



UNIVERSIDADE CEUMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS DA TIOREDOXINA
DERIVADA DE *Escherichia coli* NA SEPSE

SAULO JOSÉ FIGUEIREDO MENDES

São Luís- MA

Setembro/2018

SAULO JOSÉ FIGUEIREDO MENDES

**ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS DA TIOREDOXINA
DERIVADA DE *Escherichia coli* NA SEPSE**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE pela Universidade Ceuma, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a). Elizabeth Soares Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

São Luís - MA

Setembro/2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Figueiredo Mendes, Saulo José.

ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS DA
TIOREDOXINA DERIVADA DE *Escherichia coli* NA SEPSE / Saulo
José Figueiredo Mendes. - 2018.

86 f.

Coorientador(a): Luís Cláudio Nascimento da Silva.

Orientador(a): Elizabeth Soares Fernandes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
2018.

1. LPS. 2. Resposta imune. 3. SIRS. 4. Tioredoxina
bacteriana. 5. TRPC5. I. Nascimento da Silva, Luís
Cláudio. II. Soares Fernandes, Elizabeth. III. Título.

SAULO JOSÉ FIGUEIREDO MENDES

**ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS DA TIOREDOXINA
DERIVADA DE *Escherichia coli* NA SEPSE**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Ceuma, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a). Elizabeth Soares Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). Elizabeth Soares Fernandes (Orientadora)

Examinador 2 – interno

Examinador 3 – interno

Examinador 4 – interno

Examinador 5 – externo

São Luís-Ma
Setembro/2018

Dedico este trabalho a minha mãe, pelo amor pleno, por todo impulso e destemor para que os meus sonhos se realizassem.

À minha esposa, Andressa Fernanda Silva Berredo Mendes, pelo apoio e incentivo nessa jornada.

A meu filho, Miguel Berredo Figueiredo Mendes, hoje, minha força motriz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, seu fôlego de vida foi meu sustento, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele, convém que ele cresça e que eu diminua.

À minha família, pelo apoio durante toda essa jornada, vocês representam o meu maior tesouro, meu amparo e meu apoio incondicional.

À minha mãe, mulher de oração, obrigado por me ensinar os caminhos de Jesus, Obrigado por todos os momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pelo afeto, pela amizade. Saiba que nunca deixarei de amar você.

À minha esposa, Andressa Berredo, grande mulher que com sabedoria se aloja no meu coração, obrigado por tanto amor, pela boa convivência e por me fazer completo! Você merece nada menos que todo o meu amor, hoje e sempre!

Meu filho, Miguel Berredo Mendes, minha maior riqueza, através de você entendi, finalmente, o que é o amor incondicional. Meu filho, você é o meu maior presente, você é a minha vida! Com você tenho me redescoberto, tenho reaprendido a viver.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elizabeth Soares Fernandes, por me inspirar diariamente, por ser um exemplo de profissionalismo, pela confiança, conselhos, exortações e pela dedicação na orientação deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luis Cláudio Nascimento da Silva, pela atenção, ensinamentos, amizade e por ter me possibilitado crescer na pesquisa.

À todos os amigos do Laboratório, Domingos Magno, João Francisco, Cristiane Figueiredo, Bruna Rosa, Mizael Calácio, Nágila Fialho, Isabella Figueiredo, Jaqueline Pontes, Thiago Ferro e Ione Cristina, que colaboraram incansavelmente para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério: Edson e Socorro, pelo suporte na criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

A FAPEMA, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho.

A Universidade Ceuma, por toda a oportunidade, disponibilidade, estrutura e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a você caro leitor, que se interessou em ler esta tese!

“Mas Deus escolheu as coisas loucas do mundo para envergonhar os sábios, e escolheu as coisas fracas do mundo para envergonhar as fortes. Ele escolheu as coisas insignificantes do mundo, as desprezadas e as que nada são, para reduzir a nada as que são, para que ninguém se vanglorie diante dele” (1 Coríntios 1:27-29)

MENDES, Saulo José Figueiredo. **Estudo dos mecanismos associados aos efeitos da tioredoxina derivada de *Escherichia coli* na sepse**. 2018. 76f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Ceuma, UniCEUMA, Maranhão, 2018.

RESUMO

A tioredoxina (Trx) é uma proteína redox produzida por todas as espécies, desde bactérias a humanos. Seu papel como anti-oxidante é bem conhecido, embora suas ações reguladoras no hospedeiro não estejam bem elucidadas. Em sua forma reduzida, a Trx humana ativa o receptor de potencial transitório canônico 5 (TRPC5) durante a inflamação, mas até o momento, não existem relatos se este receptor pode mediar os efeitos da Trx bacteriana no hospedeiro. Ressalta-se que este receptor pode formar complexos com outros receptores da mesma família, como o TRPC4. Assim, este trabalho avaliou os efeitos da Trx bacteriana na sepse induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em animais com (TRPC5KO) ou sem (WT) deleção gênica para o TRPC5 e tratados com ML204. A Trx derivada de *E. coli* induziu mortalidade em camundongos tratados com lipopolissacarídeo (LPS), acompanhada de redução do acúmulo de leucócitos, regulação da liberação de citocinas no peritônio e comprometimento da fagocitose mediada por macrófagos peritoneais. O bloqueio de TRPC4/TRPC5 pelo antagonista ML204 aumentou a mortalidade e a hipotermia em camundongos injetados com LPS e Trx, mas preservou a capacidade fagocítica dos macrófagos. A deleção do TRPC5 não alterou a temperatura corporal, mas promoveu acúmulo adicional de leucócitos peritoneais e liberação de mediadores inflamatórios em camundongos tratados com LPS e com Trx. Estes resultados sugerem que os efeitos bacterianos da Trx são mediados por TRPC4 e TRPC5, ajuda a esclarecer os mecanismos adicionais de virulência bacteriana e nos papéis fisiopatológicos desses receptores.

Palavras-chave: Tioredoxina bacteriana, SIRS, LPS, resposta imune, TRPC5.

MENDES, Saulo José Figueiredo. **Study of the mechanisms associated with the effects of Escherichia coli-derived thioredoxin in sepsis.** 2018. 76f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Ceuma University, UniCEUMA, Maranhão, 2018.

ABSTRACT

Thioredoxin (Trx) is a redox protein produced by all species, from bacteria to humans. Its role as an antioxidant molecule is well known; however, its regulatory actions in the host are less understood. Evidences suggest this protein may be part of the bacteria anti-virulence strategy to evade the host immune system. Reduced human Trx activates transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) in inflammation, but there is no evidence of whether these receptors mediate bacterial Trx effects in the host. Importantly, TRPC5 can form functional complexes with other subunits such as TRPC4. Herein, *E. coli*-derived Trx induced mortality in lipopolysaccharide (LPS)-injected mice, accompanied by reduction of leukocyte accumulation, regulation of cytokine release into the peritoneum, and impairment of peritoneal macrophage-mediated phagocytosis. Dual TRPC4/TRPC5 blockade by ML204 increased mortality and hypothermia in Trx-treated LPS mice, but preserved macrophage's ability to phagocytose. TRPC5 deletion did not alter body temperature, but promoted additional accumulation of peritoneal leukocytes and inflammatory mediator release in Trx-administered LPS mice. Trx diminished macrophage-mediated phagocytosis in wild type but not TRPC5 knockout animals. TRPC5 ablation did not affect LPS-induced responses. However, ML204 caused mortality associated with exacerbated hypothermia and decreased peritoneal leukocyte numbers and cytokines in LPS-injected mice. These results suggest that bacterial Trx effects under LPS stimuli are mediated by TRPC4 and TRPC5, shedding light on the additional mechanisms of bacterial virulence and on the pathophysiological roles of these receptors.

Key words: Bacterial thioredoxin, SIRS, LPS immune response, TRPC5.

LISTA DE ABREVIÇÕES

BASES	- Estudo epidemiológico da sepse brasileira
CagA	- Citotoxina-associada ao gene A
CLP	- Perfuração e Ligadura do Ceco
CGRP	- Gene relacionado ao peptídeo da Calcitonina
EROS	- Espécie reativas de oxigênio
ESICM	- Sociedade Europeia de medicina intensiva
H ₂ O ₂	- Peróxido de Hidrogênio
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
LPS	- Lipopolissacarídeo
NO	- Óxido Nítrico
RNS	- Espécies reativas de Nitrogênio
SCCM	- Sociedade de medicina intensiva
SOFA	- Avaliação sequencial de falhas em órgãos
SRIS	- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TNF α	- Fator de Necrose tumoral alfa
TLR	- Receptor do tipo Toll-like
TRP	- Receptor de Potencial Transitório
TRPA1	- Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRPC5	- Receptor de Potencial Transitório Canônico 5
TRPC4	- Receptor de Potencial Transitório Canônico 4
TRPV1	- Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1
Trx	- Tioredoxina
UTIs	- Unidades de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Sepsis: Definição e Epidemiologia	4
2.2 Virulência bacteriana	5
2.2.1 Importância da tioredoxina bacteriana na infecção	6
2.3 A complexidade da resposta do hospedeiro à infecções	7
2.4 O estresse oxidativo como componente da resposta do hospedeiro na sepsis	9
2.5 Receptores de potencial transitório e a sepsis	10
2.6 Relevância do TRPC5 como "sensor" e modulador do estresse oxidativo na sepsis	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
Artigo 1:	26
Tioredoxina e virulência bacteriana: implicações para o desenvolvimento de fármacos. A ser submetido à <i>Critical Reviews in Microbiology</i>	26
Artigo 2:	26
Transient receptor potential canonical channels 4 and 5 mediate <i>Escherichia coli</i> -derived thioredoxin effects in lipopolysaccharide-injected mice. Publicado na <i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i> em 2018	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76

1. INTRODUÇÃO

A sepse, do ponto de vista clínico e da saúde pública, é uma condição extremamente relevante entre as complicações infecciosas vigentes, tanto pelo número de casos, quanto pela gravidade e complexidade (PLEVIN; CALLCUT, 2017). Acredita-se que 18 milhões de casos ocorram anualmente no mundo, sendo que a cada 4 pessoas diagnosticadas com sepse, uma é por ela vitimada (DELLINGER et al., 2013).

A rapidez de diagnóstico e tratamento adequado, e principalmente a resposta imune do paciente, possuem um papel determinante na recuperação e taxa de sobrevivência do paciente (LASSEAUX et al., 2018). A sepse pode ser desencadeada em resposta à infecção por diferentes microrganismos incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos; sendo as infecções bacterianas, causadoras da maior parte dos casos de sepse (BRUNKHORST et al., 2018), e, a alta taxa de mortalidade associada diretamente à resistência bacteriana a antibióticos.

Uma das características da sepse é o desencadeamento da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) à partir de uma infecção local. A SRIS é caracterizada por uma resposta imune e inflamatória sistêmica exacerbada que causa a elevação de mediadores pro-inflamatórios, culminando com a disfunção e falência de múltiplos órgãos; e subsequente morte do hospedeiro (BALK, 2014). Apesar de mais de um século de publicações científicas e de todos os avanços e esforços da indústria farmacêutica, um tratamento específico e totalmente eficiente para a sepse continua sendo alvo desejado e ainda hoje, complexo demais. O tratamento da sepse permanece restrito e dependente da administração de fluidos intravenosos, vasopressores e antibioticoterapia, além de cuidados médicos que envolvem a ventilação mecânica e hidratação (COHEN, 2015).

Na clínica, uma variedade de abordagens terapêuticas, principalmente de natureza anti-inflamatória, falharam na tentativa de curar a sepse humana (por exemplo, bloqueadores das vias ativadas por IL-1 β , TNF α , prostaglandinas, leucotrienos, etc.) (PERL et al., 2007; KIANG et al., 2009; KIANG et al., 2010; RUSSELL, 2016). Devido ao fracasso das estratégias anti-inflamatórias, a comunidade médica e científica tem questionado se as alterações inflamatórias

relacionadas à sepse são fatores determinantes da morte do paciente (PERL et al., 2007; KIANG et al., 2009; KIANG et al., 2010; RUSSELL, 2016).

Neste panorama, novas vias de interação entre patógeno e hospedeiro têm sido exploradas. Entre elas, ressalta-se o estresse oxidativo. Especialmente na sepse, o estresse oxidativo é uma resposta complexa, a qual pode ser gerada tanto pelo hospedeiro, quanto pelo microrganismo causador da infecção. Na tentativa de combate à infecção, o hospedeiro produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS e RNS, respectivamente) com potencial antimicrobiano, principalmente por células imunes (NOUBADE et al., 2014). Com o intuito de perpetuar a colonização e conseqüentemente, a infecção, os microrganismos incluindo bactérias, ativam suas vias antioxidantes, com o intuito de atenuar a resposta oxidante do hospedeiro (MAXIME et al., 2017). Uma destas vias envolve a tioredoxina (Trx), uma proteína altamente conservada em todas as espécies. Além de funcionar como *scavenger* de EROS, outras funções têm sido atribuídas à Trx derivada de bactérias incluindo participação na motilidade bacteriana e supressão da fagocitose por células do hospedeiro (SONG et al., 2016; CHENG et al., 2017) funções estas, que podem atuar em conjunto contribuindo para a virulência bacteriana. A percepção de moléculas derivadas do estresse oxidativo e nitrosativo no hospedeiro, bem como a regulação da produção destes reativos depende de uma fina interação entre diferentes células do organismo, como células imunes, endoteliais e neuronais (BAR-OR et al., 2015). Embora a participação de células imunes e endoteliais nestes processos tenham sido amplamente estudada, informações acerca da contribuição de vias neuronais ainda permanecem por ser melhor elucidadas.

Sabe-se hoje, que existe uma convergência de mediadores e receptores comuns em todas estas células e que estes interagem de forma dinâmica durante um processo inflamatório (SHAJIB; KHAN, 2015). Exemplo de vias recentemente identificadas incluem a superfamília de canais catiônicos conhecidos como receptores de potencial transitório (TRP; do inglês *Transient Receptor Potential*) (ZIELIŃSKA et al., 2014; BILLETTER et al., 2014; VELDHUIS et al., 2015).

Nosso grupo, assim como outros, tem estudado a relevância destes receptores na resposta à infecção, através do uso de agonistas, antagonistas e animais *knockout*. Evidências obtidas nas duas últimas décadas demonstram a

existência de um papel protetor para o TRP Vanilóide 1 (TRPV1), expresso tanto em células neuronais e não-neuronais, na sepse (BRYANT et al., 2003; IIDA et al., 2005; CLARK et al., 2007; WANG et al., 2008; GUPTILL et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; LAWTON et al., 2017). Estes dados obtidos de dois modelos experimentais diferentes de sepse murina (induzida por lipopolissacarídeo - LPS e induzida pela perfuração e ligadura do ceco - CLP) coletivamente indicam que na ausência da ativação do receptor TRPV1, ocorre agravamento da infecção bacteriana. Mais recentemente, demonstramos que o tratamento repetido com o antagonista para o receptor TRP anquirina 1 (TRPA1) protege o fígado e rins de animais com SRIS induzida por LPS, além de aumentar o número de células imunes com perfil anti-inflamatório na cavidade peritoneal destes animais (MENDES et al., 2016). Ainda, evidências indicam que o LPS é capaz de ativar diretamente o TRPA1 (MESEGUER et al., 2014). Tanto o TRPV1 quanto o TRPA1 são atualmente reconhecidos como sensores de compostos oxidantes gerados durante o estresse oxidativo (V ZHOLOS, 2015); além de regularem a produção de espécies reativas no hospedeiro (NAZIROĞLU, 2015; TAKAHASHI et al., 2018).

Mais recentemente, outro canal da mesma família, TRP Canônico 5 (TRPC5), foi sugerido como sensor não somente de compostos oxidantes como o H₂O₂ e NO, mais também de compostos envolvidos em vias antioxidantes, como a Trx. Estudos indicam que o TRPC5 pode ser ativado pela forma reduzida da Trx em mamíferos (NAYLOR et al., 2011) e que o mesmo tem um papel imunossupressor e anti-inflamatório em diferentes estudos (JIANG et al., 2012; BECKMANN et al., 2017). Entretanto, não existem relatos de que o TRPC5 pode mediar as respostas da Trx bacteriana na sepse.

Desta forma, este trabalho visou investigar se o TRPC5 contribui para as respostas desencadeadas pela Trx derivada de *Escherichia coli* em animais com SRIS induzida por LPS, através do uso de antagonista seletivo para o complexo TRPC4/TRPC5 e animais knockout para TRPC5.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sepsis: Definição e Epidemiologia

Recentemente, ocorreu um novo consenso sobre a sepsis, promovido pela *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e a *European Society of Critical Care Medicine* (ESICM) (SINGER et al., 2016). Assim, a sepsis é hoje definida como “disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo à infecção” (VINCENT et al., 2013). O diagnóstico clínico de disfunção orgânica se baseia atualmente na variação de dois ou mais pontos no escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), avaliando diariamente os sistemas: cardiovascular, respiratório, hepático, hematológico, neurológico e renal. Dessa forma, é possível descrever o grau de disfunção de órgãos durante a permanência de um paciente com sepsis na UTI (KEEGAN; SOARES, 2016).

Uma das principais modificações conceituais do novo consenso, é a de que todos os casos de sepsis devem ser considerados graves. Como choque séptico definiu-se um subgrupo de pacientes com sepsis que apresentam acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas, associadas a maior risco de morte do que a sepsis isoladamente (PLEVIN; CALLCUT, 2017). Os critérios diagnósticos de choque séptico são a “necessidade de vasopressor para manter a pressão arterial média acima de 65 mmHg após a infusão adequada de fluidos, associada a nível sérico de lactato acima de 2 mmol/l (DE BACKER; DORMAN, 2017).

Apesar dos grandes avanços nas definições terminológicas e na compreensão da fisiopatologia da sepsis, a incidência desta síndrome tem crescido de forma acentuada. A sepsis é responsável por mais de 5 milhões de óbitos anualmente e causa impacto financeiro significativo para pacientes e o sistema público de saúde (GAIESKI et al., 2013). Ao longo dos últimos 40 anos (1975-2015), a incidência global de sepsis tratada em hospitais é estimada em 288 casos de por 100.000 pessoas ao ano (STEVENSON et al., 2014). No entanto, nos últimos 10 anos (2005-2015), essa estimativa aumentou para 437 casos de sepsis por 100.000 pessoas ao ano (YU et al., 2016). Esses dados equivalem a uma estimativa de 31,5 milhões de pacientes sépticos tratados em hospitais em todo o mundo a cada ano.

Além disso, uma proporção significativa (10-20%) dos pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs) apresentam sepse ou choque séptico (YU et al., 2016).

Nos EUA a sepse afeta mais de um milhão de americanos por ano e é responsável por 17% de todas as mortes hospitalares, com um custo de mais de US \$ 20 bilhões por ano, tornando-se uma das condições mais caras que ameaçam a vida no país (EPSTEIN, 2016). No Brasil, um estudo epidemiológico multicêntrico denominado BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) revelou que a incidência de sepse é de 57 para cada 100 pacientes admitidos em UTIs e que o custo médio por dia de cada paciente internado nesta condição, é ~R\$ 1.600, com período médio de internação de 9-10 dias (TANIGUCHI et al., 2014).

A sepse pode ser desencadeada em resposta à infecção por diferentes microrganismos incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos, sendo os principais casos de sepse causados por bactérias (MARIANSDATTER, 2016). Os sítios iniciais de infecção na sepse podem variar, sendo os pulmões e o abdômen os mais frequentemente acometidos (CHURPEK et al., 2017; PLEVIN & CALLCUT, 2017; ZHI et al., 2018).

A taxa de sobrevivência à esta síndrome é variada (30-70%), dependendo da rapidez de diagnóstico e implementação terapêutica específica; e principalmente da resposta imune do paciente e de suas condições orgânicas (HORECZKO et al., 2014). Ressalta-se que o enorme desafio que a comunidade médica encontra atualmente, diante de infecções por bactérias multi-resistentes à antibioticoterapia, faz do entendimento dos mecanismos de resposta do hospedeiro à infecção, um campo de estudo essencial.

2.2 Virulência bacteriana

Bactérias causadoras de doenças são conhecidas como patógenos. Patógenos podem expressar diferentes mecanismos de virulência os quais estão associados com a habilidade em se multiplicar no hospedeiro, e estes mecanismos podem variar de acordo com o patógeno (PILLA, G; TANG, C. M., 2018).

