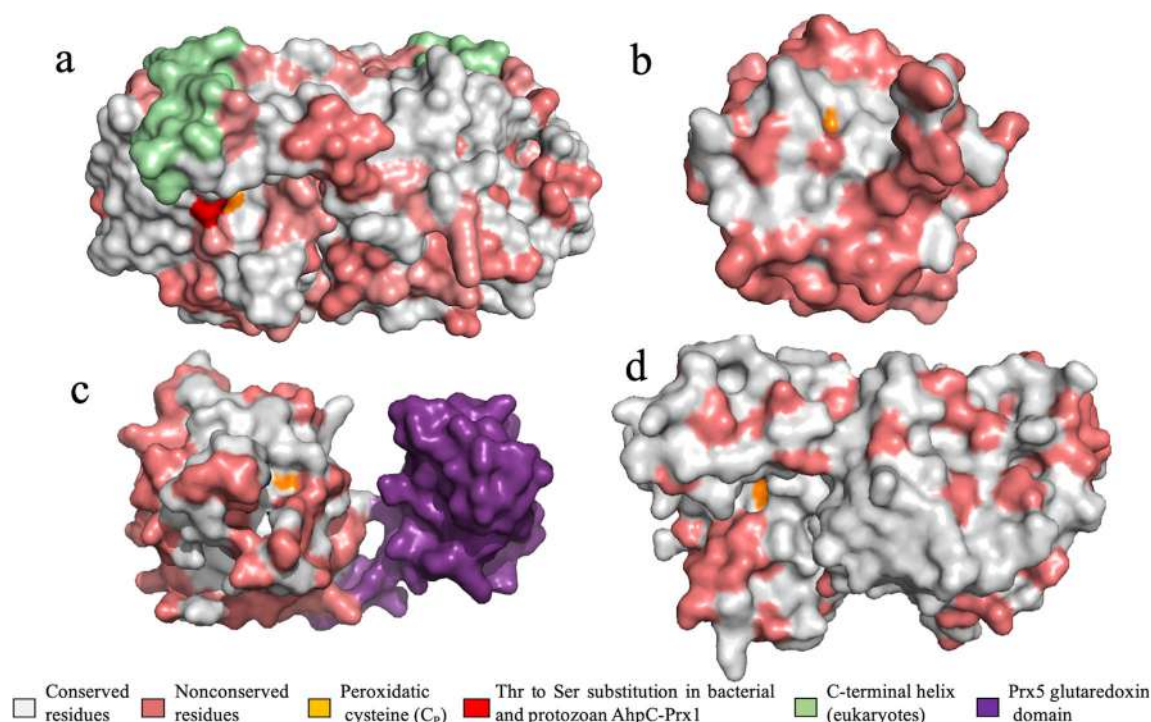


Fig. 4 Conservation of surface residues among Prx from the host and pathogen. Molecular surfaces of Prx enzymes, depicting the common amino acids between host and pathogen (white), the different ones (pink), and the active site catalytic C_p (orange). Conserved residues were considered the same amino acid or amino acids presenting similar physicochemical properties. (a) Molecular surface of human AhpC-Prx1 (Prx2; PDB: 1QMV) was used as template and compared to the homologue isoform from *S. typhimurium* (UniProt ID: P0A251). C-

terminal α -helix that are absent in most prokaryotes is colored in light green. Position of Thr/Ser in the active site is highlighted in red. (b) BCP-PrxQ from *X. fastidiosa* (PDB: 3IXR) compared with the plant *Citrus sinensis* (NCBI ID: XP_006474598.1). (c) The structure of Prx5 from *H. influenzae* (PDB: 1NM3) and human Prx5 (UniProt ID: P30044). The additional Grx domain present in some pathogenic bacteria is colored in purple. (d) Human Prx6 (PDB: 1PRX) compared with its bacterial counterpart from *P. aeruginosa* (UniProt ID: A0A0H2ZEH5)

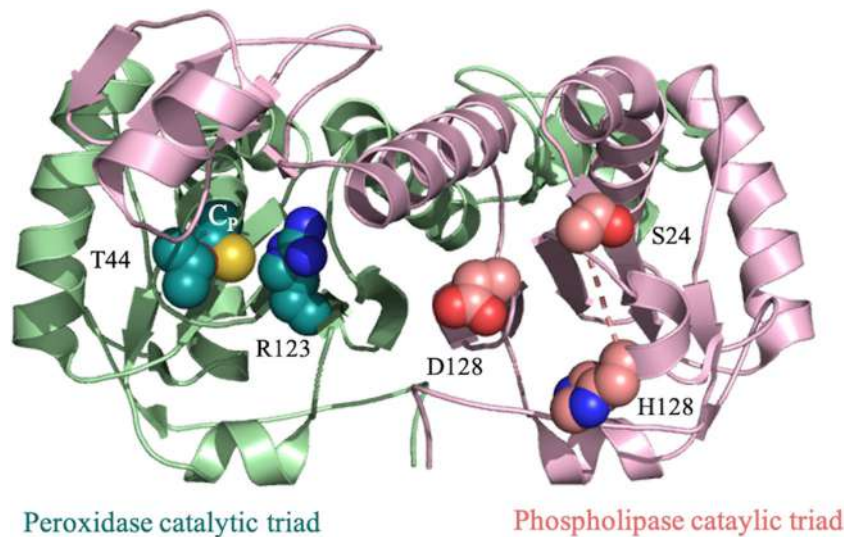
(Tairum et al. 2016). The Thr/Ser substitution may also provide a different microenvironment to ligands targeted to Prx from pathogens (Fig. 4a). For some pathogenic bacteria, such as *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Vibrio cholerae*, the differences among the Prx5 isoforms are accentuated as a consequence of a glutaredoxin domain fused to the C-terminal region (Fig. 4c), a feature that is not observed in animal and plant isoforms (Kim et al. 2003).

Besides the peroxidase activity, some peroxiredoxins present additional functions. At high hydroperoxide concentrations, C_p is hyperoxidized to sulfinic acid (C_p -SO₂H), resulting in loss of peroxidase activity and concomitant acquisition of chaperone (holdase) function. In parallel, these 2-Cys Prxs undergo structural rearrangements to form high molecular weight species (HMW), presenting a spherical or filamentous organization (Fig. 3 d and e) (Hall et al. 2009; Jang et al. 2004; Saccoccia et al. 2012; Tairum et al. 2016). A C-terminal α -helix, which is restricted to eukaryotic isoforms with rare exceptions (e.g., *Helicobacter pylori* AhpC), facilitates C_p hyperoxidation by impairing disulfide formation (Hall et al. 2009). Molecular chaperone activity has also been described in Prx from some microorganisms previously

exposed to heat shock without the requirement of C_p hyperoxidation (Kamariah et al. 2018; Morais et al. 2017; Saccoccia et al. 2012; Teixeira et al. 2015). In addition, a BCP-PrxQ from *Deinococcus radiodurans* and a Prx6 from *Anabaena* sp. also present molecular chaperone activity (Cho et al. 2019; Mishra et al. 2017).

Another additional function displayed by some members of the Prx6 class is a calcium-independent phospholipase A₂ activity (PLA₂), which is unrelated to the peroxidase function (Bannitz-Fernandes et al. 2019). The PLA₂ activity of Prx6 depends on a second active site separated from the peroxidase center and composed of a catalytic Ser, a His and an Asp (Fig. 5). In pathogens, PLA₂ activity was described in Prx6 enzymes from *Pseudomonas aeruginosa* and from *Aspergillus fumigatus*, two respiratory airway pathogens. These phospholipase activities might be related to the metabolism of surfactants in the lungs during colonization by damaging phospholipids from the host cell membrane or nutrient acquisition (Bannitz-Fernandes et al. 2019). Besides the peroxidase function, these additional activities of some Prx groups may support the ideal condition for organism survival, especially microorganisms.

Fig. 5 Catalytic triads of peroxidase and PLA₂ activities of a representative Prx6 enzyme. The active sites of the two functions performed by members of the Prx6 class are independent. The LsfA structure (PDB = 6P0W) is represented as cartoon and each monomer present a different color (pale green and light pink). Corresponding residues for each catalytic triad are represented as spheres and colored as follows: C = green or pink (peroxidase or phospholipase catalytic triad, respectively), N = blue, O = red, and S = light orange



Peroxiredoxin reductants

To perform catalysis efficiently, Prx requires appropriate reductants for fast turnover and the Trx system is the most frequently employed. The Trx system comprises thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (TrxR), and NADPH as electron source (Oliveira et al. 2010). Although Trx enzymes are highly conserved, TrxR enzymes are distinct between microorganisms/plants and mammals and have been explored as drug targets (Koch et al. 2013). In both cases, TrxR are obligate dimers, but the enzymes present low molecular weight (molecular mass of monomers ~ 33 kDa) in bacteria, fungi, and plants. In mammals, TrxR possesses ~ 50 kDa per monomer and contains a selenocysteine residue (Oliveira et al. 2010). Below, we describe variations found in the reduction of Prx enzymes from the canonical Trx system.