Os mecanismos de patogenicidade podem ser classificados em i) mecanismos de toxicidade: quando substâncias tóxicas produzidas pelo patógeno causam danos à células ou tecidos do hospedeiro, como a α -hemolisina de

Staphylococcus aureus que causam lise de eritrócitos (CAVENEY, N. A; LI, F. K.; STRYNADKA, N. C. J., 2018); ii) mecanismos de colonização: quando substâncias produzidas por patógenos permitem ao mesmo ultrapassar barreiras físicas como muco ou células do epitélio, incluindo metaloproteases e proteínas que causam ruptura de integridade epitelial como a CagA (do inglês, *cytotoxin-associated gene A*) (SIEGEL; WEISER, 2015); iii) mecanismos de adesão: produção de proteínas que facilitam a adesão do patógeno à células do hospedeiro como pili e outras proteínas de superfície que contribuem na formação de biofilme (HEILMANN, 2011); e iv) mecanismos de invasão e evasão: produção de proteínas de superfície que promovem a invasão de células do hospedeiro do patógeno, e a evasão de mecanismos de defesa do hospedeiro (FOSTER et al., 2014).

De interesse ao presente trabalho, encontra-se a habilidade de patógenos em se protegerem de ambientes oxidantes e antimicrobianos que têm por objetivo, causar a morte do patógeno.

2.2.1 Importância da tioredoxina bacteriana na infecção

Dentre as diferentes funções da Trx bacteriana como mecanismo de virulência, sua ação antioxidante é a mais bem elucidada (MEYER, 2009). Produzida de forma conservada em todas as espécies, funciona como *scavenger* de EROS, evitando ou atenuando assim, o dano celular ocasionado pela geração excessiva destas moléculas (YU et al., 2013; LU, 2014).

É importante ressaltar a participação da Trx em diversas funções da célula bacteriana que estão relacionadas a sua virulência. A Trx pode funcionar como doadora de elétrons ao sistema de ligação dissulfeto (DSB) (ROZHKOVA et al., 2004), a qual é essencial na conformação de proteínas bacterianas e reguladores de fatores de virulência bacterianos (LU, J; HOLMGREN, A, 2014). Um bom exemplo da ação da Trx bacteriana como doadora de elétrons para o DSB, é a ativação do fator de transcrição PrfA, o qual controla a expressão da maioria dos genes de virulência de *Listeria monocytogenes* (HALL et al., 2016).

Além disso, a Trx bacteriana é capaz de interagir com outras proteínas bacterianas como a DsbA, uma proteína formadora de ligações dissulfeto expressa por diferentes microrganismos incluindo *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* (CHENG et al., 2017; KE et al., 2018). Essa interação ocorre através de

um domínio de ligação para Trx na DsbA, e resulta na síntese de flagelos afetando assim, a motilidade bacteriana (CHENG et al., 2017). Estudos recentes indicam que cepas de *L. monocytogenes* com deleção para o gene TrxA não possuem flagelos, e, portanto, não apresentam motilidade (CHENG et al., 2017). Ressalta-se que a motilidade bacteriana é essencial para a evasão de bactérias à ambientes oxidantes como o fagolisossoma formado por células da imunidade inata de hospedeiros (ROZHKOVA et al., 2004). Evidências indicam que a capacidade antioxidante da Trx bacteriana contribui para aumento da sobrevivência de bactérias como *Mycobacterium leprae* no fagolisossoma, em estágios iniciais da infecção (WIELES et al., 1997). Ainda, estudos conduzidos com *Salmonella* spp. *in vitro* e *in vivo* demonstram que a Trx protege este patógeno da atividade bacteriostática do H₂O₂ produzido pelo hospedeiro, além de contribuir para o aumento de sua patogenicidade através da regulação de fatores de secreção como o sistema de secreção do tipo 2 e 3, que entre funções, regulam a produção de citocinas por células infectadas do hospedeiro (NEGREA et al., 2009; SONG et al., 2016; SARKHEL et al., 2017).

Além de sua ação antioxidante, a Trx bacteriana pode também, interagir com diferentes vias da resposta imune do hospedeiro (KING et al., 2012). De fato, a Trx pode atuar inibindo a formação do complexo de ataque à membrana por impedir a ação da C5 convertase (KING et al., 2012). Além disso, a Trx bacteriana contribui para a evasão de *Streptococcus pneumoniae* à fagocitose por inibir a proteína M expressa em macrófagos do hospedeiro, a qual é importante para a formação do fagolisossoma (MA et al., 2012).

Ainda, é possível que a Trx bacteriana possa contribuir para a virulência e patogenicidade bacteriana, através da regulação de mecanismos ainda não elucidados no hospedeiro (AKAIKE, 2015)

2.3 A complexidade da resposta do hospedeiro à infecções

A resposta do paciente à infecções engloba diversos fatores: i) o reconhecimento do microrganismo causador da infecção por células do hospedeiro e ii) o funcionamento adequado da maquinaria celular necessária para a erradicação da infecção pelo paciente como a capacidade das células imunes e inflamatórias em

reconhecer e apresentar antígenos, produzir mediadores inflamatórios e realizar fagocitose (LELUBRE; VINCENT, 2018).

Dentre as vias de reconhecimento de microrganismos mais bem estudadas encontra-se a família de receptores chamados Toll-like (TLR), os quais detectam padrões moleculares associados a patógenos (MOLNAR et al., 2018; FALLON et al., 2018). Os TLRs podem ser classificados de acordo com a variedade de microrganismos que o TLR pode reconhecer e também de acordo com a sua distribuição intracelular. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são encontrados na membrana celular e reconhecem produtos de origem bacteriana e fúngica (LERMAN et al., 2014). Os TLRs 3, 7, 8 e 9 encontram-se no compartimento endossomal e detectam principalmente produtos virais (LERMAN et al., 2014). Mais especificamente, lipoproteínas e lipolípídeos são reconhecidos pelo complexo TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6; RNA viral de fita dupla é reconhecido pelo TLR3; LPS é reconhecido pelo TLR4; flagelina é reconhecida pelo TLR5; RNA de fita única é reconhecido pelos TLR7 e TLR8; e DNA microbiano é reconhecido pelo TLR9 (STASI et al., 2016). Existem ainda, diversos ativadores endógenos dos TLRs, os quais podem ser produzidos em resposta ao dano tecidual como por exemplo, proteínas de choque térmico e hialuronanos (SAVVA, 2013).

Após serem ativados, os TLRs desencadeiam uma série de cascatas intra- e extra-celulares. Cascatas intra-celulares incluem a ativação de fatores de transcrição nuclear como o AP-1 e o NF- κ B; quinases como MAPK ERK1/2, JNK e p-38; e proteínas quinase (PKC) (LI, 2004; KAWAI; AKIRA, 2005; KRISHNAN et al., 2007; HONG-GELLER et al., 2008). A ativação de TLRs, em parte pela ativação de fatores de transcrição nuclear, leva à síntese e liberação de uma série de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, óxido nítrico (NO) e EROS; assim como o aumento da expressão de diversos receptores envolvidos no processo imune e inflamatório (THWE; AMIEL, 2018). Essas alterações por sua vez, promovem a migração e a ativação de células imunes e inflamatórias, alterações da microvasculatura e permeabilidade vascular e conseqüentemente, dano tecidual (JOHANSEN et al., 2015). Essas são desencadeadas rapidamente em resposta à infecção e se não controladas, resultam em uma resposta inflamatória sistêmica caracterizada por falência de múltiplos órgãos, colapso da vasculatura, regulação térmica, e ocasionalmente, morte (JOHANSEN et al., 2015).

A infecção também pode desencadear a ativação do sistema complemento gerando produtos como o C5a, que, juntamente com os diferentes mediadores inflamatórios produzidos levam à subsequente ativação do sistema de coagulação, causando trombose microvascular e coagulação intravascular disseminada, frequentemente presente em pacientes sépticos (OKAZAKI; MATSUKAWA, 2009). Ainda, os dados recentes acerca da participação dos receptores de potencial transitório (TRPs) na SRIS, bem como a capacidade destes receptores em reconhecer produtos bacterianos (LPS) e do estresse oxidativo, fazem dos mesmos, importantes moléculas de comunicação entre diferentes células na sepse. A importância do estresse oxidativo e dos TRPs para a sepse será discutida em detalhes nas próximas sessões.

2.4 O estresse oxidativo como componente da resposta do hospedeiro na sepse

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres durante a respiração sobrecarrega a capacidade antioxidante das células ou tecidos para inativar essas moléculas antes que elas reajam com componentes celulares críticos, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, causando danos irreversíveis em células e tecidos (MANTZARLIS et al., 2017).

A produção de radicais livres aumenta em paralelo com a tensão de oxigênio (BAR-OR et al., 2015). Em níveis de oxigênio inferiores aos normais, a produção de radicais livres primeiro diminui, e aumenta à medida que as células se tornam mais hipóxicas (GALLEY, 2011). Durante a sepse e SIRS, os tecidos tornam-se hipóxicos e, assim, ocorre aumento na produção de radicais livres decorrente de desbalanço oxidativo.

A produção destes radicais se inicia com a redução do oxigênio à superóxido pela NADPH oxidase presente em células imunes e outras diversas. O superóxido sofre então, dismutação, pela superóxido dismutase, gerando H_2O_2 (HOLZEROVÁ et al., 2015). Tanto o superóxido quanto o H_2O_2 podem ser reduzidos à radical hidroxila, altamente reativo e deletério. Em paralelo o NO é formado à partir da ação da enzima NO sintase induzida na arginina. O NO formado pode reagir com o superóxido, formando assim, peroxinitrito e nitrotirosina, marcadores de estresse oxidativo dependente da geração de NO (BECKMAN et al., 1996; BELLIN et al.,

2013). Ambos, o radical hidroxila quanto o peroxinitrito podem oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA, levando assim, à morte de microrganismos e também de células do hospedeiro (SCHIEBER et al., 2014).

Para controlar a produção excessiva de moléculas oxidantes, vias antioxidantes são ativadas. Assim, o aumento de EROS e RNS, levam à ativação de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione peroxidase e Trx), que catalisam a degradação do H₂O₂ em água e oxigênio (HOLZEROVÁ et al., 2015).

Diante de uma maquinaria antioxidante ineficiente, o H₂O₂ atua na vasculatura causando disfunção endotelial, aumento da permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão, facilitando desta forma, a aumento da migração e ativação de células inflamatórias (MILLAR et al., 2007). A disfunção endotelial é caracterizada por um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (ZHANG, 2014), e apresenta impacto direto no estado de hipóxia, hipoperfusão tecidual e falência de múltiplos órgãos do paciente séptico (AIT-OUFELLA et al., 2010).

2.5 Receptores de potencial transitório e a sepse

Os TRPs foram primeiramente identificados em neurônios de mamíferos compondo fibras sensoriais do tipo C e A δ (COSENS, D. J.; MANNING, A, 1969), e reconhecidos por seu envolvimento na liberação dos neuropeptídeos substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide; CGRP), considerados preditores de letalidade em pacientes com sepse (BEER et al., 2002).

A família de receptores TRP engloba mais de 30 membros distribuídos em 7 subfamílias: Canônica (TRPC; inclui TRPC1-7), Melastatina (TRPM; inclui TRPM1-8), Vanilóide (TRPV; inclui TRPV1-6), Policistina (TRPP; inclui TRPP1-3), Mucolipina (TRPML; inclui TRPML1-3), Anquirina (TRPA; inclui TRPA1) e NOMPC (TRPN; encontrados em *Drosophila* sp, sapos, truta e vermes) (PEDERSEN et al., 2005). Como característica comum, todos os receptores TRP são permeáveis a cátions, particularmente o Ca⁺² e podem ser ativados por diversos agonistas endógenos (incluindo mudanças na temperatura (MILLQVIST, 2015; VAY et al., 2012), pH (LEFFLER et al., 2007; SEMTNER et al., 2007; WANG et al., 2015),

estímulos mecânicos (GOMIS et al., 2008), hormônios (QIU et al., 2010), EROS (BESSAC et al., 2008; NAYLOR et al., 2010) e outros mediadores inflamatórios (para revisão ver: FERNANDES et al., 2012; OGAWA et al., 2015; BISHNOI et al., 2018); e exógenos (como produtos derivados de plantas, fumaça de cigarro, poluição, etc (BAHNASI et al., 2008; para revisão ver: FERNANDES et al., 2012; NISHIDA et al., 2015; LÓPEZ-REQUENA et al., 2017)).

Evidências indicam que a expressão destes receptores não se restringe a neurônios, sendo os mesmos encontrados em células imunes (macrófagos/monócitos e linfócitos), células do endotélio e da musculatura lisa, cardiomiócitos, células renais, dentre outras (BILLETTER et al., 2014). Os avanços recentes acerca de sua expressão levaram a diferentes estudos que atualmente contextualizam receptores desta família como mediadores imprescindíveis da resposta inflamatória. Assim, a importância de alguns receptores TRP para a sepse ou SRIS, já se encontra definida (MARWAHA et al., 2016).

Dentre os receptores TRP, o receptor TRPV1 tem sido o mais amplamente estudado com relação a sepse. Recentemente, um papel modulador foi atribuído para o TRPV1 na sepse (BRYANT et al., 2003; IIDA et al., 2005; CLARK et al., 2007; WANG et al., 2008; GUPTILL et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; LAWTON et al., 2017).

O primeiro estudo sugerindo o envolvimento deste receptor na sepse demonstrou que ratos com sepse abdominal pré-tratados com o agonista TRPV1 capsaicina apresentavam maior taxa de sobrevivência (BRYANT et al., 2003). Além disso, demonstrou-se que ratos com sepse induzida por LPS não apresentavam febre quando pré-tratados com capsaicina (ROMANOVSKY, 2004). No entanto, estes experimentos apresentavam limitações considerando-se que além de ativar o receptor TRPV1, a capsaicina também provoca a denervação das fibras sensoriais, ocasionando a perda de outros componentes sensoriais além do TRPV1. Não muito depois, as evidências obtidas com o uso da capsaicina foram confirmadas em experimentos usando camundongos com deleção gênica do sítio de ativação do receptor TRPV1 (TRPV1KOs). Foi observado que animais TRPV1KOs com sepse induzida por LPS apresentavam menos febre do que camundongos selvagens (WT) (IIDA et al., 2005).

Em conjunto, essas evidências iniciais sugeriam que a ativação do receptor TRPV1 era capaz de mediar uma “proteção” contra a sepse, embora os mecanismos envolvidos nessa proteção ainda não estavam estabelecidos. Estudos anteriores têm atribuído um efeito protetor ao TRPV1 quando em modelos de sepse e endotoxemia (CLARK et al., 2007; FERNANDES et al., 2012; LAWTON et al., 2017).

Parte deste efeito protetor se deve à modulação da resposta inflamatória e imune no combate a infecção bacteriana. Foi demonstrado que camundongos TRPV1KO com sepse causada por LPS (intraperitoneal) apresentam hipotensão e hipotermia exacerbadas, além de falência hepática quando comparados a camundongos WT sépticos; uma resposta associada a níveis aumentados de TNF α e NO no peritônio destes animais (CLARK et al., 2007). Não muito tempo, após Guptill e colaboradores (2011) demonstrarem que camundongos TRPV1KO com sepse polimicrobiana apresentam maior taxa de mortalidade quando comparados a WTs. Ainda, a deleção gênica do TRPV1 em animais com sepse, leva à perda de função de macrófagos, os quais tornam-se deficientes no combate à infecção, por apresentarem capacidade reduzida de realizar fagocitose e gerar mediadores inflamatórios como NO e EROS (FERNANDES et al., 2012). Além disso, a deficiência da sinalização mediada pelo TRPV1 promove apoptose de macrófagos (FERNANDES et al., 2012). Similarmente, estudos com antagonistas confirmaram as evidências obtidas através de estudos em camundongos TRPV1KO (WANG et al., 2008; GUPTILL et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Essas alterações da resposta imune inata facilitam a transição da resposta inflamatória local para uma resposta sistêmica com prognóstico letal, caracterizado por hipotensão, hipotermia, falência de órgãos e mortalidade acentuadas.

Além do TRPV1, estudos recentes indicam um papel deletério para o TRPA1 na SRIS causada por LPS. Assim, foi demonstrado que o tratamento repetido com o antagonista para TRPA1 protege o fígado e rins de animais com SRIS induzida por LPS, além de aumentar o número de células imunes com perfil anti-inflamatório na cavidade peritoneal destes animais (MENDES et al., 2016). O mesmo trabalho demonstrou que na ausência de sinalização via TRPA1, há redução da produção de citocinas e de H₂O₂. Ainda, evidências indicam que o LPS é capaz de ativar diretamente o TRPA1 (MESEGUER et al., 2014).

A descoberta do papel destes receptores na sepse e SRIS, tem aberto novas perspectivas em relação ao entendimento das vias imunes associadas à erradicação de infecções bacterianas. Por outro lado, não se sabe qual a relevância de outros receptores da mesma família para esta síndrome. Ressalta-se que tanto o TRPV1 e o TRPA1 atuam como sensores de compostos oxidantes gerados durante o estresse oxidativo (TREVISAN et al., 2013); além de regularem a produção de espécies reativas no hospedeiro (MORI et al., 2017). Assim, especula-se se outros receptores da mesma família que compartilham a função de sensor de estresse oxidativo, poderiam também, exercer papel regulador na sepse.

2.6 Relevância do TRPC5 como "sensor" e modulador do estresse oxidativo na sepse

O receptor TRP Canônico 5 (TRPC5), é um receptor relativamente novo e foi primeiramente clonado em camundongos e então em humanos (OKADA et al., 1998; SOSSEY-ALAOUI et al., 1999). Uma característica interessante destes receptores é o fato de que eles podem formar complexos funcionais homoméricos e heterodiméricos com outros receptores da mesma família (TRPC1 e TRPC4) (HOFMANN et al., 2002; XU et al., 2008).

Ressalta-se que ainda não existem antagonistas capazes de bloquear seletivamente este receptor. Recentemente, foi desenvolvido um potente e seletivo bloqueador do canal TRPC4/TRPC5, o 4-metil-2- (1-piperidinil) -quinolina (ML204), a descoberta desse antagonista tem trazido importantes avanços no entendimento destes receptores (MILLER et al., 2011). Ainda, a geração do primeiro camundongo KO para este receptor em 2009 (RICCIO et al., 2009), têm contribuído para o avanço no entendimento da importância do TRPC5 na regulação de processos fisiológicos e patológicos.

O primeiro papel atribuído ao receptor TRPC5 foi relacionado ao desenvolvimento cerebral e hoje sabe-se da importância deste receptor na percepção do medo (RICCIO et al., 2009) e na transmissão da resposta sensorial ao frio a partir do sistema nervoso periférico para o cérebro (ZIMMERMANN et al., 2011). Desde a descoberta do TRPC5 no cérebro até hoje, foi demonstrado que esse receptor encontra-se expresso numa série de células e tecidos de origem neuronal (cérebro, gânglio da raiz dorsal, neuronios sensoriais primários) (GOMIS et

al., 2008; RICCIO et al., 2009; STAAF et al., 2009) e não-neuronal incluindo células endoteliais e da musculatura vascular lisa (RICCIO et al., 2002; BEECH et al., 2004; YIP et al., 2004).

Apesar de não existirem evidências ligando a ativação do receptor TRPC5 à sepse, um importante papel imunossupressor e anti-inflamatório foi sugerido para este receptor na artrite reumatóide (XU et al., 2008; ALAWI et al., 2016). O bloqueio da ativação do TRPC5 causa aumento da expressão de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) (XU et al., 2008), importantes enzimas envolvidas na degeneração articular observada na artrite reumatóide. A deleção gênica ou antagonismo deste receptor promove piora exacerbação da inflamação articular com acúmulo de neutrófilos e aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios no espaço intra-articular, contribuindo assim, para aumento da resposta nociceptiva em camundongos (ALAWI et al., 2016). Estas evidências sugerem um papel protetor para o TRPC5 na artrite reumatóide, um processo inflamatório de curso crônico.

Além disso, um número crescente de agonistas endógenos têm sido descrito para este receptor. Dentre estes agonistas pode-se ressaltar: Trx reduzida, NO, H₂O₂, prótons H⁺, fosfolípidos oxidados e gangliosídeos (SEMTER et al., 2007; YOSHIDA et al., 2006; WU et al., 2007; XU et al., 2008; NAYLOR et al., 2010). De forma interessante, todos estes ativadores possuem participação efetiva na resposta imune e/ou inflamatória.

Como já mencionado, uma característica interessante destes receptores é a capacidade de formar complexos funcionais homoméricos e heterodiméricos com outros receptores da mesma família (TRPC1 e TRPC4) (HOFMANN et al., 2002; XU et al., 2008), entretanto, como estes complexos respondem aos diferentes agonistas, ainda permanece por ser elucidado.

Apesar do papel do TRPC5 ainda não ter sido estudado na sepse, seu papel como sensor de estresse oxidativo é complexo. O TRPC5 pode ser ativado por moléculas pró-oxidantes (H₂O₂, fosfolípidos oxidados) e antioxidantes (Trx em sua forma reduzida) (XU et al., 2008; AL-SHAWAF et al., 2010; WUENSCH et al., 2010; NAYLOR et al., 2011; NAZIROĞLU, 2012). Wuensch e colaboradores (2010) demonstraram que o estresse oxidativo aumenta a expressão do TRPC5.

Dentre os ativadores do TRPC5, a Trx (XU et al., 2008) é talvez a molécula mais intrigante. A Trx é uma proteína produzida por todas as espécies, de bactérias a humanos (para revisão, ler: LEE et al., 2012). Como mencionado anteriormente, a Trx é uma molécula antioxidante potente produzida pelo hospedeiro durante o estresse oxidativo, capaz de regular negativamente a resposta inflamatória existente (para revisão, ler: COLLET e MESSENS, 2010; RAY et al., 2012). Por outro lado, a Trx produzida pelo hospedeiro também parece estar relacionada ao aumento da virulência (NEGREA et al., 2009) enquanto que a Trx produzida por bactérias é capaz de mediar a sua evasão em relação ao sistema imune (MA et al., 2012). Em conjunto, essas evidências indicam a Trx como um potencial alvo terapêutico no tratamento de patologias associadas com desbalanço do sistema redox, como a sepse por exemplo.

No entanto, o papel da TRX na sepse continua não esclarecido. Em 2003, foi demonstrado que camundongos transgênicos com super expressão de Trx encontram-se protegidos contra o dano hepático causado pelo tratamento com LPS. Esse mecanismo protetor parece estar relacionado com a capacidade da Trx em interferir com vias de sinalização associadas à apoptose hepática via citocromo c (OKUYAMA et al., 2003). A Trx também parece estar relacionada ao aumento da resistência do hospedeiro ao LPS, e sua expressão encontra-se aumentada em diversos órgãos (coração, pulmão e fígado) em camundongos tratados com LPS (SANO et al., 2002). Por outro lado, estudos recentes demonstraram que bactérias do tipo *Streptococcus* sp são capazes de utilizar a Trx produzida pelo hospedeiro para evadir a fagocitose, via inibição da clivagem e produção de complemento C3a (MA et al., 2012). Além disso, a Trx produzida por bactérias como por exemplo *Salmonella* sp, contribui para um aumento da virulência bacteriana (NEGREA et al., 2009) através de seu poder antioxidante (TAKEMOTO et al., 1998; ROCHA et al., 2007) e por mecanismos ainda não esclarecidos. Em conjunto, essas informações indicam um paradigma no qual i) a Trx produzida pelo hospedeiro poderia “proteger” o organismo contra uma resposta exacerbada à infecção causada por produtos bacterianos e ii) a Trx produzida por ambos o hospedeiro e a bactéria, facilitaria a proliferação bacteriana, resultando em um prognóstico fatal da sepse. Em ambos os casos, não existem evidências da participação da ativação dos receptores TRPC5 nos efeitos da Trx na sepse.

Assim, esta tese avaliou a relevância do receptor TRPC5 nas respostas mediadas pela Trx derivada de *E. coli* na SRIS induzida por LPS através do uso de animais com deleção gênica para este receptor (TRPC5^{-/-}) e do antagonista para TRPC4/TRPC5, ML204. Apresentam-se aqui as primeiras evidências de que os receptores TRPC4/TRPC5 podem regular vias associadas da resposta inflamatória à bactérias, além de possuírem ações não-dependentes destes receptores no hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIT-OUFELLA, H. et al. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. **Intensive care medicine**, v. 36, n. 8, p. 1286-1298, 2010.
- ALAWI, K. M. et al. Transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) protects against pain and vascular inflammation in arthritis and joint inflammation. **Annals of the rheumatic diseases**, p. annrheumdis-2015-208886, 2016.
- ALAWI, K. M.; JULIE, K. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, 125.2 (2010): 181-195.
- AL-SHAWAF, E. et al. Short-term stimulation of calcium-permeable transient receptor potential canonical 5-containing channels by oxidized phospholipids. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2010; 30: 1453-1459.
- AKAIKE, T. Host defense and oxidative stress signaling in bacterial infection. **Japanese journal of bacteriology**, v. 70, n. 3, p. 339-349, 2015.
- BAHNASI, Y. M. et al. Modulation of TRPC5 cation channels by halothane, chloroform and propofol. **British journal of pharmacology**, 153.7 (2008): 1505-1512.
- BALK, R. A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) Where did it come from and is it still relevant today?. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 20-26, 2014.
- BAR-OR, D. et al. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: are there clues to better treatment?. **Redox Report**, v. 20, n. 5, p. 193-197, 2015.
- BECKMANN, H. et al. A benzothiadiazine derivative and methylprednisolone are novel and selective activators of transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) channels. **Cell calcium**, v. 66, p. 10-18, 2017.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. C1424-C1437, 1996.
- BEER, S. et al. Systemic neuropeptide levels as predictive indicators for lethal outcome in patients with postoperative sepsis. **Critical care medicine**; 30.8 (2002): 1794-1798.
- BESSAC, B. F. et al. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **The Journal of clinical investigation**; 118.5 (2008): 1899-1910.
- BILLETER, A. T. et al. Transient receptor potential ion channels: powerful regulators of cell function. **Annals of surgery**, v. 259, n. 2, p. 229-235, 2014.
- BELLIN, D. et al. Nitric oxide as a mediator for defense responses. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 26, n. 3, p. 271-277, 2013.
- BISHNOI, M. et al. Transient receptor potential (TRP) channels: a metabolic TR (i) P to obesity prevention and therapy. **Obesity Reviews**, 2018.
- BRUNKHORST, F. M.; GASTMEIER, P.; ABU, M. S. Current aspects of the definition and diagnosis of sepsis and antibiotic resistance. **Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz**, 2018.

BRYANT, P. et al. Capsaicin-sensitive nerves regulate the metabolic response to abdominal sepsis. **Journal of Surgical Research**, 2003; 112: 152-161.

CAVENEY, N. A.; LI, F. K.; STRYNADKA, N. C. J. Enzyme structures of the bacterial peptidoglycan and wall teichoic acid biogenesis pathways. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 53, p. 45-58, 2018.

CHEN, G. et al. The role of thioredoxin-1 in suppression sepsis through inhibiting mitochondrial-induced apoptosis in spleen. **Shock**, v. 47, n. 6, p. 753-758, 2017.

CHEN, J. et al. Endogenously generated arachidonate-derived ligands for TRPV1 induce cardiac protection in sepsis. **The FASEB Journal**, p. fj. 201701303R, 2018.

CHENG, C. et al. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 287, 2017.

CHURPEK, M. M. et al. Quick sepsis-related organ failure assessment, systemic inflammatory response syndrome, and early warning scores for detecting clinical deterioration in infected patients outside the intensive care unit. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 195, n. 7, p. 906-911, 2017.

CLARK, N. et al. The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. **FASEB J.** 2007; 21: 3747-3755.

COSENS, D. J.; MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature**, v. 224, n. 5216, p. 285, 1969.

COHEN, J. et al. Sepsis: a roadmap for future research. **The Lancet infectious diseases**, v. 15, n. 5, p. 581-614, 2015.

COLLET, J.; JORIS, M. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. **Antioxidants & redox signalling**, 13.8 (2010): 1205-1216.

DE BACKER, D.; DORMAN, T. Surviving sepsis guidelines: a continuous move toward better care of patients with sepsis. **Jama**, v. 317, n. 8, p. 807-808, 2017.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive care medicine**, v. 39, n. 2, p. 165-228, 2013.

EPSTEIN, L. Varying estimates of sepsis mortality using death certificates and administrative codes—United States, 1999–2014. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016.

FALLON, E. A. et al. A novel role for coinhibitory receptors/checkpoint proteins in the immunopathology of sepsis. **Journal of leukocyte biology**, 2018.

FERNANDES et al. Superoxide generation and leukocyte accumulation: key elements in the mediation of leukotriene B₄-induced itch by transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1. **Faseb Journal**, 2013; 27: 1664-1673.

FERNANDES et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, 2011; 63: 819-829.

FERNANDES, E. S; FERNANDES, M. A; KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **British journal of pharmacology**, 2012a; 166: 510-521.

FERNANDES, et al. TRPV1 Deletion Enhances Local Inflammation and Accelerates the Onset of Systemic Inflammatory Response Syndrome. **Journal of Immunology**, 2012b; 188: 5741-5751.

FERNANDEZ, RICARDO et al. Neural reflex regulation of systemic inflammation: potential new targets for sepsis therapy. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 489, 2014.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49, 2014.

GAIESKI, D. F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Critical care medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167-1174, 2013.

GALLEY, H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British journal of anaesthesia**, v. 107, n. 1, p. 57-64, 2011.

GOMIS, A. et al. Hypoosmotic-and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. **The Journal of physiology**; 586.23 (2008): 5633-5649.

GUPTILL et al. Disruption of the transient receptor potential vanilloid 1 can affect survival, bacterial clearance, and cytokine gene expression during murine sepsis. **Anesthesiology**; 2011; 114: 1190-1199.

HALL, M. et al. Structural basis for glutathione-mediated activation of the virulence regulatory protein PrfA in Listeria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. 14733-14738, 2016.

HEILMANN, C. Adhesion mechanisms of staphylococci. In: Bacterial adhesion. **Springer, Dordrecht**, 2011. p. 105-123.

HOFMANN, T.; SCHAEFER, M.; SCHULTZ, G.; GUDERMANN, T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002; 99: 7461-7466.

HONG-GELLER, E. A. C.; SABINE, L. Targeting toll-like receptor signaling pathways for design of novel immune therapeutics. **Current drug discovery Technologies**, 5.1 (2008): 29-38.

HORECZKO, T.; GREEN, J. P.; PANACEK, E. A. Epidemiology of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in the emergency department. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 15, n. 3, p. 329, 2014.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 63, p. 16-20, 2015.

IIDA, T. et al. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. **Neuroscience Letters**, 2005; 378: 28-33.

JIANG, H. et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and new fenamate analogues on TRPC4 and TRPC5 channels. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 7, p. 923-931, 2012.

- JOHANSEN, M. E. et al. Profound endothelial damage predicts impending organ failure and death in sepsis. In: Seminars in thrombosis and hemostasis. **Thieme Medical Publishers**, 2015. p. 016-025.
- KAWAI, TARO, AND SHIZUO AKIRA. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current opinion in immunology**; 17.4 (2005): 338-344.
- KEEGAN, M. T.; SOARES, M. O que todo intensivista deveria saber sobre os sistemas de escore prognóstico e mortalidade ajustada ao risco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 28, n. 3, p. 264-269, 2016.
- KE, N. et al. Identification of the thioredoxin partner of VKOR in mycobacterial disulfide bond formation. **Journal of bacteriology**, p. JB. 00137-18, 2018.
- KIANG, J. G. et al. Wound trauma increases radiation-induced mortality by activation of iNOS pathway and elevation of cytokine concentrations and bacterial infection. **Radiation research**, v. 173, n. 3, p. 319-332, 2009.
- KIANG, J. G.; GARRISON, B. R.; GORBUNOV, N. V. Radiation combined injury: DNA damage, apoptosis, and autophagy. **Armed forces radiobiology research inst bethesda md**, 2010.
- KING, B. C. et al. Truncated and full-length thioredoxin-1 have opposing activating and inhibitory properties for human complement with relevance to endothelial surfaces. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 8, p. 4103-4112, 2012.
- KRISHNAN, J. et al. Toll-like receptor signal transduction. **Experimental and molecular medicine**; 39.4 (2007): 421.
- LASSEAUX, C.; CHAMAILLARD, M.; POULIN, L. F. Understanding the cellular origin of the mononuclear phagocyte system sheds light on the myeloid postulate of immune paralysis in sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 823, 2018.
- LAWTON, S. K. et al. N-Arachidonoyl dopamine modulates acute systemic inflammation via nonhematopoietic TRPV1. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1465-1475, 2017.
- LEE, S.; KIM, S. M.; LEE, R. T. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. **Antioxid Redox Signal**, 2012; doi: 10.1089/ars.2011.4322.
- LEFFLER, A. et al. A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium. **European Journal of Neuroscience**; 26.1 (2007): 12-22.
- LELUBRE, C.; VINCENT, J. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. Nature reviews. **Nephrology**, 2018.
- LERMAN, Y. V. et al. Sepsis lethality via exacerbated tissue infiltration and TLR-induced cytokine production by neutrophils is integrin $\alpha 3\beta 1$ -dependent. **Blood**, v. 124, n. 24, p. 3515-3523, 2014.
- LI, C. et al. Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan rapidly induces cardioprotection. **Cardiovascular Research**; 61.3 (2004): 538-547.
- LI, Q. et al. Endosomal NADPH oxidase regulates c-Src activation following hypoxia/reoxygenation injury. **Biochemical Journal**, v. 411, n. 3, p. 531-541, 2008.

- LILLIG, C. H. et al. New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 12, p. 7695-7698, 1999.
- PILLA, G.; TANG, C. M. Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1, 2018.
- LÓPEZ-REQUENA, A. et al. Roles of neuronal TRP channels in neuroimmune interactions. 2017.
- LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75-87, 2014.
- LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. *Antioxidants & redox signaling*, v. 21, n. 3, p. 457-470, 2014.
- MA, Z. et al. Interaction between M-like protein and macrophage thioredoxin facilitates antiphagocytosis for *Streptococcus equi* ssp. zooepidemicus. **PLoS One** 2012; 7: e32099.
- MARWAHA, L. et al. TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 6, p. 305-317, 2016.
- MANTZARLIS, K.; TSOLAKI, V.; ZAKYNTHINOS, E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- MARIANSDATTER, S. E. et al. Differences in reported sepsis incidence according to study design: a literature review. **BMC medical research methodology**, v. 16, n. 1, p. 137, 2016.
- MAXIME, J. J. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial pathogenesis**, 2017.
- MAY, H. C. et al. Repurposing Auranofin, Ebselen, and PX-12 as Antimicrobial Agents Targeting the Thioredoxin System. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 336, 2018.
- MENDES, S. J. F et al. Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. **International immunopharmacology**, v. 34, p. 60-70, 2016.
- MESEGUER, V. et al. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. **Nature communications**, v. 5, p. 3125, 2014.
- MILLAR, T. M.; PHAN, VAN.; TIBBLES, L. A. ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1165-1177, 2007.
- MILLER et al. Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, 2011; 286: 33436-33446.
- MISSALL, T. A.; LODGE, J. K. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 2, p. 487-489, 2005.

- MOLNAR, L. et al. Sepsis-associated encephalopathy: A review of literature. **Neurology India**, v. 66, n. 2, p. 352, 2018.
- MORI, Y. et al. TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O₂ sensing. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, v. 93, n. 7, p. 464-482, 2017.
- NAYLOR, J. et al. TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbenes. **J Biol Chem**; 2011; 286: 5078-5086.
- NAYLOR, J. et al. TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbenes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5078-5086, 2011.
- NAYLOR, J. et al. Pregnenolone sulphate-and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. **Circulation research**; 106.9 (2010): 1507-1515.
- NAZIROĞLU, M.; DIKICI, D. M.; DURSUN, S. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. **Neurochem Research**; 2012; 37: 2065-2075.
- NAZIROĞLU, M. Role of Antioxidants Treatments on Oxidative Stress and Calcium Entry in Neurological Disease: Focus on TRP Channels. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 233, 2015.
- NEGREA, A. et al. Thioredoxin 1 participates in the activity of the Salmonella enterica serovar *Typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system. **J Bacteriol**; 2009; 191: 6918-6927.
- NISHIDA, M. et al. TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets. In: Innovative Medicine. **Springer**, Tokyo, 2015. p. 195-218.
- NOUBADE, R. et al. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. **Nature**, v. 509, n. 7499, p. 235, 2014.
- OGAWA, T. et al. Transient receptor potential channel superfamily: Role in lower urinary tract function. **International Journal of Urology**, v. 22, n. 11, p. 994-999, 2015.
- OKADA, T. et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. **Journal of Biological Chemistry**, 1998; 273: 10279-10287.
- OKAZAKI, Y.; MATSUKAWA, A. Pathophysiology of sepsis and recent patents on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 26-32, 2009.
- OKUYAMA, H. et al. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. **Hepatology**; 2003; 37: 1015-1025.
- PEDERSEN, S.; FALSIG, G. O.; BERND, N. TRP channels: an overview. **Cell calcium**; 38.3 (2005): 233-252.
- PERL, MARIO et al. Role of programmed cell death in the immunopathogenesis of sepsis. Drug Discovery Today: **Disease Mechanisms**, v. 4, n. 4, p. 223-230, 2007.
- PLEVIN, R.; CALLCUT, R. Update in sepsis guidelines: what is really new? **Trauma Surgery & Acute Care Open**, v. 2, n. 1, p. e000088, 2017.

QIU, JIAN, et al. Leptin excites proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC channels. **The Journal of Neuroscience**; 30.4 (2010): 1560-1565.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**; 2012; 24: 981-990.

RICCIO et al. Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. **Cell**, 2009; 137: 761-772.

ROCHA, E. R.; TZIANABOS, A. O.; SMITH, C. J. Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. **Journal of Bacteriology**, 2007; 189: 8015-8023.

ROZHKOVA, A. et al. Structural basis and kinetics of inter-and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. **The EMBO journal**, v. 23, n. 8, p. 1709-1719, 2004.

ROMANOVSKY, A. A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved. **Frontiers Bioscience**, v. 9, p. 494-504, 2004.

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

SALEH, M. et al. Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence. **EMBO molecular medicine**, v. 5, n. 12, p. 1852-1870, 2013.

SANO, H.; SATA, T.; NANRI, H.; IKEDA, M.; SHIGEMATSU, A. Thioredoxin is associated with endotoxin tolerance in mice. **Critical Care Medicine** 2002; 30: 190-194.

SARKHEL, R. et al. Methionine sulfoxide reductase A of *Salmonella Typhimurium* interacts with several proteins and abets in its colonization in the chicken. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 12, p. 3238-3245, 2017.

SAVVA, A.; ROGER, T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 387, 2013.

SCHUMACKER, P. T. Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 8, n. 6, p. 477-484, 2011.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SEMTNER, M. et al. Potentiation of TRPC5 by protons. **Journal of Biological Chemistry**; 282.46 (2007): 33868-33878.

SIEGEL, S. J.; WEISER, J. N. Mechanisms of bacterial colonization of the respiratory tract. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 425-444, 2015.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta physiologica**, v. 213, n. 3, p. 561-574, 2015.

- SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.
- SONG, M. et al. Antioxidant defense by thioredoxin can occur independently of canonical thiol-disulfide oxidoreductase enzymatic activity. **Cell reports**, v. 14, n. 12, p. 2901-2911, 2016.
- SOSSEY-ALAOUI et al. Molecular cloning and characterization of TRPC5 (HTRP5), the human homologue of a mouse brain receptor-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. **Genomics**; 1999; 60: 330-340.
- STAAF, S. et al. Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain. **Pain®**; 144.1 (2009): 187-199.
- STASI, A. et al. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 1, p. 24-31, 2016.
- STEVENSON, E. K. et al. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis. **Critical care medicine**, v. 42, n. 3, p. 625, 2014.
- SMANI, T. et al. Functional and physiopathological implications of TRP channels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 8, p. 1772-1782, 2015.
- TAKAHASHI, N. et al. Cancer Cells Co-opt the Neuronal Redox-Sensing Channel TRPA1 to Promote Oxidative-Stress Tolerance. **Cancer Cell**, 2018.
- TAKEMOTO, T.; ZHANG, Q. M.; YONEI, S. Different mechanisms of thioredoxin in its reduced and oxidized forms in defense against hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Free Radical Biology and Medicine**, 1998; 24: 556-562.
- TANIGUCHI, L. U. et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.
- THWE, P. M.; AMIEL, E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. **Cancer letters**, v. 412, p. 236-242, 2018.
- TREVISAN, G. et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Receptor Stimulation by Hydrogen Peroxide Is Critical to Trigger Pain During Monosodium Urate-Induced Inflammation in Rodents. **Arthritis & Rheumatology**, v. 65, n. 11, p. 2984-2995, 2013.
- V ZHOLOS, A. TRP channels in respiratory pathophysiology: the role of oxidative, chemical irritant and temperature stimuli. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 279-291, 2015.
- VAY, L.; CHUNJING, G. U.; PETER, A. M. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **British journal of pharmacology**; 165.4 (2012): 787-801.
- VELDHUIS, N. A. et al. The G Protein-Coupled Receptor-Transient Receptor Potential Channel Axis: Molecular Insights for Targeting Disorders of Sensation and Inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 1, p. 36-73, 2015.
- VINCENT, J. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet (London, England)**, v. 381, n. 9868, p. 774, 2013.