AhpC-Prx1

A specialized Trx system in bacteria, named AhpF, is dedicated to the reduction of AhpC-Prx1 enzymes. AhpF is a multidomain enzyme, containing a TrxR portion fused to two Trx domains in a single polypeptide. Although AhpF can use either NADH or NADPH as the electron donor, NADH is the preferred reductant (~ 100×), in contrast to the canonical TrxR that preferentially uses NADPH (Poole and Ellis 1996).

Mycobacterium tuberculosis presents another specialized system for the reduction of some AhpC-Prx1 isoforms. This system comprises AhpD, a bacterial protein with thioredoxin-like activity, but without significant structural homology to Trx. It acts together with dihydrolipoamide succinyltransferase (SucB) and dihydrolipoamide dehydrogenase (Lpd), also using electrons from NADH (Bryk et al. 2002).

Protozoans from the *Trypanosoma* and *Leishmania* genera present a unique thiol-disulfide network that is able to reduce AhpC-Prx1 members (so-called in trypanosomatids as tryparedoxin peroxidase, TxnPx) (Netto et al. 2016; Piacenza et al. 2008). The system uses NADH as an electron donor and includes the enzymes tryparedoxin (Txn), an oxidoreductase homologue of thioredoxin, and tryparedoxin reductase (TR), a flavoenzyme structurally similar to the high molecular weight TrxR. The system also comprises trypanothione (TSH), an abundant low molecular weight thiol that is only present in trypanosomatids (Jaeger and Flohe 2006). In this case, peroxiredoxin disulfide is directly reduced by Txn, which is restored to the reduced state by trypanothione. The oxidized trypanothione molecules are reduced by TR using NADH.

Prx5

Prx5 enzymes can be reduced by the glutathione (GSH) system, which is composed of glutaredoxin (Grx), GSH, glutathione reductase (GR), and NADPH. GSH forms a mixed disulfide with C_P-SOH, which is then reduced by Grx, regenerating reduced Prx. A second GSH molecule recovers reduced Grx, generating oxidized glutathione (GSSG), which is then reduced by glutathione reductase using electrons from NADPH. It is worth to highlight that Prx domain is fused to a Grx domain (Fig. 5c) in some bacterial Prx5 enzymes, which appears to confer higher reducing efficiency to the system (Kim et al. 2003).

Prx6

For some Prx6, the GSH system was proposed to turnover the enzyme (Pedrajas et al. 2016). The Prx6 class is mostly composed of 1-Cys Prx enzymes and so distinct agents directly

reduce C_P-SOH intermediate. Although several biological reductants have been tested, most of them failed to reduce microbial Prx6, including Trx system (Longo et al. 2020; Rocha et al. 2018). Prx1 from *S. cerevisiae* is an exception, being reduced by the mitochondrial Trx system (Pedrajas et al. 2000). In contrast, ascorbate is a general reductant for Prx6 enzymes (Anschau et al. 2020). We demonstrated that the sulfenic acids in yeast Prx1 and mammalian Prx6 are reduced by ascorbate, the only biological and non-thiolic reductant described for peroxiredoxins so far (Monteiro et al. 2007). Later, we determined that Prx6 isoforms from pathogenic microorganisms, such as bacteria (LsfA, *P. aeruginosa*) are reduced by ascorbate at moderate rates (Anschau et al. 2020).

AhpE

Like Prx6 class, most AhpE enzymes are 1-Cys Prx and the identities of the biological reductants are still controversial. We have previously demonstrated that AhpE from *M. tuberculosis* can be reduced by ascorbate (Monteiro et al. 2007). Additionally, *M. tuberculosis* presents a thiolic enzymatic system that is involved in AhpE reduction. This system was only described in the actinobacteria group and is represented by mycoredoxin (Mrx1), mycothiol disulfide reductase (MR), and a low molecular weight thiolic compound named mycothiol (MSH) (Hugo et al. 2014).

The unique aspects of some of the reductive systems of various Prx enzymes from microorganisms, without counterparts in the hosts, are frequently considered as important chemotherapeutic targets (Budde and Flohe 2003; Jaeger and Flohe 2006). In fact, inhibitors for peroxiredoxin reducing systems in bacteria and fungi have already been identified (Koshkin et al. 2004; Marshall et al. 2019) and inhibitors for the Prx trypanosomatid reducing system have recently shown promising results in preclinical studies (Tunes et al. 2020).

Substrate diversity and protective roles of peroxiredoxins

Prx enzymes display lower specificity towards hydroperoxides, decomposing them with high efficiency. For instance, Prx enzymes from several microbial pathogens decompose hydrogen peroxide and peroxynitrite very efficiently, at rate constants from 10^4 to $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Pineyro et al. 2011; Reyes et al. 2016; Tairum et al. 2016). The reduction of OHPs by Prx is also efficient (up to $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and important for pathogen survival (Estelle et al. 2020; Jacobson et al. 1989; Reyes et al. 2011). The vast majority of studies used synthetic organic molecules such as *tert*-butyl (*t*-BOOH) and cumene (CHP) hydroperoxides to mimic biological OHPs and members of all Prx classes efficiently decompose these molecules (Akerman and Muller 2005; Baker and Poole 2003;

Parsonage et al. 2008; Tairum et al. 2016). Table 1 summarizes different kinds hydroperoxides used to challenge distinct Prx classes.

It is important to note that OHPs are bulkier than hydrogen peroxide or peroxynitrite, so Prx active sites are large and hydrophobic to accommodate such distinct molecules. In fact, some studies demonstrate that even bulky substrates are efficiently decomposed by Prx. For instance, *M. tuberculosis* AhpE achieves rate constants of approximately $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ over arachidonic acid hydroperoxide (15-HpETE), a very bulky hydroperoxide produced by reticulocytes, eosinophils, and T-lymphocytes (Reyes et al. 2011). Interestingly, arachidonic acid is an integrant of cell membranes and AhpE was detected in the membrane fraction of *M. tuberculosis* (Gu et al. 2003). In *H. pylori*, AhpC and BCP efficiently decompose OHP, making the pathogen tolerant to oxidative stress (Baker et al. 2001). In the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, a Prx6 isoform can decompose linoleic hydroperoxide more efficiently than *t*-BOOH and CHP (3–8-fold higher, respectively) (Longo et al. 2020). Accordingly, linoleic and linolenic acid hydroperoxides are also of high importance in infection by pathogens due to their pronounced microbicidal effect (Estelle et al. 2020). Together, the information presented in this section demonstrates the substrate versatility of Prx, indicating the role of these enzymes in cell protection, including against oxidative stress generated by OHPs.

Effects of Prx inactivation in pathogenic microorganism cells

Silencing of Prx usually renders cells more sensitive to hydroperoxides insults (Castro et al. 2020; Comtois et al. 2003; Cosgrove et al. 2007; Hillmann et al. 2016; Missall et al. 2004; Rocha et al. 2018; Teixeira et al. 2015). Their importance in hydroperoxide decomposition can be associated with DNA protection. In fact, the first bacterial peroxiredoxins described (AhpC from *Escherichia coli* and *S. typhimurium*) were identified by observing that strains lacking *ahpC* genes presented high mutation rates, while strains overexpressing AhpC suppressed DNA alterations (Storz et al. 1987). This protective role was later related to the ability of AhpC to decompose OHPs (Jacobson et al. 1989), a phenomenon also observed in other bacterial species and eukaryotic microorganisms. For instance, ΔahpC from *Bacteroides fragilis* presents five times more mutations than the wild-type strain (Rocha and Smith 1999). Although the deletion of one or more Prx isoforms in the yeast *S. cerevisiae* is not lethal, it compromises genome stability (Ogusucu et al. 2009). In *Candida albicans*, the Δtsa1 strains also present increased mutation rates, indicating that Prx contributes to genome stability (Urban et al. 2005). The protective role of Prx in DNA

Table 1 List of different hydroperoxides that are decomposed by Prx of each class in bacteria, fungi, and protozoans