- WANG, Y. et al. TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**; 2008; 294: R1517-R1523.
- WANG, Z. et al. Inhibition of TRPA1 Attenuates Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity by Suppressing Oxidative Stress, the Inflammatory Response, and Endoplasmic Reticulum Stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.
- WANG, H.; SIEMENS, J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. **Temperature**, v. 2, n. 2, p. 178-187, 2015.
- WIELES, B. et al. Increased intracellular survival of Mycobacterium smegmatis containing the Mycobacterium leprae thioredoxin-thioredoxin reductase gene. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2537-2541, 1997.
- WITT, N. J. et al. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. **Chest Journal**; 99.1 (1991): 176-184.
- WUENSCH, T. et al. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. **Diabetes**; 2010; 59: 844-849.
- XU et al. TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. **Nature**; 2008; 451: 69-72.
- XU, S. Z. et al. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. **Br J Pharmacol**; 2005; 145: 405-414.
- YOSHIDA, T. et al. Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2): its potential roles in the aging process. **Biofactors**; 27.1-4 (2006): 47-51.
- YU, H. et al. Effect of early goal-directed therapy on mortality in patients with severe sepsis or septic shock: a meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ open**, v. 6, n. 3, p. e008330, 2016.
- YU, Y. et al. Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 92-104, 2013.
- ZHANG, S. et al. Interception of the endotoxin-induced arterial hyporeactivity to vasoconstrictors. **Vascular pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 15-23, 2014.
- ZHI, D. et al. Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients with Sepsis: Clinical Characteristics and Outcomes. **Journal of Investigative Surgery**, p. 1-8, 2018.
- ZIELIŃSKA, M. et al. Role of transient receptor potential channels in intestinal inflammation and visceral pain: novel targets in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 2, p. 419-427, 2014.

3. LISTA DE PUBLICAÇÕES

Artigo 1:

Tioredoxina e virulência bacteriana: implicações para o desenvolvimento de fármacos. A ser submetido à *Critical Reviews in Microbiology*

Artigo 2:

Transient receptor potential canonical channels 4 and 5 mediate *Escherichia coli*-derived thioredoxin effects in lipopolysaccharide-injected mice. Publicado na *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* em 2018

ARTIGO 1

Tioredoxina e virulência bacteriana: implicações para o desenvolvimento de fármacos.

A ser submetido à *Critical Reviews in Microbiology* (IF= 4.738; Qualis A1)

TIOREDOXINA E VIRULÊNCIA BACTERIANA: IMPLICAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE FARMÁCOS

**Saulo J. F. Mendes,¹ Roberval Nascimento Moraes Neto,¹ Mizael Calácio
Araújo¹, Luís C. N. Silva,¹ Elizabeth S. Fernandes¹**

¹Programa de Pós-graduação, Universidade Ceuma, Rua dos Castanheiros, no 1,
Renascença II, São Luís, MA, Brazil

RESUMO

O sistema tioredoxina, que é composto por NADPH, tioredoxina redutase (TrxR) e tioredoxina (Trx), foi primeiramente descrito em *Escherichia coli*, mas está presente em todos os organismos vivos (bactérias a mamíferos). A Tioredoxina desempenha um papel chave na homeostase redox, caracterizado por catalisar a redução das ligações dissulfeto (S-S) deixando seus grupos tiol (-SH) livres. Desta forma, a tioredoxina pode fornecer elétrons a uma ampla gama de enzimas e proteínas, auxiliando no enrolamento e formação de proteínas, além disso, desempenha um papel chave na síntese de DNA. Diversas evidências têm comprovado que o sistema tioredoxina é crucial para a virulência de diferentes patógenos, sendo por isso considerado um alvo potencial no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente devido a emergência de linhagens cada vez mais resistentes as drogas comumente usadas. Neste sentido, essa revisão tem por objetivo discutir as principais funções da tioredoxina como fator de virulência de bactérias (tendo como modelo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium spp.*, *Bacillus anthracis*, *Helicobacter pylori* e *Salmonella spp.*) e a relevância desta proteína como alvo para o desenvolvimento de novas drogas. O papel das Trxs na resposta ao estresse oxidativo tem sido demonstrada em várias espécies bacterianas, envolvidas no aumento a resistência ao estresse oxidativo, aumento da sobrevivência, virulência, motilidade bacteriana e evasão à fagocitose. Vários compostos demonstraram ação inibitória sobre a Trx bacteriana, como, por exemplo, ebselen, auranofina, epigalocatequina e derivados de prata, esses compostos agem depletando as Trx de patógenos, interferindo assim na capacidade de resistir ao ambiente oxidante de fagócitos. Em síntese, o sistema Trx é um sistema antioxidante chave para diversas bactérias, sendo considerado um importante fator de virulência, dessa forma, ela pode servir como um alvo viável para o design de drogas antibacterianas.

INTRODUÇÃO

A sepse, do ponto de vista clínico e da saúde pública, é uma condição extremamente relevante entre as complicações infecciosas vigentes, tanto pelo número de casos, quanto pela gravidade e complexidade (PLEVIN & CALLCUT, 2017). Acredita-se que 18 milhões de casos ocorram anualmente no mundo, sendo que a cada 4 pessoas diagnosticadas com sepse, uma é por ela vitimada (DELLINGER et al., 2013). A sepse pode ser desencadeada em resposta à infecção por diferentes microrganismos incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos; sendo as infecções bacterianas, causadoras da maior parte dos casos de sepse (BRUNKHORST et al., 2018), e, a alta taxa de mortalidade está associada diretamente à resistência bacteriana a antibióticos.

Uma das características da sepse é o desencadeamento da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) à partir de uma infecção local. A SRIS é caracterizada por uma resposta imune e inflamatória sistêmica exacerbada que causa a elevação de mediadores pro-inflamatórios, culminando com a disfunção e falência de múltiplos órgãos; e subsequente morte do hospedeiro (BALK, 2014). Apesar de mais de um século de publicações científicas e de todos os avanços e esforços da indústria farmacêutica, um tratamento específico e totalmente eficiente para a sepse continua sendo alvo desejado e ainda hoje, complexo demais. O tratamento da sepse permanece restrito e dependente da administração de fluidos intravenosos, vasopressores e antibioticoterapia, além de cuidados médicos que envolvem a ventilação mecânica e hidratação (COHEN, 2015).

Uma variedade de abordagens terapêuticas, principalmente de natureza anti-inflamatória, falharam na tentativa de tratar a sepse humana (por exemplo, bloqueadores das vias ativadas por IL-1 β , TNF α , prostaglandinas, leucotrienos, etc.) (PERL et al., 2007; KIANG et al., 2009; KIANG et al., 2010; RUSSELL, 2016). Devido ao fracasso das estratégias anti-inflamatórias, a comunidade médica e científica tem questionado se as alterações inflamatórias relacionadas à sepse são fatores determinantes da morte do paciente (PERL et al., 2007; KIANG et al., 2009; KIANG et al., 2010; RUSSELL, 2016).

Neste panorama, novas vias de interação entre patógeno e hospedeiro têm sido exploradas. Entre elas, ressalta-se o estresse oxidativo. Especialmente na sepse, o estresse oxidativo é uma resposta complexa, a qual pode ser gerada tanto

pelo hospedeiro, quanto pelo microrganismo causador da infecção. Na tentativa de combate à infecção, o hospedeiro produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS e RNS, respectivamente) com potencial antimicrobiano, principalmente por células imunes (NOUBADE et al., 2014). Com o intuito de perpetuar a colonização e conseqüentemente, a infecção, os microrganismos incluindo bactérias, ativam suas vias antioxidantes, com o intuito de atenuar a resposta oxidante do hospedeiro (MAXIME et al., 2017). Uma destas vias envolve a tioredoxina (Trx), uma proteína altamente conservada em todas as espécies. Além de funcionar como *scavenger* de EROS, outras funções têm sido atribuídas à Trx derivada de bactérias incluindo participação na motilidade bacteriana e supressão da fagocitose por células do hospedeiro (CHENG et al., 2017; SONG et al., 2016) funções estas, que podem atuar em conjunto contribuindo para a virulência bacteriana.

O sistema Trx, que compreende a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase (TrxR), foi descoberto por Peter Reichard e colaboradores em 1964 como um sistema de redução de ribonucleotídeos para desoxirribonucleotídeos em *Escherichia coli* (LU; HOLMGREN, 2014). Esse sistema é caracterizado por reduzir ligações dissulfeto (S-S) deixando seus grupos tiol (-SH) livres, em outras palavras, a Trx pode fornecer elétrons a uma ampla gama de enzimas e proteínas, auxiliando no enrolamento e formação de proteínas oxidativas, além disso, desempenha um papel chave na síntese de DNA e defesas contra agentes oxidantes (LU, 2014). O mecanismo de transferência de elétrons está relacionado com as duas cisteínas ativas separadas por um par de aminoácidos que formam um motivo conservado composto pela sequência Cys-Gly-Pro-Cys, também chamado de CXXC (LU; HOLMGREN, 2014). As duas cisteínas presentes no sítio ativo estão localizadas entre o final de uma fita- β (β 2) e o início de uma longa hélice (α 2), em uma volta que se projeta para fora do plano da proteína (TINKOV et al., 2018).

Desde sua descoberta, esta classe proteica tem sido bastante estudada, atualmente existem aproximadamente 200 estruturas diferentes de Trxs que estão disponíveis no banco de dados de proteínas (<http://www.pdb.org>), incluindo estruturas de Trx oxidadas e reduzidas de *E. coli* (JENG et al., 1994) e humana (Qin et al., 1994). Em geral, as estruturas de Trxs reduzidas e oxidadas são muito semelhantes, mas é reconhecido que a proteína sofre algumas mudanças

conformacionais após a redução, na região do sítio ativo, que inclui Cys32 e Cys35. O átomo de enxofre da cadeia lateral de Cys32 é inclinado para longe do Cys35 na forma reduzida da proteína para acomodar o aumento na distância S-S que ocorre após a redução do dissulfeto, mas os ângulos chi das duas cisteínas permanecem os mesmos. (JENG et al., 1994; BENHAR et al., 2018)

Diante dos importantes papéis desempenhados pelo sistema Trx nas vias relacionadas com a sobrevivência e virulência bacterianas, suas proteínas são apontadas como interessantes alvos para prospecção de novas drogas. Neste sentido, essa revisão tem por objetivo discutir as principais funções da tioredoxina bacteriana, seu papel no estresse oxidativo e sua participação na virulência em diferentes patógenos.

Estrutura e mecanismos de redução das tioredoxinas bacterianas

As atividades redutoras de tiol das tioredoxinas foram melhor caracterizada em *E. coli*, que possui duas tioredoxinas, Trx 1 e Trx 2 (COLLET; MESSENS, 2010), codificadas pelos genes *trxA* e *trxC*, respectivamente (VAZQUEZ et al., 2015). Em *E. coli*, uma série de características estruturais e regulatórias distinguem a subfamília Trx 2 da Trx 1. Trx 2 contém um domínio N-terminal adicional de 32 aminoácidos incluindo dois sítios adicionais Cys-X1-X2-Cys comparados com a Trx 1 (MILLER, et al., 2018). As quatro cisteínas de dois sítios Cys-X1-X2-Cys funcionam para coordenar o átomo de zinco (LU; HOLMGREN, 2014). Apesar das duas Trx de *E. coli* serem equivalentes em suas funções a regulação transcricional de *trxA* e *trxC* é diferente (VAZQUEZ et al., 2015). A Trx 1 de *E. coli* é uma proteína termoestável de baixo peso molecular (11,7-kDa) que possui um enovelamento característico, composto por uma folha- β central com 5 fitas flanqueadas por quatro α -hélices (Figura 1).

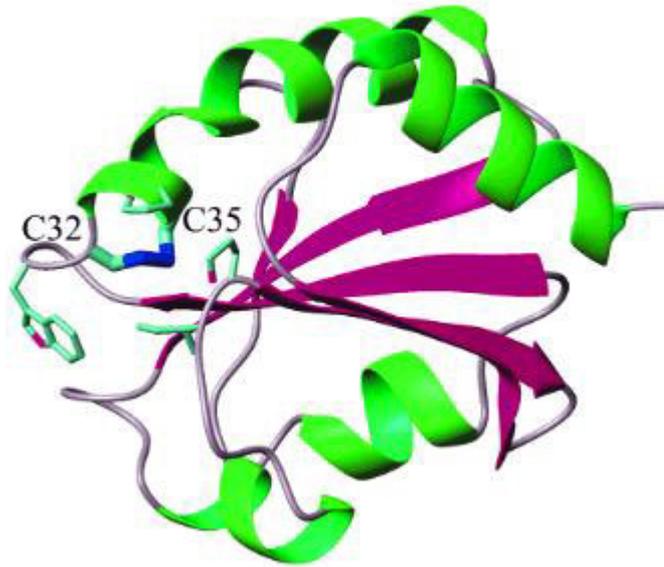


Figura 1. Tioredoxina 1 de *E. coli* composta por cinco folhas beta (roxo) rodeados por quatro α -hlices (verde). Ambas as cadeias principais e laterais dos dois resíduos de cisteínas (C32 e C35) que pertencem ao motivo CXXC. (Adaptado de BOLON e MAYO, 2001).

Em adição à sequência do sítio ativo, outros resíduos são altamente conservados: Asp-26, Ala-29, Trp-31, Asp-61, Pro-76 e Gli-92 (numeração referente à sequência de aminoácidos da tioredoxina de *E. coli*) (OUYANG et al., 2018). A Trx 1 de *E. coli* consiste no maior aminoácido com 219 resíduos em comparação a Trxs de outras espécies (Figura 2 e 3), se aproximando filogeneticamente com a *S. entérica* (Figura 1).



Figura 2. Análise filogenética entre Tiorredoxinas (Trx) de diferentes organismos através do software MEGA 7. Os códigos de acesso são fornecidos na Tabela 1.

BACTÉRIA	PROTEÍNA	CÓDIGO
<i>Escherichia coli</i>	Trx 1	CDU40139.1
<i>Escherichia coli</i>	Trx 2	KYV17452.1
<i>Homo sapiens</i>	Trx 1	AAF87085.1
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. Enterica</i> <i>sorovar typhimurium</i>	Trx 1	AQU54635.1
<i>Bacillus anthracis</i>	Trx 1	OON51246.1
<i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	Trx 1	KXN95430.1
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	Trx 1	OBY01352.1
<i>Helicobacter pylori</i>	Trx 1	BAW94521.1
<i>Mycobacterium leprae</i>	Trx	CAC30771.1

Tabela 1. Código de acesso das Trx de diferentes bactérias obtidas para alinhamento de sequência e árvore filogenética.

Trx 1 <i>E. coli</i>	MYMKSSNKLMLGIVFSIAVLIVIGTIVYSIINDKK---- <td>49</td>	49
Trx 2 <i>E. coli</i>	-----MVREHGV-----GVRRWTRR-----DLIAE	20
Trx <i>H. sapiens</i>	-----MVKQIESKTA	10
Trx <i>S. enterica</i>	-----MNTVCTHCQAINRIPDDRIEDAACKGRCGHDLFDGEVINATGE	43
Trx <i>B. anthracis</i>	-----MSDKIIHLTDD	11
Trx <i>M. tuberculosis</i>	-----MSDKIIHLTDD	11
Trx <i>S. aureus</i>	-----MSHYIELTEE	10
Trx <i>H. pylori</i>	-----MTDSEKSATIKVTDA	15
Trx <i>M. leprae</i>	-----MAIVKVTDA	9
Trx 1 <i>E. coli</i>	SL---GKDDAPVKVVEFGDFKCPACRTWDVTVLPRLKEEYIDKGGKQLYFINFPFIGKDS	106
Trx 2 <i>E. coli</i>	QL-NETINVNMVLVAFWASWCGPDRLFVP-TFHASSNKHSD-VVHL--NV-----D-	67
Trx <i>H. sapiens</i>	FQEALDAAGDKLVVVDFSATWCGPCKMIKP-FFHSLSEKYSN-VIFL--EV-----D-	58
Trx <i>S. enterica</i>	TL-DKLLKDDL PVVIDFWAPWCGPCRNFAP-IFEDVAQERSGKVRV--KV-----N-	91
Trx <i>B. anthracis</i>	SFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAP-ILDEIADEYQGKLTVA--KL-----N-	60
Trx <i>M. tuberculosis</i>	SFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAP-ILDEIADEYQGKLTVA--KL-----N-	60
Trx <i>S. aureus</i>	NFESTIK--KGVALVDFWAPWCGPCKMLSP-VVDELA SEYEGKAKIC--KV-----N-	57
Trx <i>H. pylori</i>	SFATDVLSSNKPVLVDFWATWCGPCKMVAP-VLEEIATERATDLTVA--KL-----D-	64
Trx <i>M. leprae</i>	DFDSKVE--SGVQLVDFWATWCGPCKMIAP-VLEELAADYEGKADIL--KL-----D-	56
	: : * * : . . : :	
Trx 1 <i>E. coli</i>	DLGAAAGEAIYKQDQDSFWIFDYDEIYQSQKKDTEEWITEELLLNIVKEKLPKIDVEQFKK	166
Trx 2 <i>E. coli</i>	-----	67
Trx <i>H. sapiens</i>	-----	58
Trx <i>S. enterica</i>	-----	91
Trx <i>B. anthracis</i>	-----	60
Trx <i>M. tuberculosis</i>	-----	60
Trx <i>S. aureus</i>	-----	57
Trx <i>H. pylori</i>	-----	64
Trx <i>M. leprae</i>	-----	56
Trx 1 <i>E. coli</i>	DLHSKEIKEKVRKSDRAQKLVQVQAPSVMV--NGNLANPDFDS-----LKKKIDKELKK	219
Trx 2 <i>E. coli</i>	-----TKAERQLALAAQIRSIPTLVAFKKGKPLLSQAGDLTPAV-PGYLVQIQIKA	116
Trx <i>H. sapiens</i>	-----VDDCQDVASECEVKCMTFQFFKKGQKVGFEFSGANK-EKLEATINELV--	105
Trx <i>S. enterica</i>	-----TEAERELSSRFGIRSIPTIMIFKNRQVVDMLNGAVPKAPFDSWLNESL--	139
Trx <i>B. anthracis</i>	-----IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA-	109
Trx <i>M. tuberculosis</i>	-----IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA-	109
Trx <i>S. aureus</i>	-----TDEQEELSAKFGIRSIPTLLF TKDGEVHQLVGVQTKVALKEQLNKL LG-	106
Trx <i>H. pylori</i>	-----VDTNPETARNFQVVS IPTLILFKDQGPVKRIVGAKGKAALLRELSDVV PN	114
Trx <i>M. leprae</i>	-----VDENPSTA AKYEVMSIPTLIVFKDQGPV D KVVGFQPKENLA E VLDKHL--	104
	: : * : . : . : :	
Trx 1 <i>E. coli</i>	-----	219
Trx 2 <i>E. coli</i>	FDVSDDGVPDEQV	130
Trx <i>H. sapiens</i>	-----	105
Trx <i>S. enterica</i>	-----	139
Trx <i>B. anthracis</i>	-----	109
Trx <i>M. tuberculosis</i>	-----	109
Trx <i>S. aureus</i>	-----	106
Trx <i>H. pylori</i>	LN-----	116
Trx <i>M. leprae</i>	-----	104

Figura 3. Alinhamento de sequência de Trxs de diferentes bactérias. Foi utilizado o software Clustal Ômega.

Os principais componentes do sistema Trx são as proteínas, as glutarredoxinas (Grxs), as dissulfeto isomerases e a quiescina-sulfidril oxidase, todas envolvidas nas reações de troca tiol-dissulfeto. Uma reação de troca tiol-dissulfeto é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular que envolve a transferência de elétrons da Trx para a proteína substrato (MOLDOGAZIEVA et al., 2018). A Trx utiliza suas cisteínas

nas posições 32 e 35 para essa reação. No primeiro passo desta reação, a cisteína N-terminal de Trx inicia um ataque nucleófilo à ligação dissulfeto da proteína substrato, resultando na formação de uma ligação dissulfeto mista entre Trx e a proteína substrato. O segundo passo é um ataque nucleofílico da cisteína C-terminal de Trx na ligação dissulfeto intermolecular intermediária, (LU et al., 2014; NIKKANEN et al., 2014). Trx é então reduzida pela Trx redutase, uma flavoproteína que utiliza o NADPH produzido principalmente pela via das pentoses fosfato como doador de elétrons (Figura 4).

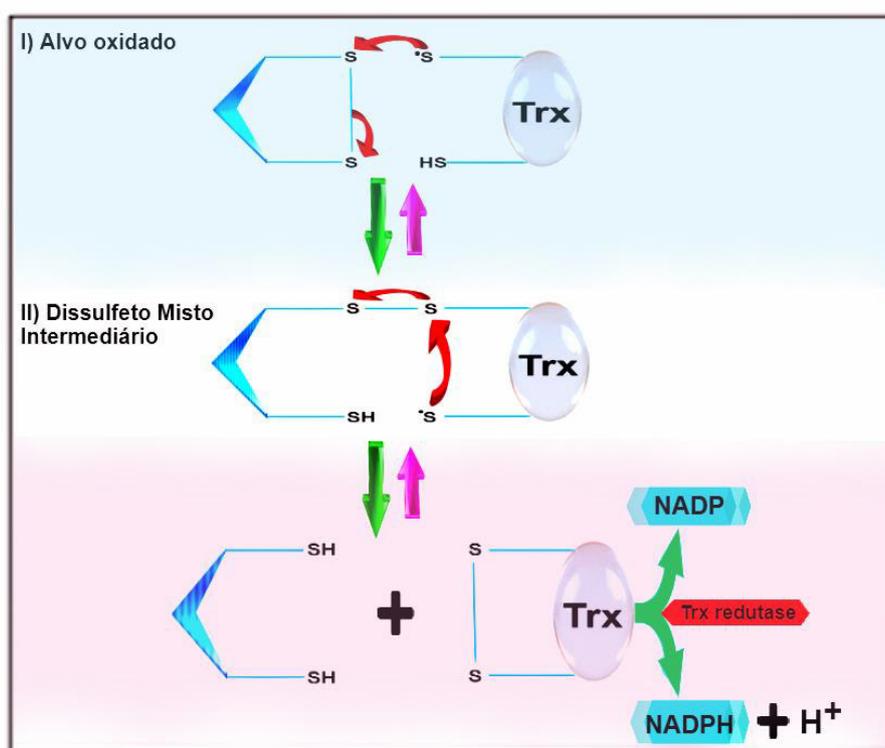


Figura 4. Mecanismo de redução de dissulfetos em proteínas pela Tioeredoxina (Trx). A proteína Trx possui as duas cisteínas do sítio ativo reduzidas, enquanto a proteína alvo encontra-se oxidada (com uma ponte dissulfeto). O ataque nucleofílico da cisteína 32 da Trx resulta na formação de um dissulfeto misto entre a proteína e a proteína alvo. Após esse processo ocorre o ataque nucleofílico da cisteína 35 à ligação dissulfeto mista, resultando na Trx oxidada e a proteína alvo. A Trx oxidada é novamente reduzida pela Trx redutase.

O papel das Trxs na resposta ao estresse oxidativo tem sido demonstrada em várias espécies bacterianas (AKAIKE, 2015), envolvidas no aumento a resistência ao estresse oxidativo (Maxime, 2017), aumento da sobrevivência (Grant & Hung, 2013), virulência (Bar-Or et al., 2015), motilidade bacteriana (Cheng et al., 2017) e evasão à fagocitose (Song et al., 2016).

A seguir serão discutidos os papéis das Trxs na virulência de algumas espécies bacterianas.

Ações das tioredoxinas de *E. coli*

A maioria das bactérias são equipadas com um tipo de sistema antioxidante eficaz. *E. coli* é uma das poucas que apresentam 3 sistemas de defesa antioxidante, a saber: tioredoxina, glutathione e catalase (VAZQUEZ et al., 2015). A Trx de *E. coli*, assim como em outros patógenos, desempenha um papel importante na maquinaria antioxidante da bactéria. Além disso, essa proteína participa da redução de várias enzimas, doadores de hidrogênio a ribonucleotídeos (LU et al., 2014). Além de cumprir um papel importante na síntese de DNA e reparo de proteínas na formação do DNA (VAZQUEZ et al., 2015).

Evidências indicam que a Trx extracelular de mamíferos na sua forma reduzida promove a ativação do receptor de potencial transitório canônico 5 (TRPC5) (XU et al., 2008), expresso em células neuronais e não neuronais (COSENS, D. J.; MANNING, A, 1969). Isso ocorre pela habilidade da Trx reduzida de quebrar as pontes dissulfeto presentes nos resíduos cisteína deste receptor (FUJIMOTO et al., 2018). Apesar de não existirem relatos de qual forma a Trx derivada de bactérias pode interagir com o TRPC5, estudo recente realizado por Pereira e colaboradores (2018), demonstrou que a Trx 1 de *E. coli* ativa este receptor em camundongos com resposta inflamatória sistêmica induzida por LPS. O mesmo estudo demonstrou que a Trx 1 de *E. coli* também exerce efeitos através de outro receptor da mesma família, conhecido como TRPC4. Atuando nestes alvos, esta proteína bacteriana modula o acúmulo de leucócitos, a fagocitose mediada por macrófagos, a temperatura corporal e a produção de mediadores inflamatórios, em animais estimulados com LPS. Estes dados sugerem que os receptores TRPC4 e TRPC5 participam como mecanismos adicionais pelos quais bactérias exercem virulência.

Em bactérias alguns fatores de virulência são ativados por sistemas que envolvem ligações dissulfeto. Uma via de ativação de fatores de virulência é a via de dobramento oxidativo periplasmático (Dsb) a qual exerce um papel chave na virulência bacteriana (HERAS et al., 2009). O Dsb é essencial para a montagem de adesinas na célula hospedeira (JACOB-DUBUISSON et al., 1994), toxinas (WÜLFING et al., 1997), sistemas de secreção tipo III (MIKI et al., 2008), aumento da

motilidade (DAILEY et al., 1993), entre outros. Cepas bacterianas sem enzimas Dsb são viáveis, mas não patogênicas (TOTSIKA et al., 2009), fornecendo prova de que esse sistema pode ser uma estratégia viável na terapia antivirulência. O sistema dobramento periplasmático em *E. coli* K12 compreende duas enzimas DsbA e DsbB. O DsbA de *E. coli* (EcDsbA) (BARDWELL et al., 1993) introduz ligações dissulfeto em fatores de virulência através da reação nucleofílica bimolecular. O EcDsbA é então reoxidado pela ação da proteína de membrana EcDsbB. Devido à similaridade entre os sítios ativos conservados de Trx e EcDsbA (CXXC), estudos estão sendo conduzidos com peptídeos derivados de EcDsbB que possam inibir a porção ativa das Trx e conseqüentemente em EcDsbA, impedindo assim a ativação de fatores de virulência. Portanto, estudos conduzidos com Trx podem ainda ajudar a elucidar outras vias de ativação de mecanismos de virulência, dessa forma fica evidente que a melhor compreensão das ações dessas proteínas antioxidantes derivadas de bactérias pode ajudar os cientistas na busca de novos fármacos (DUPREZ et al., 2014).

Tioredoxinas de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria microaerofílica Gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica e é o agente causador de úlceras pépticas e gastrite crônica (SHI et al., 2018). Essa bactéria está cronicamente em contato com uma matriz de EROS durante a colonização devido à resposta inflamatória do hospedeiro. No entanto, ela é capaz de produzir enzimas e proteínas que em conjunto são capazes de combater o estresse oxidativo na célula (PESCI et al., 1994). Destaca-se a capacidade de *H. pylori* de produzir a Trx, principalmente a codificada pelo gene *trxA*, a qual é expressa em maiores quantidades como resposta a agentes estressantes (BAKER et al., 2001). Vários estudos têm relacionado à capacidade dessa bactéria de usar a Trx como um fator de virulência (SHI et al., 2013; LIU et al., 2016).

A Trx produzida pela *H. pylori*, está envolvida no desenvolvimento de carcinogênese gástrica em estudos *in vitro*. Shi e colaboradores mensuraram a expressão de Trx1, detectando uma superexpressão no carcinoma gástrico. Além disso, a alta expressão de Trx1 induziu significativamente a apoptose celular, diminuiu a expressão de ciclina D1, uma proteína necessária para a progressão

através da fase G1 do ciclo celular. Esses resultados indicam que a alta expressão de Trx em *H. pylori* está associada com carcinogênese gástrica (SHI et al., 2013). Para estudar alterações histopatológicas da mucosa do estômago *in vivo* o mesmo grupo avaliou a expressão de Trx1 em modelos de gerbilo da Mongólia. Notavelmente, a alta expressão de Trx1 em *H. pylori* promoveu a carcinogênese do estômago (LIU et al., 2016)

Foi também demonstrado que a Trx de *H. pylori* é capaz de reduzir as moléculas de mucina à sua forma monomérica diminuindo a viscosidade da mucina e permitindo que o organismo colonize bem, facilitando a migração para a superfície epitelial (WINDLE et al., 2000). Neste sentido, a deleção dos genes *trxA* ou *trxC* em *H. pylori* prejudica a capacidade do organismo de colonizar o estômago (KUHNS et al., 2015)

Tioredoxinas do gênero *Mycobacterium*

A tuberculose (TB) em humanos e outros mamíferos é causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) (FORRELLAD et al., 2013). De todos os membros do CMtb, *M. tuberculosis* (Mtb) é a mais estudado infectando cerca de um terço da população humana e podendo também infectar animais em contato com humanos. Essa doença é considerada um grave problema de saúde pública (ZUMLA et al., 2015). Apesar de estar exposto a numerosos estresses oxidativos e nitrosativos, *M. tuberculosis* é capaz de persistir e proliferar através de vários sistemas de defesa antioxidante (KUMAR et al., 2011). Notavelmente, esses sistemas de defesa antioxidante em *M. tuberculosis* levaram ao aumento da resistência ao esquema de tratamento (SHERMAN et al., 1996). Para garantir sua virulência e resistência (principalmente a isoniazida), *M. tuberculosis* desenvolveu um sistema alternativo de peroxidase, incluindo a subunidade alquil hidroperóxido redutase C (AhpC) a qual é dependente do sistema Trx. Esse sistema tem sido essencial para a proteção da bactéria contra o H₂O₂. Além disso, foi identificado os aminoácidos envolvidos na interação TrxC e AhpC que é essencial para o mecanismo de virulência da bactéria e que fornece não apenas um novo epítipo para o planejamento de fármacos, mas também elucidada a transferência de elétrons de TrxC para as cisteínas catalíticas de AhpC. (WONG et al., 2017)

A virulência de *Mycobacterium leprae* também tem sido relacionado ao sistema Trx. Essa bactéria abriga um gene híbrido tiorredoxina-tiorredoxina redutase que aumenta a sobrevivência intracelular de *M. leprae* (WIELES et al. 1997). O gene que codifica o *M. leprae* TR-Trx foi clonado na bactéria não patogênica de crescimento rápido *Mycobacterium smegmatis*. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o sistema Trx de *M. leprae* pode inibir a morte de bactérias intracelulares dependente de oxigênio e, portanto, pode representar um dos mecanismos pelos quais essa bactéria pode evadir o estresse oxidativo em fagócitos mononucleares humanos (WIELES et al. 1997).

Tioredoxina de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é capaz de causar uma variedade de doenças, variando de erupções cutâneas leves a infecções potencialmente fatais (FEY et al., 2013). *S. aureus* é comum tanto na comunidade como em ambientes hospitalares e tem a capacidade de colonizar transitoriamente a pele e as membranas mucosas da maioria dos seres humanos, sem ser notado ou com características clínicas moderadas (PROCTOR, 2012).

A sobrevivência de um patógeno versátil como *S. aureus* requer que ele combata eficazmente os perigos ambientais, bem como os efeitos da resposta imune inata e adaptativa (VILLANUEVA et al., 2016). Entre os importantes sensores ambientais que respondem ao estresse oxidativo e tiol, destaca-se o Spx. Acredita-se que o Spx interage com o RNA polimerase (RNAP) ativando a transcrição (NAKANO et al., 2010). Esse regulador também está envolvido em muitas respostas ao estresse em *S. aureus*, incluindo respostas a antibióticos. Como *trxA* e *trxB* são transcricionalmente regulados por Spx, esse regulador é chave no aumento da resistência da bactéria ao estresse oxidativo provocada pelo hospedeiro e a resistência ao antibiótico rifampicina (VILLANUEVA et al., 2016).

Tioredoxinas de *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis, o agente causador do antraz, é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos (PILO et al., 2018). Durante o curso de uma infecção, os esporos de *B. anthracis* crescem dentro dos macrófagos, e as células vegetativas rapidamente se dividem no hospedeiro, atingindo altas concentrações no sangue

durante a doença (MA et al., 2013). Isso implica que a bactéria precisa de sistemas eficientes para a síntese de desoxirribonucleotídeos para replicação e reparo de DNA. Além disso, há a necessidade de proteção contra o estresse oxidativo imposto pelo sistema imune do hospedeiro (GUSTAFSSON et al., 2016). Estudos apontam que o sistema Trx em *B. anthracis* pode ser essencial para seu crescimento e virulência, principalmente em bactérias que carecem do sistema GSH, como, por exemplo, *B. anthracis*. Gustafsson e colaboradores demonstraram que o *B. anthracis* possui um sistema de Trx sendo o principal mecanismo antioxidante bacteriano e que Trx1 é um doador de elétrons fisiologicamente relevante para ribonucleotídeo redutase (RNR) (GUSTAFSSON et al., 2012).

Tioredoxinas do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* também utiliza o sistema antioxidante como um fator de virulência é a, principalmente ao reduzir o ambiente dos fagolisossomos, de fato, a produção de EROS nos fagocitos é essencial para a defesa do hospedeiro contra salmonelose, como demonstrado pela prevalência de infecções por *Salmonella* ssp. em pacientes com doença granulomatosa crônica portadores de mutações autossômicas ou ligadas ao X nos componentes citossólicos e de membrana desse complexo enzimático (MOUY et al., 1989)

Dentre a maquinaria antioxidante dessas bactérias as Trx desempenham um papel importante. A Trx-1 aumenta a viabilidade da *Salmonella* em um modelo murino de salmonelose, mas não parece proteger esse enteropatógeno da morte com H₂O₂ (BJUR et al., 2006). Além disso, a Trx-1 defende a *Salmonella* do estresse oxidativo resultante da expressão do NADPH oxidase em macrófagos durante a resposta imune inata em camundongos (BOGOMOLNAYA et al., 2013; DE GROOTE et al., 1997; SONG et al., 2013). Dentre os mecanismos propostos, estudos sugerem que essa proteína se liga e estabiliza o regulador transcricional SsrB ajudando essa bactéria a sobreviver à atividade antimicrobiana do NADPH oxidase ativado durante a resposta imune inata em macrófagos primários e ratos (SONG et al., 2016).

Salmonella enterica sorovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) é um patógeno entérico intracelular facultativo que tradicionalmente tem sido usado como organismo modelo para o estudo da febre tifoide causada pelo sorotipo Typhi adaptado para humanos (MASTROENI; SHEPPARD, 2004) O genoma anotado de

S. typhimurium contém homólogos dos genes que codificam os sistemas glutatona/glutaredoxina e tioredoxina de *E. coli* (SARKHEL et al., 2017), a saber tioredoxina (*trxA*, codificando tioredoxina 1; *trxC*, codificando tioredoxina 2; *trxB*, codificando tioredoxina redutase), γ -glutamilcisteína sintetase (*gshA*), glutaredoxina 1 (*grxA*), e oxidoreductase periplasmica DsbC (*dsbC*), o que implica que as vias redox que operam em *E. coli* também podem funcionar em salmonelas para fornecer proteção contra o estresse oxidativo. Cepas mutantes para esses genes mostraram uma sensibilização ao estresse oxidativo *in vitro* e diminuição da replicação intracelular em células epiteliais semelhantes a macrófagos e com virulência drasticamente diminuída em camundongos BALB/c (BJUR et al., 2006).

Dessa forma, a *trx* derivada de diferentes bactérias têm contribuído com diferentes ações, contribuindo para a resistência ao estresse oxidativo, antibióticos, proteção e sobrevivência da bactéria no ambiente oxidantes de fagócitos (Figura 5)

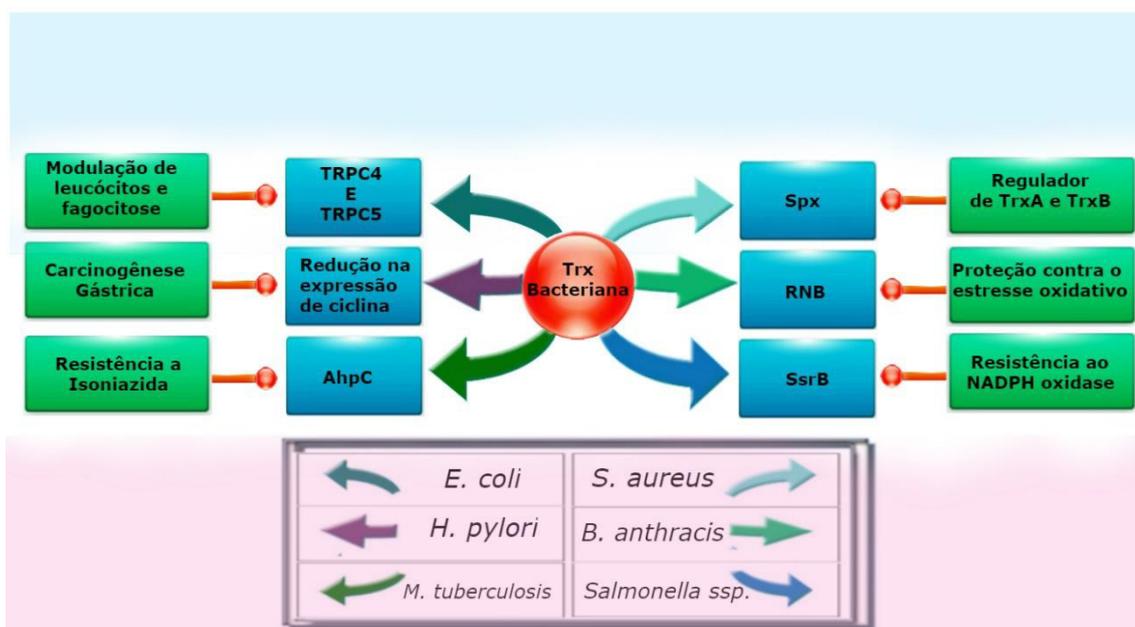


Figura 5. Diferentes funções das Trx bacterianas. Trx derivada de *E. coli* ativa os receptores TRPC4/TRPC5 modulando o acúmulo de leucócitos, a fagocitose mediada por macrófagos. A alta expressão de Trx1 de *H. pylori* induziu significativamente a apoptose celular e diminuiu a expressão de ciclina induzindo a carcinogênese gástrica. A Trx de *M. tuberculosis* é auxiliadora nos eventos redutores das enzimas peroxidases envolvidas na resistência a antibióticos. A produção de Trxs em *S. aureus* é via regulador transcricional. A Trx derivada de *B. anthracis* é doadora de elétrons para o ribonucleotídeo redutase, uma enzima que catalisa a formação de deoxirribonucleotídeos dos ribonucleotídeos. A Trx de *Salmonella ssp.* se liga e estabiliza o regulador transcricional SsrB ajudando essa bactéria a sobreviver à atividade antimicrobiana do NADPH oxidase.

Tioredoxina como alvo farmacológico

A resistência aos antimicrobianos é uma preocupação de saúde pública cada vez mais importante, levando ao aumento da mortalidade, morbidade e custo dos cuidados para os pacientes afetados. Assim, a descoberta de novos alvos farmacológicos contra patógenos resistentes a drogas é oportuna e de extrema importância (MAY et al., 2018).

O sistema Trx pode ser considerado um importante fator de virulência, portanto, a comunidade científica tem estudado essa proteína como um potencial alvo terapêutico (MAY et al., 2018). As bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR), como, por exemplo, *E. coli* são responsáveis pela maioria das infecções fatais, e o desenvolvimento de novos antibióticos é, portanto, de grande importância (ZOU et al., 2017).

Ebselen (2-fenil-1,2-benzóiselenazol-3 (2H) -ona) é uma droga organosselênica que age como um antioxidante e um agente anti-inflamatório devido à sua atividade semelhante à peroxidase da GSH (Figura 6) (MULLER et al., 1984 ; SCHEWE, 1995), e é um potente inibidor da TrxR bacteriana através de sua ligação ao resíduo C-terminal de cisteína no sítio ativo (LU et al., 2013). Esse fármaco tem sido usado em testes de fase clínica III contra derrame isquêmico por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SCHEWE, 1995).

A combinação de íons de prata e Ebselen leva a uma rápida depleção de glutatona e do sistema Trx em *E. coli* (REN et al., 2018). Estudos *in vivo* verificaram a eficácia bactericida de Ebselen em animais com peritonite leve e aguda causada por *E. coli*. Estes resultados demonstram que os sistemas redox dependentes de tiol em bactérias podem ser direcionados no projeto de novas drogas antibacterianas (ZOU et al., 2017).

A participação de Trx1 na patogênese de *H. pylori* tem levado a prospecção de novos inibidores desta proteína. De fato, o Ebselen novamente ganha destaque, principalmente no combate de patógenos que dependem do sistema de Trx para manter o equilíbrio tiol/ dissulfeto na célula. Ebselen e seu análogo de enxofre Ebsulfur são bactericidas para patógenos GSH-negativos (LU et al., 2013). Ebsulfur foi capaz de inibir uma cepa *H. pylori* clinicamente isolada, ao inibir a TrxR e subsequente bloqueio da transferência de elétrons, resultando na morte bacteriana (LU et al., 2013).