Prx class	Group	Hydroperoxide	Enzyme/organism	Reference(s)
AhpC-Prx1	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; ethyl hydroperoxide; linoleic acid hydroperoxide; 5'-hydroperoxymethyluracil (thymine hydroperoxide); 5-hydroperoxy-6-hydroxy-dihydrothymine; 5-hydroperoxy-6-methyl-6-hepten-2-one and 6-hydroperoxy-6-methyl-4-hepten-2-one; 7 α -hydroperoxy-3 β -hydroxycholest-6-ene; trans-9-hydroperoxyoctadec-10-enoic acid and trans-10-hydroperoxyoctadec-8-enoic acid; trans-pinocarveyl hydroperoxide (3)	<i>EcAhpC</i> , <i>HpAhpC</i> , <i>MtAhpC</i> , <i>S/AhpC</i>	Baker et al. 2001; Bryk et al. 2000; Hillas et al. 2000; Jacobson et al. 1989; Jaeger et al. 2004; Parsonage et al. 2005
AhpC-Prx1	Fungi	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite	<i>ScTsa1</i> , <i>ScTsa2</i>	Munhoz and Netto 2004; Ogusucu et al. 2007; Tairum et al. 2016
AhpC-Prx1	Protozoa	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; linoleic acid hydroperoxide; phosphatidylcholine hydroperoxide	<i>GjTXNPx</i> , <i>GiPrx1a</i> , <i>GiPrx1b</i> , <i>LmTryPI</i> , <i>TbcTXNPx</i> , <i>TccTXNPx</i> , <i>TcmTXNPx</i> , <i>TgcTXNPx</i>	Kerman and Muller 2005; Flohé et al. 2002; König and Fairlamb 2007; Mastronicola et al. 2014; Nogoceke et al. 1997; Pineyro et al. 2011; Trujillo et al. 2004
BCP-PrxQ	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; linoleic acid hydroperoxide; fatty acids hydroperoxides	<i>EcBCP</i> , <i>HpBCP</i> , <i>MbPrxQB</i> , <i>XjPrxQ</i>	Horta et al. 2010; Jeong et al. 2000; Reyes et al. 2016; Wang et al. 2005
Tpx	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite	<i>EcTpx</i> , <i>MtTpx</i>	Baker and Poole 2003; Jaeger et al. 2004
Prx5	Bacteria	H ₂ O ₂	<i>VbPrx3</i>	Ahn et al. 2018
Prx5	Fungi	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH	<i>AjAsp f3</i>	Hillmann et al. 2016
Prx5	Protozoa	<i>t</i> -BOOH	<i>PjAOP</i>	Staudacher et al. 2015
Prx6	Fungi	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; linoleic acid hydroperoxide	<i>AjPrx1</i> , <i>AjPrxC</i> , <i>PbPrx1</i>	Longo et al. 2020; Rocha et al. 2018
AhpE	Bacteria	H ₂ O ₂ ; <i>t</i> -BOOH; CHP; peroxynitrite; 15-HpETE (arachidonic hydroperoxide); 3-CPBA (3-chloroperoxybenzoic acid); HCO ₄ ⁻ (peroxymonocarbonate); linoleic acid hydroperoxide	<i>MtAhpE</i>	Hugo et al. 2009; Reyes et al. 2011

Aj = *Aspergillus fumigatus*; *Cf* = *Crithidia fasciculata*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Gi* = *Giardia intestinalis*; *Hp* = *Helicobacter pylori*; *Lm* = *Leishmania major*; *Mb* = *Mycobacterium bovis*; *Mt* = *Mycobacterium tuberculosis*; *Pb* = *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pf* = *Plasmodium falciparum*; *Sc* = *Saccharomyces cerevisiae*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Tb* = *Trypanosoma brucei*; *Tc* = *Trypanosoma cruzi*; *Tg* = *Toxoplasma gondii*; *Vb* = *Vibrio vulnificus*

integrity was also observed under nitrosative stress in *Trypanosoma brucei*. Defective strains in the enzyme uracil-DNA glycosylase (UNG), a component of the base excision DNA repair system, exhibit reduced infectivity and increased levels of DNA damage (Yague-Capilla et al. 2019). Notably, surviving cells of the *T. brucei* Δ ung strain present increased expression of AhpC-Prx1 peroxiredoxin (Tryp1), which is correlated with peroxynitrite detoxification (Yague-Capilla et al. 2019).

Prx also provide protection through a mechanism related to their chaperone/holdase activity. As explained before, the acquisition of chaperone activity can occur by C_P hyperoxidation (Jang et al. 2004). Since almost all bacterial AhpCs are resistant to C_P hyperoxidation (Wood et al. 2003), the acquisition of chaperone activity to these microorganisms probably involves a redox independent mechanism, which is dependent on thermal insults (Jang et al. 2004), but still poorly understood. Only few descriptions of chaperone activities of bacterial Prx isoforms have been performed to date (Buranajitpakorn et al. 2011; Kamariah et al. 2018). The chaperone function of *E. coli* AhpC was mostly investigated in cell-free systems. In one case, no evidence of heat shock protection by AhpC in *Xanthomonas campestris* was obtained (Buranajitpakorn et al. 2011).

In fungi, the acquisition of chaperone function was described for the two cytosolic isoforms of the AhpC-Prx1 class. Tsa1 and Tsa2 undergo transitions from peroxidase to chaperone in response to oxidative stress and thermal insults. Additionally, null individual mutants or the double mutant Δ ttsa1/ Δ ttsa2 present a significant reduction in cell viability compared with the wild-type strain when subjected to heat shock (Jang et al. 2004). A decrease in cell survival as a consequence of thermal insult has also been reported in *Cryptococcus neoformans* Δ ttsa1 mutant (Missall et al. 2004).

In protozoans, the AhpC-Prx1 enzymes from *Schistosoma mansoni* and *Leishmania infantum* were described to switch from peroxidase to chaperone in response to oxidative stress or heat shock (Saccoccia et al. 2012; Teixeira et al. 2015). Furthermore, genetic inactivation of the *L. infantum* mitochondrial AhpC-Prx1 isoform (Δ mtxnp) rendered cells a thermosensitive phenotype. High levels of protein aggregation were detected at 37°C (Teixeira et al. 2015), which is compatible with the physiological temperature of mammalian hosts.

Besides inactivating Prx by genetic approaches, pharmacological inhibitors represent an alternative to investigate the roles of these proteins in pathogens. However, only a few microbial peroxiredoxin inhibitors have been identified to date. For instance, showdomycin is a potent C-glycosyl nucleoside antibiotic isolated from *Streptomyces showdoensis* that was detected as a ligand of AhpC catalytic cysteines from *Staphylococcus aureus* (Bottcher and Sieber 2010). In protozoans, conoidin A was initially described as an inhibitor of host cell invasion by the pathogenic protozoan *Toxoplasma*

gondii; this compound was later shown to bind covalently to cysteine residues of TgPrxII, a peroxiredoxin from the AhpC-Prx1 subclass. Conoidin A also prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and increases the sensitivity of the parasite in host cells to chloroquine, an antimalarial drug (Haraldsen et al. 2009). Both conoidin A and showdomycin are bulky molecules with large hydrophobic backbones, which may mimic large biological substrates, as OHPs. Therefore, inactivating Prx isoforms may be a promising approach to enhance the death of pathogens resistant to multiple drugs.

Prx as virulence factors

Since Prx play important roles in pathogen survival, they may represent virulence factors. In fact, enzymes from five of the six Prx classes have been described as virulence factors in pathogens (Table 2). No studies have yet been performed to examine the involvement of AhpE enzymes in virulence. The role of different Prx classes in the virulence of the pathogenic microorganisms is summarized below.

AhpC-Prx1

AhpC-Prx1 isoforms were associated with *Helicobacter cinaedi* and *H. pylori* virulence, since *ahpC* mutants (Δ *ahpC*) could not to colonize mice stomach and were more susceptible to killing by macrophages (Charoenlap et al. 2012; Olczak et al. 2003). Moreover, *H. cinaedi* lacking the *ahpC* gene presented a reduced ability to colonize the intestine of both wild-type and defective in interleukin-10 (IL-10) mice (Charoenlap et al. 2012).

In the pathogenic marine bacterium *Vibrio vulnificus*, AhpC is related to both the bacterial capacity to grow during infection of human intestinal cells and the ability to infect mice (Baek et al. 2009). Infecting wild-type mice with a Δ *ahpC* strain of *Listeria monocytogenes* diminishes bacterial virulence. This Δ *ahpC* strain was virulent when infecting mice with iNOS deficiency, indicating that AhpC protects bacteria from nitric oxide-derived oxidants, such as peroxynitrite (Dons et al. 2014).