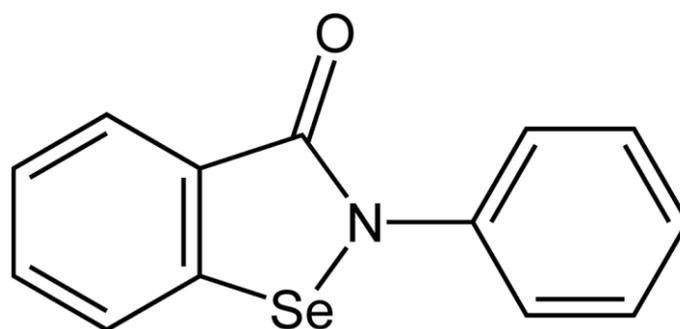


Figura 6. Estrutura química do Ebselen (PubChem Cid: 3194)

Outro exemplo de fármaco que vem sendo estudado é a Auranofina, um composto contendo ouro aprovado pela FDA usado para o tratamento da artrite reumatoide (RAMIRO et al., 2014) (Figura 8). A auranofina é um composto organofílico, lipofílico, oralmente disponível que interage com o resíduo de selenocisteína dentro do domínio redox-ativo da tioredoxina redutase mitocondrial (TrxR), bloqueando assim a atividade da TrxR (MAY et al., 2016). Trabalhos recentes de atividade antimicrobiana contra protozoários e bactérias também mostraram inibição da tioredoxina redutase (TrxR) (KENGEN et al., 2018). Owings e colaboradores avaliaram esse composto contra cepas de *H. pylori* obtendo resultados promissores (OWINGS et al., 2016). Estudos bioquímicos mostraram que a Auranofina inibe a tioredoxina redutase bacteriana, uma proteína essencial em muitas bactérias Gram-positivas para manter o equilíbrio tiol-redox e proteger contra espécies oxidativas reativas. A Auranofina diminui a capacidade de redução das bactérias alvo, sensibilizando-as para o estresse oxidativo, inclusive sendo eficiente em cepas resistentes à Meticilina. Estes achados sugerem que a cascata redox mediada por tioredoxina de agentes patogênicos Gram-positivos é um alvo válido para o desenvolvimento de drogas antibacterianas, e que a Auranofina, agente clínico existente, pode ser reutilizado para ajudar no tratamento de vários agentes patogênicos resistentes aos antibióticos importantes (HARBUT et al., 2015). Além disso, esse fármaco também apresenta atividades bactericidas potentes contra *M. tuberculosis* (KOHANSKI et al., 2010).

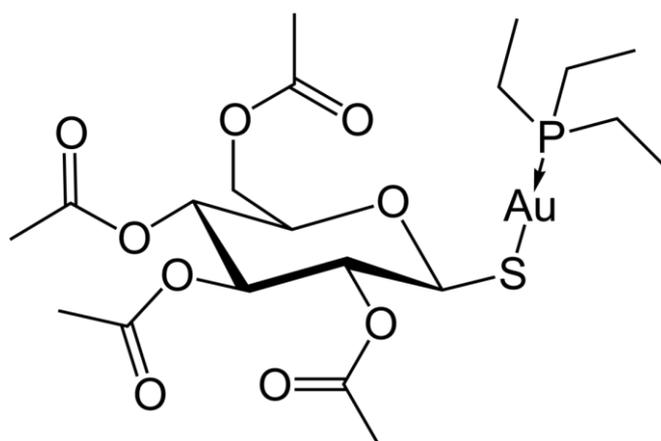


Figura 7. Estrutura química da Auranofina um inibidor do sistema Trx (PubChem CID: 16667669).

O desenvolvimento de novos fármacos para combater bactérias multirresistentes (MRD) vem ganhando destaque. Liang et al (2016) mostraram que o chá verde rico em Epigallocatequina 3-galato (EGCG) pode reduzir a produção de Trx para algumas espécies diferentes de bactérias. Neste estudo, o efeito do chá verde comercialmente disponível e EGCG foram testadas contra *E. coli* e *S. aureus*, os resultados mostraram uma diminuição no crescimento nas duas espécies, demonstrando não apenas a importância da Trx para o crescimento das bactérias estudadas, mas também a ação anti-Trx da EGCG presente no chá verde, tornando-se um potencial inibidor dessa proteína antioxidante (Liang et al., 2016).

Outros compostos que são usados como agente antibacteriano há séculos são os derivados de prata, no entanto, seus mecanismos nunca foram bem compreendidos (Zou et al., 2017). Liao e colaboradores demonstraram que os íons de prata se ligam aos sítios ativos de TrxR e Trx em *S. aureus*, ocasionando à oligomerização e à ruptura funcional de TrxR, bem como Trx. Além disso, a prata também esgotou os níveis de tiol intracelular em *S. aureus*, interrompendo a homeostase bacteriana tiol-redox (Liao et al., 2017). Dessa forma, o sistema Trx e TrxR pode servir como um alvo viável para o design de drogas antibacterianas.

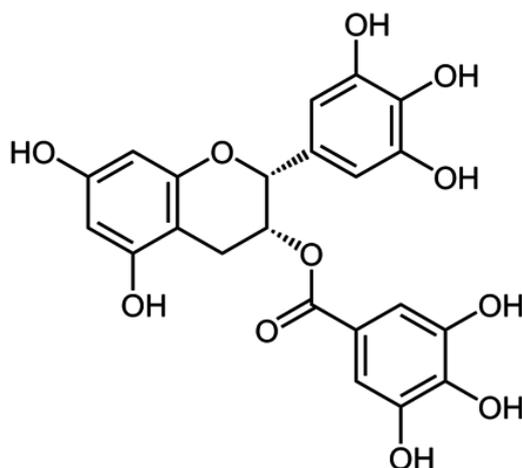


Figura 8. Estrutura química do EGCG (PubChem CID: 65064)

Tioredoxina bacteriana x Tioredoxina Humana

De forma geral os aspectos de enovelamento das Trx humanas e bacterianas são iguais, no entanto, diferenças em relação as isoformas oxidadas e reduzidas podem ser observadas. Uma maior distância foi observada na ligação S-S da isoforma reduzida de Trx derivada de *E. coli* ($3.82 \pm 0.18 \text{ \AA}$) quando comparada a humana ($3.1 \pm 0.2 \text{ \AA}$) (LU; HOLMGREN, 2014). Em mamíferos, existem duas isoformas de TRX, uma encontrada principalmente no citosol (TRX1) e a isoforma mitocondrial (TRX2) (Para revisão ver: LEE et al., 2012). As ações dessa proteína em doenças infecciosas parecem ainda não ser bem compreendidas. Em 2003, foi demonstrado que camundongos transgênicos com super expressão de Trx encontram-se protegidos contra o dano hepático causado pelo tratamento com LPS. Esse mecanismo protetor parece estar relacionado com a capacidade da TRX em interferir com vias de sinalização associadas à apoptose hepática via citocromo c (OKUYAMA et al., 2003). Trx também parece estar relacionada ao aumento da resistência do hospedeiro ao LPS, e sua expressão encontra-se aumentada em diversos órgãos (coração, pulmão e fígado) em camundongos tratados com LPS (SANO et al., 2002). Por outro lado, estudos recentes demonstraram que bactérias do tipo *Streptococcus* sp são capazes de utilizar a Trx produzida pelo hospedeiro para evadir a fagocitose, via inibição da clivagem e produção de complemento C3a (MA et al., 2012). Além disso, como já foi destacado a Trx derivada de bactérias contribui para a sua virulência (CHENG et al., 2017), resistência ao estresse oxidativo (SHI et al., 2013; LIU et al., 2016; KUMAR et al., 2011.), ativação de outros

sistemas antioxidantes (VILLANUEVA et al., 2016), aumento da motilidade bacteriana (SONG et al., 2016), entre outros. Em conjunto, essas informações indicam um paradigma no qual i) a TRX produzida pelo hospedeiro poderia “proteger” o organismo contra uma resposta exacerbada à infecção causada por produtos bacterianos e ii) a TRX produzida por ambos o hospedeiro e a bactéria, facilitaria a proliferação bacteriana. Dessa forma, mais estudos são necessários com o objetivo de elucidar melhor o papel das Trx de diferentes espécies.

CONCLUSÃO

Em resumo, os patógenos possuem uma diversidade de sistemas antioxidantes, que coordenam a remoção de EROS e RNS, dentre os quais podemos destacar o sistema Trx. Esse sistema é capaz de reduzir substratos através da quebra de ligações dissulfeto, fornecendo elétrons a uma ampla gama de enzimas e proteínas, auxiliando no enrolamento e formação de proteínas oxidativas, além disso, desempenha um papel chave na síntese de DNA e defesas contra agentes oxidantes. Esse sistema pode proteger diversos microrganismos contra o ambiente oxidante de fagócitos, proporcionar motilidade bacteriana, auxiliar na evasão à fagocitose, além de cumprir um papel importante na síntese de DNA e reparo de proteínas. Por conseguinte, esse sistema pode ser considerado um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Diversos fármacos já aprovados por órgãos reguladores para uso em diversas doenças têm sido usados com o objetivo de inibir o sistema Trx em doenças infecciosas, destaca-se os íons de prata, derivados do ouro, como a Auranofina, Ebselen, entre outros. Todos esses fármacos apresentaram relevante inibição do sistema Trx, mostrando um potencial alternativa terapêutica, tendo em vista a frequente multi resistência das bactérias a diferentes antibióticos, além disso, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é demorado e caro, mas a reutilização de drogas previamente testadas e/ou aprovadas como agentes terapêuticos antimicrobianos pode ser uma alternativa potencialmente útil.

REFERÊNCIAS

AKAIKE, T. Host defense and oxidative stress signaling in bacterial infection. *Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology*, v. 70, n. 3, p. 339-349, 2015.

BAGCHI, D.; Bhaitacharya, G.; Stohs, S. J. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. *Free radical research*, v. 24, n. 6, p. 439-450, 1996.

BAKER, L. M. S. et al. Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from *Helicobacter pylori*: genetic and kinetic characterization. *Journal of bacteriology*, v. 183, n. 6, p. 1961-1973, 2001.

BALK, R. A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) Where did it come from and is it still relevant today?. *Virulence*, v. 5, n. 1, p. 20-26, 2014.

BARDWELL, J. et al. A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 3, p. 1038-1042, 1993.

BAR-OR, D. et al. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: are there clues to better treatment?. *Redox Report*, v. 20, n. 5, p. 193-197, 2015.

BENHAR, M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018.

BJUR, E. et al. Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity*, v. 74, n. 9, p. 5140-5151, 2006.

BRUNKHORST, F. M.; GASTMEIER, P.; ABU, M. S. Current aspects of the definition and diagnosis of sepsis and antibiotic resistance. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 2018.

CHENG, C. et al. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 287, 2017.

COHEN, J. et al. Sepsis: a roadmap for future research. *The Lancet infectious diseases*, v. 15, n. 5, p. 581-614, 2015.

COLLET, J.; MESSENS, J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants & redox signaling*, v. 13, n. 8, p. 1205-1216, 2010.

COSENS, D. J.; MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, v. 224, n. 5216, p. 285, 1969.

DAILEY, F. E.; BERG, H. C. Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 3, p. 1043-1047, 1993.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive care medicine**, v. 39, n. 2, p. 165-228, 2013.

DUPREZ, Wilko et al. Peptide inhibitors of the *Escherichia coli* DsbA oxidative machinery essential for bacterial virulence. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 2, p. 577-587, 2014.

FEY, P. D. et al. A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. **MBio**, v. 4, n. 1, p. e00537-12, 2013.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

GUSTAFSSON, T. N. et al. *Bacillus anthracis* thioredoxin systems-characterization and role as electron donors for ribonucleotide reductase. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M112. 413427, 2012.

GUSTAFSSON, T. N. et al. Ebselen and analogs as inhibitors of *Bacillus anthracis* thioredoxin reductase and bactericidal antibacterials targeting *Bacillus* species, *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 6, p. 1265-1271, 2016.

HARBUT, M. B. et al. Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 14, p. 4453-4458, 2015.

HERAS, B. et al. DSB proteins and bacterial pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 215, 2009.

JACOB-DUBUISSON, F. et al. PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 24, p. 11552-11556, 1994.

JENG M. F. et al. High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. **Structure** 2: 853–868, 1994.

KENGEN, J. et al. Biomarkers of tumour redox status in response to modulations of glutathione and thioredoxin antioxidant pathways. *Free radical research*, v. 52, n. 2, p. 256-266, 2018.

KIANG, J. G. et al. Wound trauma increases radiation-induced mortality by activation of iNOS pathway and elevation of cytokine concentrations and bacterial infection. **Radiation research**, v. 173, n. 3, p. 319-332, 2009.

KIANG, J. G.; GARRISON, B. R.; GORBUNOV, N. V. Radiation combined injury: DNA damage, apoptosis, and autophagy. **Armed forces radiobiology research inst bethesda md**, 2010.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423, 2010.

KUMAR, A. et al. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control?. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, 2011.

LIANG, W. et al. Bacterial thioredoxin and thioredoxin reductase as mediators for epigallocatechin 3-gallate-induced antimicrobial action. **The FEBS journal**, v. 283, n. 3, p. 446-458, 2016.

LIAO, X. et al. Targeting the thioredoxin reductase–thioredoxin system from *Staphylococcus aureus* by silver ions. **Inorganic chemistry**, v. 56, n. 24, p. 14823-14830, 2017.

Lillig, Christopher Horst; Holmgren, Arne. Thioredoxin and related molecules—from biology to health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, v. 9, n. 1, p. 25-47, 2007.

LIU, L. et al. *Helicobacter pylori* with high thioredoxin-1 expression promotes stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, v. 40, n. 4, p. 480-486, 2016.

LU, J. et al. Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 4, p. 1394-1403, 2013.

LU, J.; Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75-87, 2014.

MA, Y. et al. In vitro and in vivo activities of recombinant anthrax protective antigen co-expressed with thioredoxin in *Escherichia coli*. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 9, n. 11, p. 2371-2377, 2013.

MAXIME, J. J et al. Enzimas de defesa microbiana antioxidante. **Patogênese Microbiana**, 2017.

MAY, H. C. et al. Repurposing Auranofin, Ebselen, and PX-12 as Antimicrobial Agents Targeting the Thioredoxin System. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 336, 2018.

MIKI, T. et al. DsbA directs efficient expression of outer membrane secretin EscC of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion apparatus. **Microbial pathogenesis**, v. 44, n. 2, p. 151-158, 2008.

MILLER, C. G. et al. NADPH-dependent and-independent Disulfide Reductase Systems. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.

MOLDOGAZIEVA, N. T. et al. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. **Free radical research**, v. 52, n. 5, p. 507-543, 2018.

MOUY, R. et al. Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. **The Journal of pediatrics**, v. 114, n. 4, p. 555-560, 1989.

NIKKANEN, L.; RINTAMÄKI, E. Thioredoxin-dependent regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, p. 20130224, 2014.

NOUBADE, R. et al. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. **Nature**, v. 509, n. 7499, p. 235, 2014.

NOZAWA, R.; YOKOTA, T.; FUJIMOTO, T. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the selenium-containing compound 2-phenyl-1, 2-benzoisoselenazol-3 (2H)-one (PZ51). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 33, n. 8, p. 1388-1390, 1989.

OUYANG, Y. et al. Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Metallomics**, v. 10, n. 2, p. 218-228, 2018.

OWINGS, J. P. et al. Auranofin and N-heterocyclic carbene gold-analogs are potent inhibitors of the bacteria *Helicobacter pylori*. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 14, p. fnw148, 2016.

PERL, M. et al. Role of programmed cell death in the immunopathogenesis of sepsis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 4, n. 4, p. 223-230, 2007.

PESCI, E. C.; PICKETT, C. L. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. **Gene**, v. 143, n. 1, p. 111-116, 1994.

PILO, P.; FREY, J. Patogenicidade, genética de populações e disseminação de *Bacillus anthracis*. *Infecção*, **Genética e Evolução**, 2018.

PLEVIN, R.; CALLCUT, R. Update in sepsis guidelines: what is really new? **Trauma Surgery & Acute Care Open**, v. 2, n. 1, p. e000088, 2017.

PROCTOR, R. A. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 8, p. 1179-1186, 2012.

QIN, C. G. M.; GRONENBORN, A. M. The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. **Structure** 2: 503–522, 1994.

RAMIRO, S. et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 3, p. 529-535, 2014.

REN, X. et al. Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

VAZQUEZ, D.; MARIA D. J.; SANTOS, J. Thioredoxin from *Escherichia coli* as a role model of molecular recognition, folding, dynamics and function. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 9, p. 801-815, 2015.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen—an antiinflammatory antioxidant. *General Pharmacology*: **The Vascular System**, v. 26, n. 6, p. 1153-1169, 1995.

SHERMAN, D. R. et al. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1641-1643, 1996.

SHI, Y. Y. et al. Cloning of the *Helicobacter pylori* thioredoxin-1 gene and characterization. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban. Journal of Peking University. Health sciences*, v. 46, n. 2, p. 190-194, 2014.

SHI, Y. et al. Cellular stress and redox activity proteins are involved in gastric carcinogenesis associated with *Helicobacter pylori* infection expressing high levels of thioredoxin-1. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 19, n. 10, p. 750-763, 2018.

SHI, Y. et al. The involvement of *Helicobacter pylori* thioredoxin-1 in gastric carcinogenesis. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1226-1234, 2013.

SONG, M. Y.; MAKINO, A.; YUAN, J. X. J. Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1549-1565, 2011.

SONG, M. et al. Antioxidant defense by thioredoxin can occur independently of canonical thiol-disulfide oxidoreductase enzymatic activity. **Cell reports**, v. 14, n. 12, p. 2901-2911, 2016.

SONG, M. et al. Low-molecular-weight thiol-dependent antioxidant and antinitrosative defences in *Salmonella* pathogenesis. **Molecular microbiology**, v. 87, n. 3, p. 609-622, 2013.

STAERCK, C. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 56-65, 2017.

STEWART, E. J., ASLUND, F.; BECKWITH, J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. **The EMBO journal** 17, 5543–5550 (1998).

TINKOV, A. A. et al. The role of the thioredoxin/thioredoxin reductase system in the metabolic syndrome: towards a possible prognostic marker?. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-20, 2018.

TOTSIKA, M. et al. Characterization of two homologous disulfide bond systems involved in virulence factor biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 12, p. 3901-3908, 2009.

VILLANUEVA, M. et al. Rifampin resistance *rpoB* alleles or multicopy thioredoxin/thioredoxin reductase suppresses the lethality of disruption of the global stress regulator *spx* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 198, n. 19, p. 2719-2731, 2016.

WANG, G. E.; ALAMURI, P.; MAIER, R. J. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 4, p. 847-860, 2006.

WIELES, B. et al. Increased intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis* containing the *Mycobacterium leprae* thioredoxin-thioredoxin reductase gene. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2537-2541, 1997.

WONG, C. F. et al. AhpC of the mycobacterial antioxidant defense system and its interaction with its reducing partner Thioredoxin-C. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 5159, 2017.

WÜLFING, C.; RAPPUOLI, R. Efficient production of heat-labile enterotoxin mutant proteins by overexpression of *dsbA* in a *degP*-deficient *Escherichia coli* strain. **Archives of microbiology**, v. 167, n. 5, p. 280-283, 1997.

XU et al. TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. **Nature**; 2008; 451: 69-72.

ZOU, Lili et al. Synergistic antibacterial effect of silver and ebselen against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **EMBO molecular medicine**, v. 9, n. 8, p. 1165-1178, 2017.

ZUMLA, A. et al. The WHO 2014 global tuberculosis report—further to go. **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 1, p. e10-e12, 2015.

INTRUÇÕES DE SUBMISSÃO: Critical Reviews in Microbiology

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

About the Journal

Critical Reviews in Microbiology is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Critical Reviews in Microbiology accepts the following types of article: review articles.

Peer Review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be double blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper.

A typical paper for this journal should be no more than 7000 words, inclusive of the abstract, tables, footnotes, endnotes.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where “a quotation is ‘within’ a quotation”. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A [LaTeX template](#) is available for this journal. Please save the LaTeX template to your hard drive and open it, ready for use, by clicking on the icon in Windows Explorer.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Checklist: What to Include

Author details. Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).

Should contain an unstructured abstract of no more than 200 words.

Graphical abstract (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract.

You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.](#)

No more than 5 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.

Funding details. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

For single agency grants

This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].

For multiple agency grants

This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].

Disclosure statement. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.](#)

Biographical note. Please supply a short biographical note for each author. This could be adapted from your departmental website or academic networking profile and should be relatively brief (e.g. no more than 200 words).

Data availability statement. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.

Data deposition. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.

Geolocation information. Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information.](#)

Supplemental online material. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).

Figures. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, GIF, or Microsoft Word (DOC or DOCX). For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.

Tables. Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

Equations. If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).

Units. Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Disclosure Statement

Please include a disclosure statement, using the subheading “Disclosure of interest.” If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflict of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the declaration of interest statement. [Read more on declaring conflicts of interest](#).

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#)(ICTRP). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the [ICMJE guidelines](#).

Complying With Ethics of Experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report in vivo experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the [Declaration of Helsinki](#).

Consent

All authors are required to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where

someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this [Patient Consent Form](#), which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and Safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the [International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare](#) and [Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching](#). When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Centre](#), where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Critical Reviews in Microbiology* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Critical Reviews in Microbiology* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be

charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements.](#)

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

ARTIGO II

Transient receptor potential canonical channels 4 and 5 mediate *Escherichia coli*-derived thioredoxin effects in lipopolysaccharide-injected mice

Publicado na *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* em 2018

Research Article

Transient Receptor Potential Canonical Channels 4 and 5 Mediate *Escherichia coli*-Derived Thioredoxin Effects in Lipopolysaccharide-Injected Mice

Domingos M. S. Pereira,¹ Saulo J. F. Mendes,¹ Khadija Alawi ,² Pratish Thakore,² Aisah Aubdool,² Nágila C. F. Sousa,¹ João F. R. da Silva,¹ José A. Castro Jr.,¹ Ione C. P. Pereira,¹ Luís C. N. Silva,¹ Marcos A. G. Grisotto ,¹ Valério Monteiro-Neto ,^{1,3} Soraia K. P. Costa,⁴ Robson da Costa,⁵ João B. Calixto,⁶ Susan D. Brain,² and Elizabeth S. Fernandes ¹

¹Programa de Pós-graduação, Universidade Ceuma, Rua dos Castanheiros, no 1, Renascerça II, São Luís, MA, Brazil

²Vascular Biology and Inflammation Section, BHF Cardiovascular Centre of Excellence, King's College London, Waterloo Campus, London, UK

³Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil

⁴Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, Butantan, SP, Brazil

⁵Wolfson Centre for Age-Related Diseases, King's College London, London Bridge, London, UK

⁶Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos - CIEnP, Av. Luiz Boiteux Piazza, no 1302 - Cachoeira do Bom Jesus, Florianópolis, SC, Brazil

Correspondence should be addressed to Elizabeth S. Fernandes; elizabeth.soares@ceuma.br

Received 27 January 2018; Revised 18 April 2018; Accepted 7 May 2018; Published 10 June 2018

Academic Editor: Aline S. De Miranda

Copyright © 2018 Domingos M. S. Pereira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Thioredoxin plays an essential role in bacterial antioxidant machinery and virulence; however, its regulatory actions in the host are less well understood. Reduced human Trx activates transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) in inflammation, but there is no evidence of whether these receptors mediate bacterial thioredoxin effects in the host. Importantly, TRPC5 can form functional complexes with other subunits such as TRPC4. Herein, *E. coli*-derived thioredoxin induced mortality in lipopolysaccharide- (LPS-) injected mice, accompanied by reduction of leukocyte accumulation, regulation of cytokine release into the peritoneum, and impairment of peritoneal macrophage-mediated phagocytosis. Dual TRPC4/TRPC5 blockade by ML204 increased mortality and hypothermia in thioredoxin-treated LPS mice but preserved macrophage's ability to phagocytose. TRPC5 deletion did not alter body temperature but promoted additional accumulation of peritoneal leukocytes and inflammatory mediator release in thioredoxin-administered LPS mice. Thioredoxin diminished macrophage-mediated phagocytosis in wild-type but not TRPC5 knockout animals. TRPC5 ablation did not affect LPS-induced responses. However, ML204 caused mortality associated with exacerbated hypothermia and decreased peritoneal leukocyte numbers and cytokines in LPS-injected mice. These results suggest that bacterial thioredoxin effects under LPS stimuli are mediated by TRPC4 and TRPC5, shedding light on the additional mechanisms of bacterial virulence and on the pathophysiological roles of these receptors.

1. Introduction

Thioredoxin (Trx) is a redox protein produced by all species, from bacteria to humans. Trx plays a pivotal role as an

antioxidant molecule; however, its immunomodulatory actions and subsequent role in infections are not well understood and may be species dependent. Indeed, bacteria-derived Trx has been linked to increased bacterial virulence

[1], whilst host-derived Trx has been associated with bacteria evasion from the host's immune system [2].

Mammalian Trx was previously shown to regulate a series of intracellular cascades including activation of gene transcription and induction of apoptosis [3–6]. Data obtained from *in vitro* experiments suggest that once released, the mammalian Trx acts extracellularly, modulating cytokine production and as a chemoattractant for monocytes and neutrophils [7]. Interestingly, Trx overexpressing mice are protected from lipopolysaccharide- (LPS-) induced hepatic damage by presenting reduced cytochrome *c*-mediated apoptosis [8]. Also, Trx expression is found to be upregulated in different organs (heart, lungs, and liver) in LPS-treated mice [9]. These evidences suggest a potential protective effect for host Trx in sepsis. More recently, Ma et al. [2] showed that *Streptococcus* sp. uses host-produced Trx to evade phagocytosis. To add another layer of complexity to Trx effects, its production and release by bacteria such as *Salmonella* sp. increases bacterial virulence in infected mice [1]. This is suggested to be due to Trx antioxidant properties [10–13]. Bacterial Trx was also shown to be crucial to the increased mortality observed in *Salmonella*-induced infection *in vivo* [14].

In its reduced form, human Trx was found to activate the transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) subunits [15], a receptor found on sensory neurones and nonneuronal cells such as endothelial and kidney cells. The ability of TRPC5 to regulate the inflammatory response was previously suggested [15, 16]; however, its role in sepsis is yet to be addressed. Also, it is unclear whether bacterial Trx immunomodulatory actions in the host depend on TRPC5 activation. Importantly, TRPC5 can form functional complexes with other receptors of the same family, such as TRPC4 [15, 17], which was recently suggested to become upregulated under LPS stimuli [18, 19].

Therefore, we investigated the contribution of TRPC5 and TRPC4 channels to the systemic inflammatory response (SIRS) caused by LPS by using TRPC5 knockout (TRPC5^{-/-}) and wild-type (TRPC5^{+/+}) mice and a TRPC4/TRPC5 antagonist. We further assessed the contribution of these receptors

to bacterial Trx-induced responses in LPS-injected mice. We suggest that the effects of *Escherichia coli*-derived Trx in LPS-induced responses depend on the activation of both TRPC4 and TRPC5 channels.

2. Materials and Methods

2.1. Mice. Nonfasted male C57BL/6 and 129SvEvImJ TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mice (2–3 months of age) were used. C57BL/6 animals were obtained from the animal's facility of the Universidade Ceuma (UNICEUMA). TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} breeding pairs were bred at King's College London (KCL) Biological Service Unit from mice provided by Prof. D.E. Clapham (Howard Hughes Medical Institute, Boston, U.S.A) [20]. Animals were housed in a dimatically controlled environment (room temperature of 22 ± 2°C) and humidity of around 60%, on a 12–12 h light/dark cycle (lights on at 07:00), with free access to water and food. All experiments were conducted under the guidelines of the United Kingdom Home

Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and in accordance with the Brazilian Society for Animal Welfare (SBCAL), following approval by the KCL Animal Care and Ethics Committees and the Ethics Committee of UNICEUMA, respectively. All experiments were conducted in a blinded manner. Animals were randomly assigned into groups and the experimenter was blinded towards the treatment and the genetic background of animals during the experiment.

2.2. Pharmacological Treatments. C57BL/6, TRPC5^{+/+}, and TRPC5^{-/-} mice received a subcutaneous (s.c.) injection of phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich) containing bacterial Trx (20 µg/150 µl/animal, twice a day; from *E. coli*; Sigma-Aldrich) for 3 days prior to the induction of SIRS. In order to assess the role of TRPC4 and TRPC5 complexes in LPS-induced responses, C57BL/6 mice received ML204 [16, 21] (1 mg/kg, 150 µl/animal, twice a day; Sigma-Aldrich) for 5 days and then LPS. In a separate set of experiments, C57BL/6 animals received ML204 (1 mg/kg, twice a day; in 6% dimethyl sulfoxide (DMSO) in PBS) for 2 days alone, and then, this drug was coinjected with bacterial Trx (20 µg/animal, twice a day) for another 3 days prior to LPS challenge. Vehicle-treated mice were used as controls.

2.3. Induction of SIRS. Animals received an i.p. injection of saline (0.9%) containing LPS (11.25 million of EU/kg; obtained from *E. coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich) [22], and the SIRS was allowed to develop for 24 h. Vehicle-treated mice were used as controls. Baseline body weights and temperature were registered prior (baseline) and 24 h after LPS injection and the results are expressed as percentage (%) of body weight and temperature in relation to baseline. The severity of SIRS (denoted by changes in grooming behaviour and mobility and presence of piloerection and weeping eyes) was evaluated at 24 h following LPS injection, as previously described [22]. In a separate series of experiments, mortality rates were evaluated over 96 h following SIRS induction in independent groups of C57BL/6 mice (8–10 mice/group).

2.4. AST and Creatinine Levels. Dysfunction of the heart/liver and kidneys was assessed by measuring aspartate aminotransferase (AST) and creatinine levels, respectively, in plasma samples of mice 24 h after the administration of LPS or vehicle by using commercial kits, according with the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). For this, blood samples were obtained by cardiac puncture in animals previously anaesthetized. The plasma was then obtained by centrifugation of heparinised blood samples at 1500 rpm for 20 min. Results are expressed as milliunits/ml (AST) and ng/µl (creatinine).

2.5. Collection of Peritoneal Lavage Samples and Cell Counts. Twenty-four hours following SIRS induction, the animals were anaesthetized, and then the peritoneal lavage fluid (PELF) was collected by laparotomy as described by Fernandes et al. [23]. The peritoneal cavity was washed with 3 ml of sterile PBS and an aliquot was used for total and differential counts (×10⁶/ml) of peritoneal leukocytes. Another

aliquot of the PELF (500 μ l) was separated for *in vitro* analysis of macrophage-mediated phagocytosis; the rest was centrifuged at 1500 rpm for 20 min, and the supernatant was collected and kept at -80°C until further analysis of the levels of inflammatory mediators.

2.6. Nitric Oxide (NO^{\ominus}) Levels. The $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ content was measured by the Griess assay as an indicator of NO production in the peritoneal lavage, according to the method described by Mendes et al. [22]. For this, 80 μ l of sample were incubated with 20 μ l of 1 U/ml nitrate reductase (Sigma-Aldrich) and 10 μ l of 1 mM NADPH (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C in a 96-well plate. Then, 100 μ l of Griess reagent (Sigma-Aldrich) was added and incubated for 15 min at 37°C . Absorbance at 550 nm was measured immediately using a spectrophotometer (plate reader MB-580; Heales, Shenzhen, China). After subtraction of background readings, the absorbance in each sample was compared with that obtained from a sodium nitrite (0–100 μM) standard curve. Results are expressed as levels of NO^{\ominus} in μM .

2.7. Analysis of PELF H_2O_2 . Hydrogen peroxide (H_2O_2) production by peritoneal inflammatory cells was measured by using a H_2O_2 /peroxidase assay kit (Amplex Red H_2O_2 /Peroxidase assay kit; Molecular Probes, Invitrogen). The assay was performed as previously described [22]. Briefly, 50 μ l of PELF were incubated with 50 μ l of a solution containing NaPO_4 0.05 M (pH 7.4), HRP 0.2 U/ml, and Amplex Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) 25.7 mg/ml for 2 h at 37°C . Samples incubated with NaPO_4 0.05 M only were used as controls. After incubation, the reaction was read at 560 nm. Absorbance readings, obtained for samples incubated in the absence or presence of Amplex Red reagent, were compared with a H_2O_2 standard curve (0–40 μM). Results are expressed as levels of H_2O_2 in μM .

2.8. Cytokine Measurements. The levels of PELF cytokines (TNF α , IL-6, and IL-10) were evaluated by using mouse

cytometric bead array (CBA) cytokine (BD Biosciences) and V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Mouse (Meso Scale Discovery) multiplex kits according with the manufacturer's instructions. Readings were compared with those of appropriate standard curves, and results are expressed as picograms of cytokine per millilitre of PELF (pg/ml).

2.9. Macrophage-Mediated Phagocytosis. The peritoneal cells obtained were centrifuged (1500 rpm, 10 min, 4°C) and resuspended in DMEM Media - GlutaMAX[™] (Thermo Fisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum (*v/v*; Thermo Fisher Scientific) and penicillin-streptomycin (1x; Sigma-Aldrich). Cells (6×10^5 /well) were incubated in eight chamber culture slides (BD Falcon) at 37°C in 5% CO_2 , and after 2 h, the nonadhered cells were removed. Adherent cells (macrophages) were then incubated with 2 μM fluorescent latex beads (1:100; 5 μ l/well) for 12 h. After the incubation period, the cell culture medium was removed and each well was processed and analyzed as described by Fernandes et al. [23]. Slides were analyzed by microscopy (Olympus BX51 or Zeiss Axio Z2; bright field). Images were acquired by an Olympus color view 3 or Zeiss AxioCam ICc5

camera and visualized in Cell P or ZEN programmes. Two lots of 100 cells were counted for each sample, and the average for each sample was considered as an *n* number. Results are expressed as number of phagocytosed beads per 100 cells.

2.10. Statistical Analysis. The results are presented as the mean \pm standard error (SE). The percentage of inhibition is reported as the mean \pm SE for each individual experiment. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by the Bonferroni test. The results of the severity score analysis are expressed as the median (minimum-maximum) values and were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons. Survival curves were analyzed by the nonparametric Mantel-Cox test. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Dual Blockade of TRPC4 and TRPC5 Induces Mortality Associated with Increased Hypothermia in Mice with LPS-Induced SIRS. Herein, LPS-injection was used as a model of SIRS associated with gram-negative bacteria. We initially assessed the contribution of TRPC5 and TRPC4 channel activation to LPS-induced SIRS; therefore, systemic alterations such as body weight and temperature, markers of organ damage, severity of disease, and mortality rate were evaluated. As expected, mice injected with LPS exhibited severe disease which was accompanied by a marked drop in body weight and temperature in comparison with the control group, irrespective of genotype (Figure 1(a), 1(c), and 1(e), respectively; $p < 0.05$). Similarly, repeated pretreatment with the dual TRPC4/TRPC5 blocker ML204 did not alter SIRS severity or body weight in LPS mice (Figure 1(b) and 1(d)). On the other hand, hypothermia was more pronounced (twofold increase) in SIRS mice administered with ML204 in comparison with their vehicle controls (Figure 1(f); $p < 0.05$).

Loss of TRPC5 signalling was previously suggested to attenuate liver injury caused by cholestasis [24] and to improve kidney function in LPS-injected mice [25]. Data depicted in Figure 2(a)–2(d) demonstrates that neither TRPC5 ablation nor TRPC4/TRPC5 blockade significantly altered the levels of AST and creatinine (indicators of liver and kidney damage, resp.) in mice with SIRS; still, TRPC5^{-/-} mice with SIRS exhibited higher levels of AST (1.6-fold increase) than their vehicle controls and TRPC5^{+/+} injected with LPS. Assessment of survival showed that ML204 pretreatment causes mortality (15%) in C57BL/6 mice with SIRS whilst no deaths were registered for those administered with vehicle (Figure 2(e)).

ML204 did not affect severity, body weight, or organ function (Figure 1(b) and 1(d); Figure 2(b) and 2(d)); but caused hypothermia in non-SIRS mice in comparison with vehicle controls (Figure 1(f); $p < 0.05$). Also, ML204 had no effects in the survival of the same mice (Figure 2(f)).

3.2. *E. coli*-Derived Trx Causes Mortality in SIRS Mice and This Is Further Exacerbated by TRPC4/TRPC5 Antagonism. We next evaluated the effects of bacterial Trx in LPS-

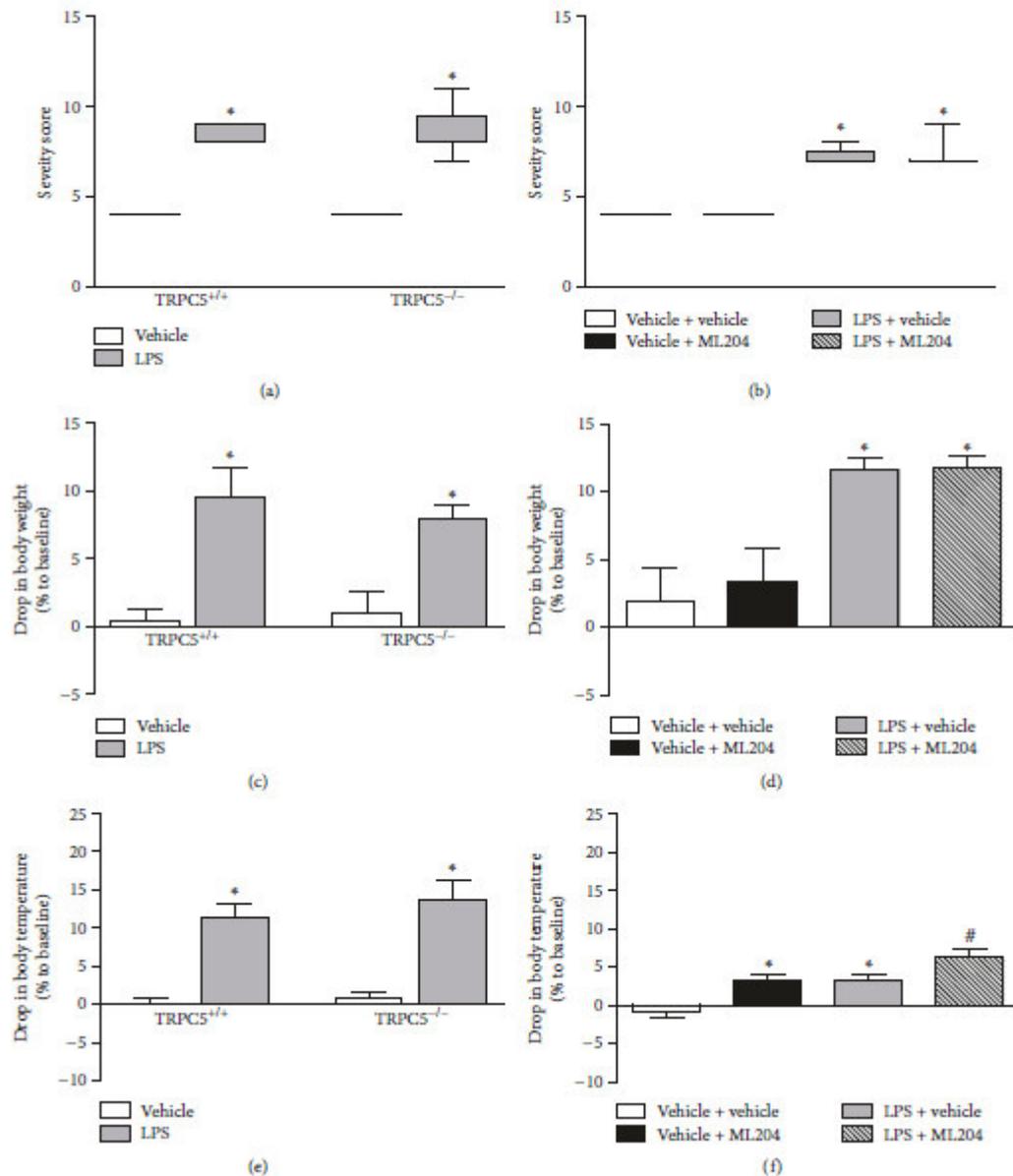


FIGURE 1: Effects of TRPC5 deletion and TRPC4/TRPC5 antagonism in the severity, body temperature, and weight of SIRS mice. (a) Severity of SIRS, (c) drop in body weight, and (e) temperature in TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mice injected with vehicle (PBS; $n = 4 - 8$) or lipopolysaccharide (LPS; $n = 7 - 14$). (b) Severity of SIRS, (d) drop in body weight, and (f) temperature in mice treated with vehicle (6% DMSO in PBS; $n = 8 - 16$) or the TRPC4/TRPC5 antagonist ML204 (1 mg/kg; $n = 8 - 16$) subcutaneously, twice a day, for 5 days prior to LPS injection. Non-SIRS (PBS-injected) mice were used as controls ($n = 5 - 8$). * $p < 0.05$ differs from vehicle-injected controls; # $p < 0.05$ differs from LPS-injected controls.