AhpC-Prx1 members from the *Mycobacterium* genus are indirectly related to the actions of catalase and isoniazid (INH), a drug largely employed in the treatment of tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis* is able to grow inside host macrophages using diverse strategies to detoxify distinct ROS and RNS. In addition, some strains of *M. tuberculosis* present INH resistance that is related to catalase (KatG) mutations (Rintiswati et al. 2011). INH is a prodrug that requires “activation” by KatG to inhibit enoyl-acyl carrier protein reductase from *M. tuberculosis* by the formation of an isonicotinoyl-NAD adduct (Yu

Table 2 Prx enzymes and virulence

Prx class	Virulence factor	Protein(s)	Organism	Reference
AhpC-Prx1	Yes	AhpC	<i>Helicobacter cinaedi</i>	Charoenlap et al. 2012
	Yes	AhpC	<i>Helicobacter pylori</i>	Olczak et al. 2003
	Yes	Prx	<i>Listeria monocytogenes</i>	Dons et al. 2014
	Yes	AhpC	<i>Mycobacterium bovis</i>	Wilson et al. 1998
	No	AhpC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Heym et al. 1997
	No	AhpC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Kaufmann et al. 2001
	No	AhpC	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Johnson et al. 2004
	No	AhpC	<i>Salmonella typhimurium</i>	Taylor et al. 1998
	No	AhpC	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cosgrove et al. 2007
	Yes	AhpC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brenot et al. 2005
	No	AhpC	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brenot et al. 2005
	Yes	AhpC1	<i>Vibrio vulnificus</i>	Baek et al. 2009
	No	Tsa1	<i>Candida albicans</i>	Urban et al. 2005
	Yes	Tsa1/Tsa2	<i>Candida glabrata</i>	Gutierrez-Escobedo et al. 2020
	Yes	Tsa1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Missall et al. 2004
	Yes	Prx	<i>Entamoeba histolytica</i>	Davis et al. 2006
	Yes	mTXPx	<i>Leishmania infantum</i>	Castro et al. 2011
	No	GPrx	<i>Leishmania infantum</i>	Castro et al. 2020
	Yes	Prx	<i>Plasmodium berghei</i>	Usui et al. 2015
	Yes	TXNPx	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Piñeyro et al. 2008
BCP-PrxQ	Yes	BCP	<i>Brucella melitensis</i>	Zygmunt et al. 2006
	No	Prx1	<i>Helicobacter pullorum</i>	Parente et al. 2017
	Yes	BCP	<i>Helicobacter pylori</i>	Wang et al. 2005
Tpx	Yes	Tpx	<i>Enterococcus faecalis</i>	La Carbona et al. 2007
	Yes	Tpx	<i>Helicobacter pylori</i>	Olczak et al. 2003
	Yes	Tpx	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hu and Coates 2009
	No	Tpx	<i>Salmonella enterica</i>	Horst et al. 2010
	Yes	TpxD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Hajaj et al. 2012
Prx5	Yes	Prx5	<i>Brucella abortus</i>	Hu et al. 2019
	Yes	Prx5-Grx	<i>Neisseria meningitidis</i>	Aljannat et al. 2020
	Yes	Prx3	<i>Vibrio vulnificus</i>	Lim et al. 2014
	Yes	Aps f3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hillmann et al. 2016
Prx6	Yes	LsfA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kaihami et al. 2014
	Yes	Prx1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rocha et al. 2018
	No	PrxB	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rocha et al. 2018
	No	PrxC	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rocha et al. 2018
	No	Tsa3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Missall et al. 2004
	Yes	MoPrx1	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Mir et al. 2015

et al. 2003). Mutants of KatG are defective in the activation of INH and in the elimination of hydrogen peroxide. Therefore, increased levels of AhpC compensate the loss

in KatG activity and are relevant in *M. tuberculosis* resistance to INH (Sherman et al. 1996).

Catalase (KatA) and AhpC also have compensatory roles in *S. aureus*, especially during aerobic growth, even though

these enzymes are not required for bacterial virulence in mice or for survival of the bacteria in human neutrophils (Cosgrove et al. 2007). AhpC deletion did not affect the virulence of *Porphyromonas gingivalis* and *S. typhimurium* in murine models (Johnson et al. 2004; Taylor et al. 1998). Curiously, *Streptococcus pyogenes* Δ ahpC was less virulent in one of two murine models tested, suggesting a differential immune response according to the host's genetic background or related to infection technique (Brenot et al. 2005).

In the fungus *C. glabrata*, deletion of *tsa2* gene has a profound impact on virulence compared with the Δ tsa1 strain, while Tsa1 and Tsa2 are highly induced when challenged by neutrophils and are important for both the survival and growth of this pathogen in the immune cells (Gutierrez-Escobedo et al. 2020). Similarly, mice infected with *C. neoformans* Δ tsa1 strains are able to survive for a longer period than animals infected with wild-type pathogenic yeast. The levels of the pathogen in the lung and in the brain of animals infected with the mutant strain were significantly lower (Missall et al. 2004). In contrast, *C. albicans* Tsa1 is an important component against oxidative stress, but it has no impact on virulence (Urban et al. 2005).

In *T. cruzi*, overexpression of two AhpC-Prx1 isoforms made the pathogen more efficient against the oxidative defenses of macrophages, indicating virulence role of both enzymes (Leitsch et al. 2018). In *Plasmodium berghei*, Δ prx1 cells were not able to survive in a murine model (Usui et al. 2015). For *Entamoeba histolytica*, nonvirulent strains had low expression levels of AhpC-Prx1 and overexpression of this enzyme rendered higher resistance to oxidative stress and partially restored pathogenicity to this strain, while gene deletion in virulent strains lead to avirulence (Davis et al. 2006). Deletion of the mitochondrial isoform of *L. infantum* decreased the long-term persistence of the pathogen in the liver and spleen of guinea pigs compared to the wild-type strain (Angelucci et al. 2016; Castro et al. 2011). Conversely, experiments using the *L. infantum* strain with a deletion of the glycosomal isoform Prx showed that this enzyme is dispensable for virulence in mice (Castro et al. 2020).

BCP-PrxQ

The *H. pylori* Δ bcp mutant has a significantly lower ability to colonize and survive in mouse stomach than the wild-type strain, mainly after 3 weeks of infection (Wang et al. 2005). In contrast, *Helicobacter pullorum* Δ prx1 and wild-type strains show no differences when challenged with hydrogen peroxide and peroxynitrite, or during macrophage infection (Parente et al. 2017). *Brucella melitensis* expresses a BCP-PrxQ required for bacterial virulence in the caprine host, which is probably related to its capacity to survive inside host macrophages (Zygmunt et al. 2006). The BCP-PrxQ from the phytopathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* is able to

repress the recognition of some pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in tobacco. This BCP-PrxQ can also protect bacteria from lipid peroxidation, preventing the formation of oxylipin (Jain et al. 2018), a class of oxygenated derivatives of polyunsaturated fatty acids that contribute to plant defense.

Tpx

Concerning the Tpx class, the *H. pylori* Δ tpx strain has a reduced capacity to colonize mouse stomach, revealing its importance during infection (Olczak et al. 2003). It is worth mentioning that isoforms from three different Prx classes are related to the virulence of *H. pylori*. Deletion of the *tpx* gene of *Enterococcus faecalis* affects survival during macrophage infection and dependence on virulence in a mouse peritonitis model (La Carbona et al. 2007). Mice infected with the Δ tpxD strain of *Streptococcus pneumoniae* showed significantly longer survival. However, this difference is not observed during blood infection, which is probably related to the high oxygen levels in the respiratory system (Hajaj et al. 2012). The inactivation of the *tpx* gene of *Salmonella enterica* makes bacteria more sensitive to hydrogen peroxide than the single mutants of the other Prx. During macrophage infection, the Δ tpx strain mutant was more sensitive, while no difference was detected in a mice infection model (Horst et al. 2010). *Mycobacterium tuberculosis* mutants lacking *tpx* cannot grow in organs of infected mice, fail to induce an inflammatory response, and show low resistance to macrophage infections. Additionally, Tpx is able to protect *M. tuberculosis* against the RNS generated by macrophages, as demonstrated by infecting iNOS knockout host cells (Hu and Coates 2009). This finding is important since *M. tuberculosis* AhpC-Prx1 isoforms are unable to exert virulence effects.

Prx5

Studies on the virulence of members from the Prx5 class are scarce. *Vibrio vulnificus* strain lacking the *prx5* isoform causes a delay in mice death by intragastric infection (Lim et al. 2014). Remarkably, a Prx5-Grx fusion of *N. meningitidis* has been related to virulence, as verified using an ex vivo human whole blood model of meningococcal bacteremia (Aljannat et al. 2020). As mentioned before, the bacterial Prx5-Grx enzymes have no counterparts in the host and may represent an important target for drugs. In fungi, an isoform from Prx5 subfamily has also been characterized as a virulence factor in *A. fumigatus* (Hillmann et al. 2016).

Prx6

Only one bacterial Prx6 has been related to virulence so far. LsfA from *P. aeruginosa* is able to specifically protect

bacteria against the oxidative burst promoted by the macrophages. The authors used an acute pneumonia model to infect mice with the mutant lacking the *lsfa* gene strain and observed an improved survival rate compared with those infected with wild-type strain (Kaihami et al. 2014).

Virulence studies were also performed on members of Prx6 subfamily in fungi. *Aspergillus fumigatus* presents three Prx6 enzymes. Experiments using the individual mutant strains for each isoform revealed that the absence of only one of them (Prx1) caused lower mortality rates compared with the wild-type. Additionally, the organs of animals infected with the $\Delta prx1$ strain have an elevated rate of pathogenic cell death and high levels of immunological defense cells (Rocha et al. 2018). For *Magnaporthe oryzae*, the lack of a Prx6 class enzyme impacts virulence in a rice seedling root model (Mir et al. 2015).

Although no obvious general rule emerges from these studies, several Prx from five subfamilies are involved in virulence of distinct pathogens. The obvious role of Prx in virulence is related to pathogen protection from the host's oxidative responses. However, the demonstration of the role of Prxs enzymes in virulence may be hampered by the fact that some pathogens have a large repertoire of antioxidant enzymes. On the other hand, Prx have additional activities such as phospholipase and chaperone that can also be involved in pathogen virulence. Therefore, two key points are probably relevant to understand the complex mechanisms underlying virulence: (i) investigating the cooperation among antioxidant enzymes to fight oxidative insults in different developmental stages and in different cell compartments and (ii) the role of each Prx activity during microbial infection and colonization.

Concluding remarks

The relevance of Prx in microorganism's response to oxidative stress has been demonstrated since their discovery in *S. typhimurium* and *E. coli* in the 1980's. Over the years, Prx have been biochemically and structurally characterized in diverse microorganisms, along with the identification of reducing and oxidizing substrates, and structural peculiarities. It has become clear that Prx enzymes display unique and key roles in the establishment and progression of infectious diseases. In fact, a number of Prx enzymes among bacteria, fungi, and protozoans present virulence properties, which may be related to any peroxiredoxin function (e.g., peroxidase, phospholipase, chaperone, or cell signaling to eukaryotes). Despite these enzymes being important for pathogen survival, few studies have applied knowledge on Prx to fight pathogenic microorganisms. An obstacle to applications like inhibitors or vaccines is that only a small number of molecules capable of efficiently and selectively inhibiting Prx enzymes is known. Overall, Prx should be regarded as an important alternative for

the development of new therapeutical approaches to overcome the globally relevant growing resistance of pathogenic microorganisms to antimicrobials.

Author contributions All authors wrote, revised, edited, and approved the final version of the paper.

Funding This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The authors M.A.O., C.A.T., L.E.S.N., R.L.A.S., A.L.P.O., V.I.M.C., and M.C.S. are members of the CEPID REDOXOMA from FAPESP (grant number 2013/07937-8). This work was also supported by grants from FAPESP to M.A.O. (2017/19942-7), C.A.T., A.L.P.O., R.L.A.S., V.I.M.C., M.C.S., and C.A.B. are recipients of fellowships from FAPESP (16/15849-0; 19/04054-4; 20/00845-4; 20/02868-1; 17/06263-4; and 11/13500-6, respectively).

Declarations

Ethics approval and consent to participate This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahn J, Jang KK, Jo I, Nurhasni H, Lim JG, Yoo J-W, Choi SH, Ha N-C, Ahn J, Jang KK, Jo I, Nurhasni H, Lim JG, Yoo J-W, Choi SH, Ha N-C (2018) Crystal structure of peroxiredoxin 3 from and its implications for scavenging peroxides and nitric oxide. *IUCrJ* 5(1):82–92
- Akerman SE, Muller S (2005) Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 280(1):564–570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406367200>
- Aljannat MAK, Oldfield NJ, Albasri HM, Dorrington LKG, Ohri RL, Wooldridge KG, Turner DPJ (2020) The moonlighting peroxiredoxin-glutaredoxin in *Neisseria meningitidis* binds plasminogen via a C-terminal lysine residue and contributes to survival in a whole blood model. *Microb Pathog* 139:103890. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103890>
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirde P, Romanha AJ (2008) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res* 7(6):2357–2367. <https://doi.org/10.1021/pr700659m>
- Angelucci F, Miele AE, Ardini M, Boumis G, Saccoccia F, Bellelli A (2016) Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: several physiological roles for a potential chemotherapy target. *Mol Biochem Parasitol* 206(1–2):2–12. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.03.005>
- Anschau V, Ferrer-Sueta G, Aleixo-Silva RL, Bannitz-Fernandes R, Tairum CA, Tonoli CCC, Murakami MT, de Oliveira MA, Netto LES (2020) Reduction of sulfenic acids by ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. *Free Radic Biol Med* 156:207–216. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.015>
- Baek WK, Lee HS, Oh MH, Koh MJ, Kim KS, Choi SH (2009) Identification of the *Vibrio vulnificus* ahpCl gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence. *J Microbiol* 47(5): 624–632. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0130-x>

- Baker LM, Poole LB (2003) Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J Biol Chem* 278(11):9203–9211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209888200>
- Baker LM, Raudonikiene A, Hoffman PS, Poole LB (2001) Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. *J Bacteriol* 183(6):1961–1973. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1961-1973.2001>
- Bannitz-Fernandes R, Aleixo-Silva R, Silva JP, Dodia C, Vazquez-Medina JP, Tao JQ, Fisher A, Netto L (2019) Non-mammalian Prdx6 enzymes (proteins with 1-Cys Prdx mechanism) display PLA(2) activity similar to the human orthologue. *Antioxidants* (Basel) 8(3). <https://doi.org/10.3390/antiox8030052>
- Bottcher T, Sieber SA (2010) Showdomycin as a versatile chemical tool for the detection of pathogenesis-associated enzymes in bacteria. *J Am Chem Soc* 132(20):6964–6972. <https://doi.org/10.1021/ja909150y>
- Brenot A, King KY, Caparon MG (2005) The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 55(1):221–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04370.x>
- Bryk R, Griffin P, Nathan C (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407(6801):211–215
- Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295(5557):1073–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1067798>
- Budde H, Flohe L (2003) Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in pathogens as potential drug targets. *Biofactors* 17(1–4):83–92. <https://doi.org/10.1002/biof.5520170109>
- Buranajitpakorn S, Piwkan A, Charoenlap N, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S (2011) Genes for hydrogen peroxide detoxification and adaptation contribute to protection against heat shock in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *FEMS Microbiol Lett* 317(1):60–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02211.x>
- Castro H, Teixeira F, Romao S, Santos M, Cruz T, Florido M, Appelberg R, Oliveira P, Ferreira-da-Silva F, Tomas AM (2011) Leishmania mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity. *PLoS Pathog* 7(10):e1002325. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002325>
- Castro H, Rocha MI, Silva R, Oliveira F, Gomes-Alves AG, Cruz T, Duarte M, Tomas AM (2020) Functional insight into the glycosomal peroxiredoxin of Leishmania. *Acta Trop* 201:105217. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105217>
- Cha MK, Kim HK, Kim IH (1995) Thioredoxin-linked “thiol peroxidase” from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270(48):28635–28641. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28635>
- Charoenlap N, Shen Z, McBee ME, Muthupalani S, Wogan GN, Fox JG, Schauer DB (2012) Alkyl hydroperoxide reductase is required for *Helicobacter cinaedi* intestinal colonization and survival under oxidative stress in BALB/c and BALB/c interleukin-10^{-/-} mice. *Infect Immun* 80(3):921–928. <https://doi.org/10.1128/IAI.05477-11>
- Chen H, Liu Y, Zhao C, Xiao D, Zhang J, Zhang F, Chen M, Wang H (2013) Comparative proteomics-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in clinically derived heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *PLoS One* 8(6):e66880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066880>
- Cho C, Lee GW, Hong SH, Kaur S, Jung KW, Jung JH, Lim S, Chung BY, Lee SS (2019) Novel functions of peroxiredoxin Q from *Deinococcus radiodurans* R1 as a peroxidase and a molecular chaperone. *FEBS Lett* 593(2):219–229. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13302>
- Choi W, Yoo YJ, Kim M, Shin D, Jeon HB, Choi W (2003) Identification of proteins highly expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis. *Yeast* 20(12):1053–1060. <https://doi.org/10.1002/yea.1022>
- Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ (2003) Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* (Reading) 149(Pt 1):121–129. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25896-0>
- Condeles AL, Gomes F, de Oliveira MA, Soares Netto LE, Toledo Junior JC (2020) Thiol peroxidases as major regulators of intracellular levels of peroxynitrite in live *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Antioxidants* (Basel) 9(5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050434>
- Copley SD, Novak WR, Babbitt PC (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* 43(44):13981–13995. <https://doi.org/10.1021/bi048947r>
- Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Foster SJ (2007) Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189(3):1025–1035. <https://doi.org/10.1128/JB.01524-06>
- Das UN (2018) Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: a review. *J Adv Res* 11:57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.001>
- Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL Jr (2006) Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol* 61(6):1523–1532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05344.x>
- de Godoy LM, Marchini FK, Pavoni DP, Rampazzo Rde C, Probst CM, Goldenberg S, Krieger MA (2012) Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics* 12(17):2694–2703. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200078>
- Dons LE, Mosa A, Rottenberg ME, Rosenkrantz JT, Kristensson K, Olsen JE (2014) Role of the *Listeria monocytogenes* 2-Cys peroxiredoxin homologue in protection against oxidative and nitrosative stress and in virulence. *Pathog Dis* 70(1):70–74. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12081>
- Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, Chan CT, Lobritz MA, Braff D, Schwarz EG, Ye JD, Pati M, Vercruysse M, Ralifo PS, Allison KR, Khalil AS, Ting AY, Walker GC, Collins JJ (2014) Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(20):E2100–E2109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111>
- Enany S, Yoshida Y, Yamamoto T (2014) Exploring extra-cellular proteins in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World J Microbiol Biotechnol* 30(4):1269–1283. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1550-7>
- Estelle D, Laurence L, Marc O, Caroline C, Magali D, Marie-Laure F (2020) Linolenic fatty acid hydroperoxide acts as biocide on plant pathogenic bacteria: biophysical investigation of the mode of action. *Bioorg Chem* 100:103877. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103877>
- Fereig RM, Kuroda Y, Terkawi MA, Mahmoud ME, Nishikawa Y (2017) Immunization with *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin 1 induces protective immunity against toxoplasmosis in mice. *PLoS One* 12(4):e0176324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176324>
- Fisher RA, Gollan B, Helaine S (2017) Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 15(8):453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Flohé L, Budde H, Bruns K, Castro H, Clos J, Hofmann B, Kansal-Kalavar S, Krumme D, Menge U, Plank-Schumacher K, Sztajer H, Wissing J, Wylegalla C, Hecht H-J (2002) Tryparedoxin

- peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys* 397(2):324–335
- Francis KP, Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP (1997) Identification of the *ahp* operon of *Salmonella typhimurium* as a macrophage-induced locus. *J Bacteriol* 179(12):4046–4048. <https://doi.org/10.1128/jb.179.12.4046-4048.1997>
- Gautam P, Shankar J, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, Gade WN, Basir SF, Sarma PU (2008) Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 52(12):4220–4227. <https://doi.org/10.1128/AAC.01431-07>
- Gautam P, Mushahary D, Hassan W, Upadhyay SK, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, Sarma PU (2016) In-depth 2-DE reference map of *Aspergillus fumigatus* and its proteomic profiling on exposure to itraconazole. *Med Mycol* 54(5):524–536. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv122>
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425(6959):737–741. <https://doi.org/10.1038/nature02046>
- Gu S, Chen J, Dobos KM, Bradbury EM, Belisle JT, Chen X (2003) Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol Cell Proteomics* 2(12):1284–1296. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300060-MCP200>
- Gutierrez-Escobedo G, Hernandez-Carreón O, Morales-Rojano B, Revuelta-Rodríguez B, Vázquez-Franco N, Castano I, De Las PA (2020) *Candida glabrata* peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, and sulfiredoxin, Srx1, protect against oxidative damage and are necessary for virulence. *Fungal Genet Biol* 135:103287. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103287>
- Hajaj B, Yesilkaya H, Benisty R, David M, Andrew PW, Porat N (2012) Thiol peroxidase is an important component of *Streptococcus pneumoniae* in oxygenated environments. *Infect Immun* 80(12):4333–4343. <https://doi.org/10.1128/IAI.00126-12>
- Hall A, Karplus PA, Poole LB (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins—structures, mechanisms and functions. *FEBS J* 276(9):2469–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
- Hall A, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J Mol Biol* 402(1):194–209. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.022>
- Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 15(3):795–815. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3624>
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) Free radicals in biology and medicine, 5th edn. Oxford University Press, Oxford
- Haraldsen JD, Liu G, Botting CH, Walton JG, Storm J, Phalen TJ, Kwok LY, Soldati-Favre D, Heintz NH, Muller S, Westwood NJ, Ward GE (2009) Identification of conoidin A as a covalent inhibitor of peroxiredoxin II. *Org Biomol Chem* 7:3040–3048. <https://doi.org/10.1039/B901735F>
- Heym B, Stavropoulos E, Honoré N, Domenech P, Saint-Joanis B, Wilson TM, Collins DM, Colston MJ, Cole ST (1997) Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 65(4):1395–1401
- Hicks LD, Raghavan R, Battisti JM, Minnick MF (2010) A DNA-binding peroxiredoxin of *Coxiella burnetii* is involved in countering oxidative stress during exponential-phase growth. *J Bacteriol* 192(8):2077–2084. <https://doi.org/10.1128/JB.01324-09>
- Hillas PJ, del Alba FS, Oyarzabal J, Wilks A, Ortiz de Montellano PR (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 275(25):18801–18809
- Hillmann F, Bagramyan K, Strassburger M, Heinekamp T, Hong TB, Bzymek KP, Williams JC, Brakhage AA, Kalkum M (2016) The crystal structure of peroxiredoxin Asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep* 6:33396. <https://doi.org/10.1038/srep33396>
- Horst SA, Jaeger T, Denkel LA, Rouf SF, Rhen M, Bange FC (2010) Thiol peroxidase protects *Salmonella enterica* from hydrogen peroxide stress *in vitro* and facilitates intracellular growth. *J Bacteriol* 192(11):2929–2932. <https://doi.org/10.1128/JB.01652-09>
- Horta BB, de Oliveira MA, Discola KF, Cussiol JRR, Netto LES (2010) Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Q β from *Xylella fastidiosa*. *J Biol Chem* 285(21):16051–16065
- Hu Y, Coates AR (2009) Acute and persistent *Mycobacterium tuberculosis* infections depend on the thiol peroxidase Tpx. *PLoS One* 4(4):e5150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005150>
- Hu H, Tian M, Li P, Bao Y, Guan X, Lian Z, Yin Y, Ding C, Yu S (2019) Brucella infection regulates peroxiredoxin-5 protein expression to facilitate intracellular survival by reducing the production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 516(1):82–88
- Hugo M, Turell L, Manta B, Botti H, Monteiro G, Netto LES, Alvarez B, Radi R, Trujillo M (2009) Thiol and Sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine Peroxiredoxin from : kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* 48(40):9416–9426
- Hugo M, Van Laer K, Reyes AM, Vertommen D, Messens J, Radi R, Trujillo M (2014) Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 289(8):5228–5239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510248>
- Jacobson FS, Morgan RW, Christman MF, Ames BN (1989) An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *J Biol Chem* 264(3):1488–1496
- Jaeger T, Flohe L (2006) The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors* 27(1–4):109–120. <https://doi.org/10.1002/biof.5520270110>
- Jaeger T, Budde H, Flohé L, Menge U, Singh M, Trujillo M, Radi R (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 423(1):182–191
- Jain M, Munoz-Bodnar A, Zhang S, Gabriel DW (2018) A secreted ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ peroxiredoxin simultaneously suppresses both localized and systemic innate immune responses in planta. *Mol Plant-Microbe Interact* 31(12):1312–1322. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0068-R>
- Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY (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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
- Jeong W, Cha M-K, Kim I-H (2000) Thioredoxin-dependent Hydroperoxide peroxidase activity of Bacterioferritin Comigratory protein (BCP) as a new member of the Thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl Hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J Biol Chem* 275(4):2924–2930
- Johnson NA, Liu Y, Fletcher HM (2004) Alkyl hydroperoxide peroxidase subunit C (ahpC) protects against organic peroxides but does not affect the virulence of *Porphyromonas gingivalis* W83. *Oral Microbiol Immunol* 19(4):233–239. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00145.x>
- Kaihami GH, Almeida JR, Santos SS, Netto LE, Almeida SR, Baldini RL (2014) Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS Pathog* 10(10):e1004442. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004442>

- Kamariah N, Eisenhaber B, Eisenhaber F, Gruber G (2018) Molecular mechanism of the *Escherichia coli* AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions. *Sci Rep* 8(1):14151. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32527-7>
- Kaufmann SHE, Springer B, Master S, Sander P, Zahrt T, McFalone M, Song J, Papavinasundaram KG, Colston MJ, Boettger E, Deretic V (2001) Silencing of oxidative stress response in : expression patterns of in virulent and avirulent strains and effect of inactivation. *Infect Immun* 69(10):5967–5973
- Kaneva IN, Longworth J, Sudbery PE, Dickman MJ (2018) Quantitative proteomic analysis in *Candida albicans* using SILAC-based mass spectrometry. *Proteomics* 18(5-6):e1700278. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700278>
- Kim SJ, Woo JR, Hwang YS, Jeong DG, Shin DH, Kim K, Ryu SE (2003) The tetrameric structure of *Haemophilus influenza* hybrid Prx5 reveals interactions between electron donor and acceptor proteins. *J Biol Chem* 278(12):10790–10798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209553200>
- Koch O, Jäger T, Heller K, Khandavalli PC, Pretzel J, Becker K, Flohé L, Selzer PM (2013) Identification of *M. tuberculosis* thioredoxin reductase inhibitors based on high-throughput docking using constraints. *J Med Chem* 56(12):4849–4859. <https://doi.org/10.1021/jm3015734>
- König J, Fairlamb AH (2007) A comparative study of type I and type II trypanothione peroxidases in. *FEBS J* 274(21):5643–5658
- Koshkin A, Zhou XT, Kraus CN, Brenner JM, Bandyopadhyay P, Kuntz ID, Barry CE 3rd, Ortiz de Montellano PR (2004) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* AhpD, an element of the peroxiredoxin defense against oxidative stress. *Antimicrob Agents Chemother* 48(7):2424–2430. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2424-2430.2004>
- Kumar B, Sharma D, Sharma P, Katoch VM, Venkatesan K, Bisht D (2013) Proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin and amikacin. *J Proteome* 94:68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.025>
- La Carbona S, Sauvageot N, Giard JC, Benachour A, Posteraro B, Auffray Y, Sanguinetti M, Hartke A (2007) Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 66(5):1148–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05987.x>
- Lam PL, Wong RS, Lam KH, Hung LK, Wong MM, Yung LH, Ho YW, Wong WY, Hau DK, Gambari R, Chui CH (2020) The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: an updated mini review. *Chem Biol Interact* 320:109023. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109023>
- Leitsch D, Williams CF, Hrdy I (2018) Redox pathways as drug targets in microaerophilic parasites. *Trends Parasitol* 34(7):576–589. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.007>
- Li W, Zhang S, Wang X, Yu J, Li Z, Lin W, Lin X (2018) Systematically integrated metabonomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress. *J Proteome* 179:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.002>
- Lim JG, Bang YJ, Choi SH (2014) Characterization of the *Vibrio vulnificus* 1-Cys peroxiredoxin Prx3 and regulation of its expression by the Fe-S cluster regulator IscR in response to oxidative stress and iron starvation. *J Biol Chem* 289(52):36263–36274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.611020>
- Longo LVG, Breyer CA, Novaes GM, Gegembauer G, Leitao NP Jr, Octaviano CE, Toyama MH, de Oliveira MA, Puccia R (2020) The human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* has a unique 1-Cys peroxiredoxin that localizes both intracellularly and at the cell surface. *Front Cell Infect Microbiol* 10:394. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00394>
- Lynch AS, Robertson GT (2008) Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med* 59:415–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>
- Marshall AC, Kidd SE, Lamont-Friedrich SJ, Arentz G, Hoffmann P, Coad BR, Bruning JB (2019) Structure, mechanism, and inhibition of Thioredoxin Reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 63(3)
- Mastronicola D, Falabella M, Testa F, Pucillo LP, Teixeira M, Sarti P, Saraiva LM, Giuffrè A (2014) Functional characterization of peroxiredoxins from the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1):e2631. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002631>
- Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164):819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Mir AA, Park SY, Abu Sadat M, Kim S, Choi J, Jeon J, Lee YH (2015) Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Sci Rep* 5:11831. <https://doi.org/10.1038/srep11831>
- Mishra Y, Hall M, Locmelis R, Nam K, Soderberg CAG, Storm P, Chaurasia N, Rai LC, Jansson S, Schroder WP, Sauer UH (2017) Active-site plasticity revealed in the asymmetric dimer of AnPrx6 the 1-Cys peroxiredoxin and molecular chaperone from *Anabaena* sp. PCC 7210. *Sci Rep* 7(1):17151. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17044-3>
- Missall TA, Pusateri ME, Lodge JK (2004) Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 51(5):1447–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x>
- Monteiro G, Horta BB, Pimenta DC, Augusto O, Netto LE (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12):4886–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700481104>
- Morais MAB, Giuseppe PO, Souza T, Castro H, Honorato RV, Oliveira PSL, Netto LES, Tomas AM, Murakami MT (2017) Calcium and magnesium ions modulate the oligomeric state and function of mitochondrial 2-Cys peroxiredoxins in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* 292(17):7023–7039. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762039>
- Munhoz DC, Netto LES (2004) Cytosolic Thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic Hydroperoxide insult. *J Biol Chem* 279(34):35219–35227
- Murphy TF, Kirkham C, Sethi S, Lesse AJ (2005) Expression of a peroxiredoxin-glutaredoxin by *Haemophilus influenzae* in biofilms and during human respiratory tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44(1):81–89. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.12.008>
- Nelson KJ, Knutson ST, Soito L, Klomsiri C, Poole LB, Fetrow JS (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* 79(3):947–964. <https://doi.org/10.1002/prot.22936>
- Netto LE, de Oliveira MA, Tairum CA, da Silva Neto JF (2016) Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. *Free Radic Res* 50(2):206–245. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1120864>
- Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohe L (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem* 378(8):827–836. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.8.827>
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198:249–266. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x>
- Oguscu R, Rettori D, Munhoz DC, Netto LES, Augusto O (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen

- peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic Biol Med* 42(3):326–334
- Ogusucu R, Rettori D, Netto LE, Augusto O (2009) Superoxide dismutase 1-mediated production of ethanol- and DNA-derived radicals in yeasts challenged with hydrogen peroxide: molecular insights into the genome instability of peroxiredoxin-null strains. *J Biol Chem* 284(9):5546–5556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805526200>
- Olczak AA, Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ (2003) Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun* 71(1):580–583. <https://doi.org/10.1128/iai.71.1.580-583.2003>
- Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimaraes BG, Netto LE (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 49(15):3317–3326. <https://doi.org/10.1021/bi901962p>
- O'Riordan AA, Morales VA, Mulligan L, Faheem N, Windle HJ, Kelleher DP (2012) Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine* 30(26):3876–3884. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.002>
- Parente MR, Forte E, Falabella M, Boneca IG, Teixeira M, Giuffrè A, Saraiva LM (2017) Nitrosative stress defences of the enterohepatic pathogenic bacterium *Helicobacter pullorum*. *Sci Rep* 7(1):9909. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10375-1>
- Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(8):5723–5732. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5723>
- Parsonage D, Youngblood DS, Sarma GN, Wood ZA, Andrew Karplus P, Poole LB (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial Peroxiredoxin. *Biochemistry* 44(31):10583–10592
- Parsonage D, Karplus PA, Poole LB (2008) Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(24):8209–8214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708308105>
- Pedrajas JR, Miranda-Vizuete A, Javanmardy N, Gustafsson JA, Spyrou G (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* 275(21):16296–16301. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16296>
- Pedrajas JR, McDonagh B, Hernandez-Torres F, Miranda-Vizuete A, Gonzalez-Ojeda R, Martinez-Galisteo E, Padilla CA, Barcena JA (2016) Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. *Antioxid Redox Signal* 24(3):115–128. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6366>
- Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA (2015) Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci* 40(8):435–445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001>
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R (2008) Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J* 410(2):359–368. <https://doi.org/10.1042/BJ20071138>
- Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C (2008) Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408(1–2):45–50
- Pineyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M (2011) Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 507(2):287–295. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.014>
- Poole LB, Ellis HR (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* 35(1):56–64. <https://doi.org/10.1021/bi951887s>
- Poole LB, Nelson KJ (2016) Distribution and features of the six classes of peroxiredoxins. *Mol Cell* 39(1):53–59. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2330>
- Poole LB, Hall A, Nelson KJ (2011) Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr Protoc Toxicol* Chapter 7:Unit7 9. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0709s49>
- Prolo C, Alvarez MN, Radi R (2014) Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors* 40(2):215–225. <https://doi.org/10.1002/biof.1150>
- Radi R (2018) Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(23):5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>
- Repolès BM, Machado CR, Florentino PT (2020) DNA lesions and repair in trypanosomatids infection. *Genet Mol Biol* 43(1):e20190163
- Reyes AM, 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 Radic Biol Med* 51(2):464–473. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.023>
- Reyes AM, Vazquez DS, Zeida A, Hugo M, Pineyro MD, De Armas MI, Estrin D, Radi R, Santos J, Trujillo M (2016) PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free Radic Biol Med* 101:249–260. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.005>
- Rhee SG, Kil IS (2017) Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. *Annu Rev Biochem* 86:749–775. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014431>
- Richard D, Bartfai R, Volz J, Ralph SA, Muller S, Stunnenberg HG, Cowman AF (2011) A genome-wide chromatin-associated nuclear peroxiredoxin from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 286(13):11746–11755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.198499>
- Rintiswati N, Wibawa T, Asmara W, Soebono H (2011) Effect of oxidative stress on AhpC activity and virulence in katG Ser315 Thr *Mycobacterium tuberculosis* mutant. *Indonesian J Biotechnol* 16(2):100–110
- Rocha ER, Smith CJ (1999) Role of the alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) gene in oxidative stress defense of the obligate Anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 181(18):5701–5710. <https://doi.org/10.1128/JB.181.18.5701-5710.1999>
- Rocha MC, de Godoy KF, Bannitz-Fernandes R, Fabri J, Barbosa MMF, de Castro PA, Almeida F, Goldman GH, da Cunha AF, Netto LES, de Oliveira MA, Malavazi I (2018) Analyses of the three 1-Cys peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. *Sci Rep* 8(1):12314. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30108-2>
- Rodrigues AM, Kubitschek-Barreira PH, Pinheiro BG, Teixeira-Ferreira A, Hahn RC, de Camargo ZP (2020) Immunoproteomic analysis reveals novel candidate antigens for the diagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *J Fungi (Basel)* 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040357>
- Saccoccia F, Di Micco P, Boumis G, Brunori M, Koutris I, Miele AE, Morea V, Sriratanana P, Williams DL, Bellelli A, Angelucci F (2012) Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Structure* 20(3):429–439. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.004>
- Seaver LC, Inlay JA (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183(24):7173–7181. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001>
- Sherman DR, Mdululi K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, Stover CK (1996) Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*

- 272(5268):1641–1643. <https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1641>
- Shishodia SK, Tiwari S, Shankar J (2019) Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. *Mycology* 10(3):151–165. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1574927>
- Silva KSE, Neto BRS, Zambuzzi-Carvalho PF, de Oliveira CM, Pires LB, Kato L, Bailao AM, Parente-Rocha JA, Hernandez O, Ochoa JG, Soares MC, Pereira M (2018) Response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal camphene thiosemicarbazide determined by proteomic analysis. *Future Microbiol* 13:1473–1496. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0176>
- Skrzypek MS, Binkley J, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G (2017) The Candida Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 45(D1):D592–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw924>
- Souza Goebel C, de Mattos Oliveira F, Severo LC (2013) *Saccharomyces cerevisiae* infections. *Rev Iberoam Micol* 30(3):205–208. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.03.001>
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog* 110:56–65. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015>
- Staudacher V, Djuika CF, Koduka J, Schlossarek S, Kopp J, Büchler M, Lanzer M, Deponte M (2015) *Plasmodium falciparum* antioxidant protein reveals a novel mechanism for balancing turnover and inactivation of peroxiredoxins. *Free Radic Biol Med* 85:228–236
- Storz G, Christman MF, Sies H, Ames BN (1987) Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):8917–8921. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8917>
- Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, de Oliveira ALP, Cabrera VIM, Toledo-Silva G, Mori GM, Toyama MH, Netto LES, de Oliveira MA (2021) Effects of Serine or Threonine in the active site of typical 2-Cys Prx on hyperoxidation susceptibility and on chaperone activity. *Antioxidants (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/antiox10071032>
- Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, Geyer RR, Nieves CJ, Portillo-Ledesma S, Ferrer-Sueta G, Toledo JC Jr, Toyama MH, Augusto O, Netto LE, de Oliveira MA (2016) Catalytic Thr or Ser residue modulates structural switches in 2-Cys peroxiredoxin by distinct mechanisms. *Sci Rep* 6:33133. <https://doi.org/10.1038/srep33133>
- Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP (1998) The *Salmonella typhimurium* AhpC polypeptide is not essential for virulence in BALB/c mice but is recognized as an antigen during infection. *Infect Immun* 66(7):3208–3217. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.7.3208-3217.1998>
- Teixeira F, Castro H, Cruz T, Tse E, Koldewey P, Southworth DR, Tomas AM, Jakob U (2015) Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(7):E616–E624. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419682112>
- Trujillo M, Budde H, Piñeyro MD, Stehr M, Robello C, Flohé L, Radi R (2004) *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* Tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify Peroxynitrite via oxidation of fast reacting Thiols. *J Biol Chem* 279(33):34175–34182
- Tunes LG, Morato RE, Garcia A, Schmitz V, Steindel M, Corrêa-Junior JD, Dos Santos HF, Frézard F, de Almeida MV, Silva H, Moretti NS, de Barros ALB, do Monte-Neto RL (2020) Preclinical gold complexes as oral drug candidates to treat leishmaniasis are potent trypanothione reductase inhibitors. *ACS Infect Dis* 6(5):1121–1139. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.9b00505>
- Urban C, Xiong X, Sohn K, Schroppel K, Brunner H, Rupp S (2005) The moonlighting protein Tsalp is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 57(5):1318–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04771.x>
- Usui M, Masuda-Suganuma H, Fukumoto S, Angeles JM, Hakimi H, Inoue N, Kawazu S (2015) Effect of thioredoxin peroxidase-1 gene disruption on the liver stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Parasitol Int* 64(3):290–294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.09.013>
- Vallejo MC, Nakayasu ES, Matsuo AL, Sobreira TJ, Longo LV, Ganiko L, Almeida IC, Puccia R (2012) Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res* 11(3):1676–1685. <https://doi.org/10.1021/pr200872s>
- Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C (2010) Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother* 54(5):2096–2111. <https://doi.org/10.1128/AAC.01638-09>
- Vranakis I, De Bock PJ, Papadioti A, Tselentis Y, Gevaert K, Tsiotis G, Psaroulaki A (2012) Quantitative proteome profiling of *C. burnetii* under tetracycline stress conditions. *PLoS One* 7(3):e33599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033599>
- Wang G, Olczak AA, Walton JP, Maier RJ (2005) Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun* 73(1):378–384. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.378-384.2005>
- Wilson T, de Lisle GW, Marcinkeviciene JA, Blanchardand JS, Collins DM (1998) Antisense RNA to ahpC, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that AhpC of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology* 144(10):2687–2695
- Winterbourn CC, Hampton MB (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 45(5):549–561. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>
- Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB (2016) Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem* 85:765–792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300(5619):650–653. <https://doi.org/10.1126/science.1080405>
- Yague-Capilla M, Garcia-Caballero D, Aguilar-Pereyra F, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Perez LM, Vidal AE, Gonzalez-Pacanowska D (2019) Base excision repair plays an important role in the protection against nitric oxide- and in vivo-induced DNA damage in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* 131:59–71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.025>
- Yu S, Giroto S, Lee C, Magliozzo RS (2003) Reduced affinity for isoniazid in the S315T mutant of *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a key factor in antibiotic resistance. *J Biol Chem* 278(17):14769–14775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300326200>
- Zhu X, Tu ZJ, Coussens PM, Kapur V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S (2008) Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes Infect* 10(12-13):1274–1282. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.025>
- Zygmunt MS, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH (2006) Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect* 8(14-15):2849–2854. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.09.002>

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE E SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

O abaixo assinado, compromete-se a manter sigilo em relação às informações consideradas confidenciais a que poderá ter acesso na qualidade de avaliador (receptor da informação) na Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Busca de inibidores do sistema peroxirredoxina 2-Cys típicas de eucariotos: avaliação funcional e estrutural" desenvolvida pela acadêmica **ANA LAURA PIRES DE OLIVEIRA**, do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista, da UNESP.

Por este termo, compromete-se a:

- Não utilizar as informações confidenciais a que tiver acesso, para gera benefício próprio exclusivo e/ou unilateral, presente ou futuro, ou para uso de terceiros e a não repassar o conhecimento das Informações confidenciais, responsabilizando-se por todas as pessoas que vierem a ter acesso às informações, por seu intermédio;
- Não efetuar nenhuma gravação ou cópia da documentação confidencial a que tiver acesso relacionado à tecnologia apresentada na defesa acima mencionada;
- Não apropriar-se para si ou para outrem de material confidencial ou sigiloso que venha a ser disponibilizado através da defesa acima mencionada;
- Não repassar o conhecimento das informações, por seu intermédio.

A obrigação de sigilo ora assumida não prevalece sobre informações que estejam sob domínio público antes da data de assinatura deste termo ou que se tornar pública pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI ou por instituto competente em âmbito internacional.

O presente compromisso será válido até que os direitos dos envolvidos tenham sido devidamente protegidos sob as cautelas legais exigíveis, ou tornado público pelo inventor ou pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.

Caso o receptor da informação descumpra quaisquer obrigações previstas no presente documento estará sujeito as implicações e sanções de cunho civil e criminal cabíveis.

E PARA TODOS OS EFEITOS, firma o presente termo.

São Vicente, 20 de Agosto de 2021.



RECEPTOR DA INFORMAÇÃO

NOME: Marcos Antonio de Oliveira
CPF: 119.178.798-22