injected mice. Treatment with this protein was not able to affect body weight or temperature in SIRS mice (Figure 3(a) and 3(c)). Similarly, ML204 did not alter body weight in SIRS mice treated with bacterial Trx; however, the same animals exhibited increased hyperthermia (2.7-fold) in comparison

with LPS controls (Figure 3(d); $p < 0.05$). Treatment with bacterial Trx had no effects in LPS-induced liver and kidney damage, and this was not altered by treatment with ML204 (Figure 3(e) and 3(f)). However, bacterial Trx caused marked mortality (28%) in LPS mice (Figure 3(g); $p < 0.05$), an effect

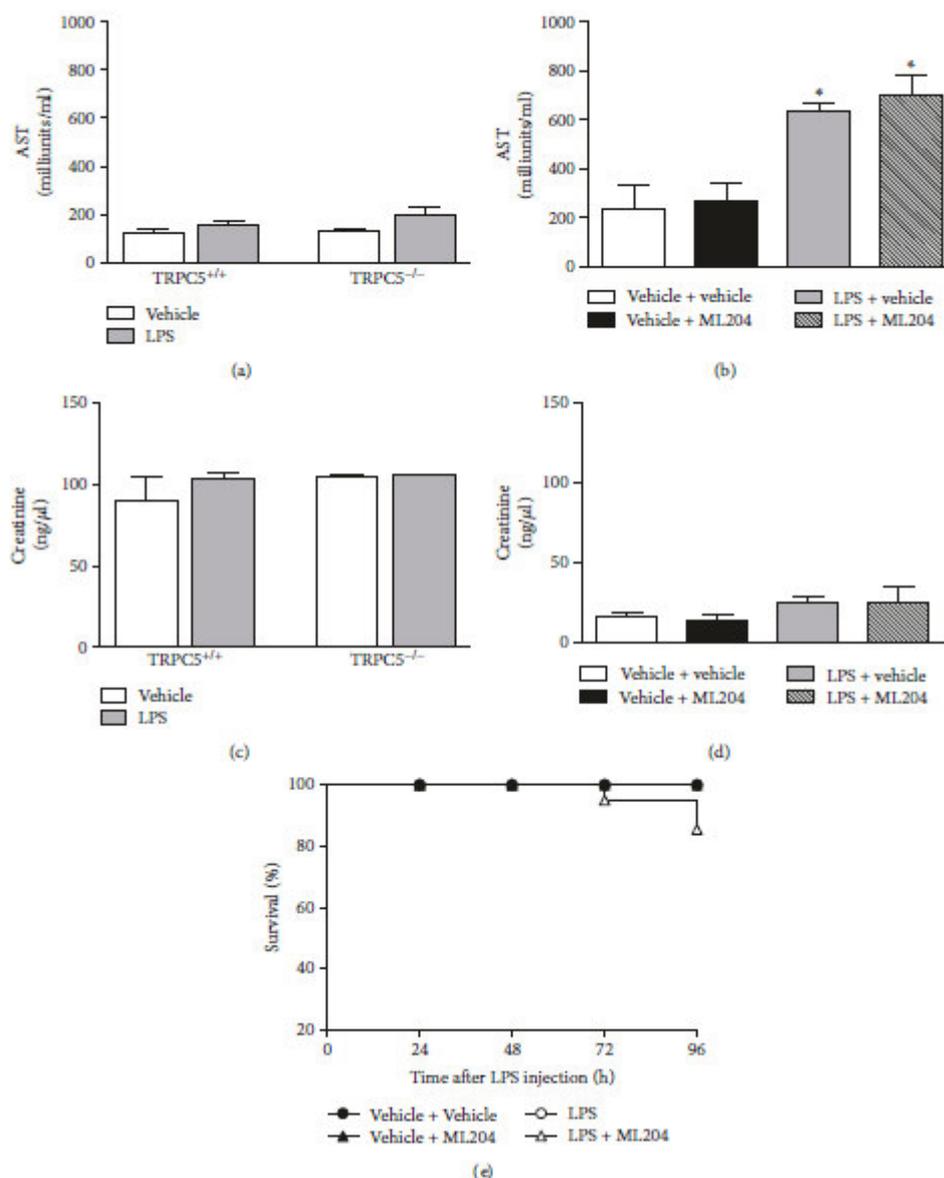


FIGURE 2: Effects of TRPC5 deletion and TRPC4/TRPC5 antagonism in organ failure and survival of SIRS mice. Circulating (a) aspartate aminotransferase (AST) and (c) creatinine levels in TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mice injected with vehicle (PBS; $n = 4$) or lipopolysaccharide (LPS; $n = 7$). Circulating levels of (b) AST and (d) creatinine in mice treated with vehicle (6% DMSO in PBS; $n = 6$) or the TRPC4/TRPC5 antagonist ML204 (1 mg/kg; $n = 6$) subcutaneously, twice a day, for 5 days prior to LPS injection. Non-SIRS (PBS-injected) mice were used as controls ($n = 5 - 8$). Survival rates (e) were registered in SIRS and non-SIRS mice administered with vehicle or ML204 ($n = 10$ /group). * $p < 0.05$ differs from vehicle-injected controls.

that was significantly exacerbated by treatment with ML204 (mortality of 65%) (Figure 3(g); $p < 0.05$).

The administration of bacterial Trx in non-SIRS mice caused nonsignificant hypothermia and elevation of creatinine in these mice (Figure 3(d) and 3(f); $p > 0.05$), without affecting their survival or AST levels (Figure 3(e) and 3(g)).

ML204 treatment did not affect Trx effects in non-SIRS mice (Figure 3).

3.3. Treatment with ML204 or Bacterial Trx but Not TRPC5 Ablation Reduces Peritoneal Cell Numbers in Mice. In order to investigate the participation of TRPC4 and TRPC5 in the

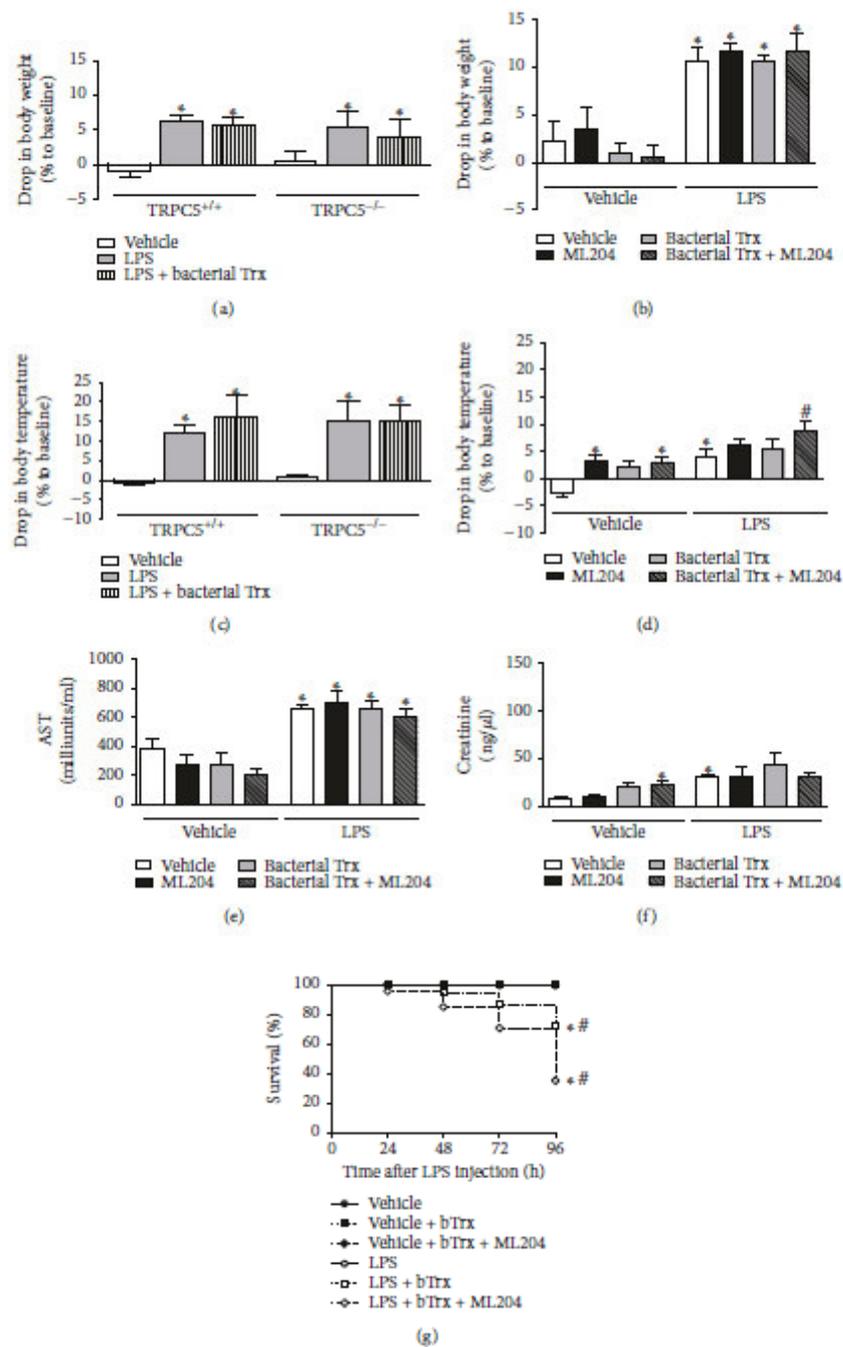


FIGURE 3: Effects of bacterial thioredoxin (Trx) in body temperature and weight, organ failure, and survival of SIRS mice. Bacterial Trx (20 μ g/150 μ l/mouse, subcutaneously, twice a day, for 3 days prior to lipopolysaccharide (LPS) injection) effects in (a) body weight and (c) temperature of TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mice injected with vehicle (PBS; $n = 6$) or LPS ($n = 6$). Effects of bacterial Trx (20 μ g/150 μ l/mouse, subcutaneously, twice a day, for 3 days prior to LPS injection) in (b) body weight and (d) temperature, (e) AST, and (f) creatinine levels in SIRS mice treated with vehicle (6% DMSO in PBS; $n = 6$) or the TRPC4/TRPC5 antagonist ML204 (1 mg/kg $n = 6$) subcutaneously, twice a day, for 5 days prior to LPS injection. Non-SIRS (PBS-injected) mice were used as controls ($n = 5 - 8$). Survival rates (e) were registered for mice administered with vehicle, ML204, Trx, or Trx + ML204 ($n = 8$ /group). * $p < 0.05$ differs from vehicle-injected controls; # $p < 0.05$ differs from LPS-injected controls.

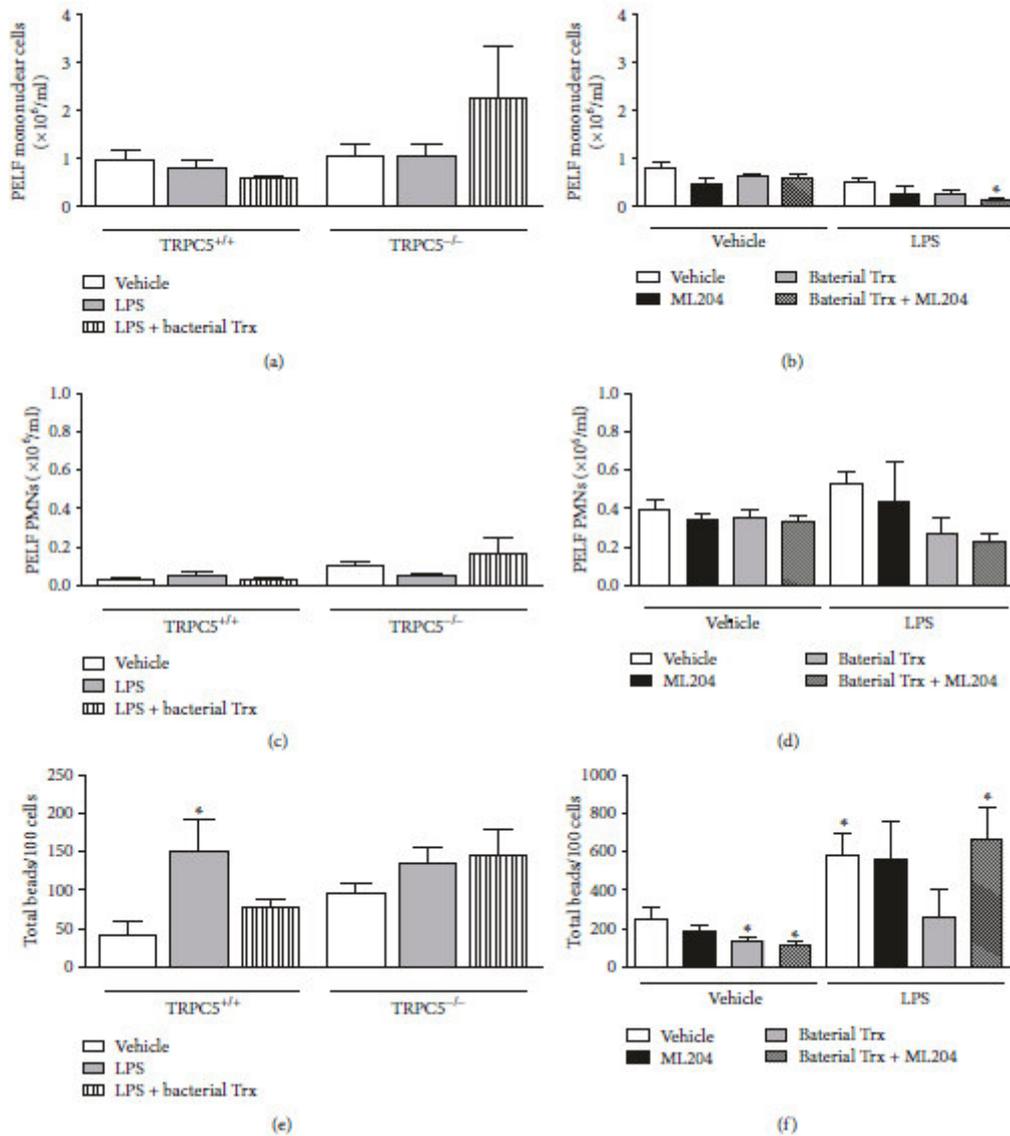


FIGURE 4: Effects of bacterial thioredoxin (Trx) in the number of peritoneal leukocytes and macrophage-mediated phagocytosis in SIRS mice. Bacterial Trx (20 μ g/150 μ l/mouse, subcutaneously, twice a day, for 3 days prior to lipopolysaccharide (LPS) injection) effects in the numbers of peritoneal (a) mononuclear and (c) polymorphonuclear (PMN) cells and (e) macrophage-mediated phagocytosis in TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mice injected with vehicle (PBS; $n = 4$) or LPS ($n = 6$). Effects of bacterial Trx (20 μ g/150 μ l/mouse, subcutaneously, twice a day, for 3 days prior to LPS injection) in the numbers of peritoneal (b) mononuclear and (d) polymorphonuclear (PMN) cells and (f) macrophage-mediated phagocytosis in SIRS and non-SIRS mice treated with vehicle (6% DMSO in PBS; $n = 6 - 9$) or the TRPC4/TRPC5 antagonist ML204 (1 mg/kg; $n = 5 - 9$) subcutaneously, twice a day, for 5 days prior to LPS injection. ML204-treated mice were used for comparison ($n = 5 - 9$). * $p < 0.05$ differs from vehicle-injected controls.

local alterations caused by the intraperitoneal injection of LPS, the PELF samples were analyzed, and the numbers of peritoneal leukocytes were counted. It was observed that TRPC5 ablation does not affect leukocyte accumulation into the peritoneum of LPS-injected mice, denoted by the numbers of mononuclear and polymorphonuclear (PMN) cells

(Figure 4(a) and 4(c)). On the other hand, administration of ML204 caused reduction (46%) in the peritoneal mononuclear cell population (Figure 4(b)) of LPS-injected animals in comparison with LPS controls; however, this was not significant. A similar effect was observed for those which received bacterial Trx, as they presented lower numbers

TABLE 1: Inflammatory mediator levels in peritoneal lavage samples obtained from TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mice intraperitoneally (i.p.) injected with lipopolysaccharide (LPS) and pretreated subcutaneously with either vehicle (PBS; $n=6$) or bacterial thioredoxin (Trx; 20 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$, twice a day, for 3 days, $n=5-6$). Animals treated with vehicle (PBS) were used as controls ($n=4$). * $p < 0.05$ differs from the vehicle + vehicle group; # $p < 0.05$ differs from the vehicle + LPS group; & $p < 0.05$ differs from LPS-injected WT mice pretreated with bacterial Trx.

Inflammatory mediator	TRPC5 ^{+/+}			TRPC5 ^{-/-}		
	Vehicle+vehicle	Vehicle+LPS	Trx+LPS	Vehicle+vehicle	Vehicle+LPS	Trx+LPS
TNF α (pg/ml)	47.0 \pm 2.7	68.6 \pm 5.7	87.3 \pm 14.4	49.3 \pm 10.3	78.0 \pm 8.6	119.0 \pm 12.7*
IL-6 (pg/ml)	1339.0 \pm 69.0	9822.0 \pm 1969.0	7957.0 \pm 2141.0	1311.0 \pm 38.7	13319.0 \pm 4011.0	29657.0 \pm 4882.0 **&
IL-10 (pg/ml)	254.5 \pm 3.3	309.7 \pm 12.1	354.2 \pm 66.4	274.8 \pm 29.2	329.1 \pm 19.4	367.0 \pm 36.1
NO ⁺ (μM)	5.5 \pm 1.2	5.3 \pm 1.2	9.3 \pm 1.1	6.3 \pm 0.9	7.5 \pm 0.7	27.7 \pm 10.7
H ₂ O ₂ (μM)	2.5 \pm 0.6	4.3 \pm 0.8	7.5 \pm 0.9	3.1 \pm 0.7	3.8 \pm 0.8	10.8 \pm 4.4

TABLE 2: Inflammatory mediator levels in peritoneal lavage samples obtained from C57BL/6 mice intraperitoneally (i.p.) injected with lipopolysaccharide (LPS) or vehicle (PBS) and pretreated subcutaneously with vehicle (6% DMSO in PBS; $n=8$), ML204 (1 mg/kg, 150 $\mu\text{l}/\text{mice}$, twice a day, for 6 days; $n=5-8$), and/or bacterial thioredoxin (Trx, 20 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$, twice a day, for 3 days; $n=5-8$). * $p < 0.05$ differs from the vehicle + vehicle group; # $p < 0.05$ differs from the vehicle-control group treated with ML204, Trx or ML204 + Trx; & $p < 0.05$ differs from the vehicle + LPS group.

Inflammatory mediator	Vehicle + vehicle	ML204 + vehicle	Trx + vehicle	ML204 + Trx + vehicle	Vehicle + LPS	ML204 + LPS	Trx + LPS	ML204 + Trx + LPS
TNF α (pg/ml)	8.8 \pm 2.6	15.5 \pm 2.5	16.1 \pm 2.6	33.2 \pm 3.5*	16.3 \pm 5.7	14.3 \pm 8.1	7.8 \pm 3.3	7.3 \pm 3.1#
IL-6 (pg/ml)	2.1 \pm 0.4	2.0 \pm 0.7	1.8 \pm 0.4	2.9 \pm 0.7	403.0 \pm 133.1*	144.0 \pm 61.1	105.2 \pm 55.0&	186.9 \pm 94.3
IL-10 (pg/ml)	4.8 \pm 2.5	12.0 \pm 1.4	9.9 \pm 1.6	20.7 \pm 1.3*	8.4 \pm 2.2	1.7 \pm 0.8	1.6 \pm 0.6	6.3 \pm 2.7#
NO ⁺ (μM)	47.3 \pm 7.3	0.1 \pm 0.03*	9.0 \pm 7.1	6.1 \pm 6.0	96.9 \pm 10.2*	122.9 \pm 24.0#	78.2 \pm 8.0#	81.7 \pm 8.4#
H ₂ O ₂ (μM)	16.5 \pm 4.7	30.9 \pm 3.4*	19.7 \pm 4.6	8.2 \pm 3.0	19.4 \pm 4.1	19.1 \pm 5.2	10.6 \pm 2.4	12.3 \pm 2.8

of mononuclear (44%) and PMN (48%) cells than LPS-injected controls (Figure 4(b) and 4(d)). Analysis of PELF population in non-SIRS mice showed that ML204 reduces the number of mononuclear cells (40%) (Figure 4(b)), with no effects in PMNs (Figure 4(d)).

3.4. TRPC5 but Not Dual TRPC4/TRPC5 Antagonism Promotes the Accumulation of Leukocytes in the Peritoneal Cavity of Trx-Treated SIRS Mice. The contribution of TRPC4/TRPC5 subunits to the leukocyte influx in the peritoneal cavity of SIRS mice injected with bacterial Trx was also assessed. Although not significant, SIRS TRPC5^{-/-} treated with bacterial Trx exhibited higher numbers of leukocytes in their peritoneal cavity than TRPC5^{+/+} mice with SIRS administered with the same protein (3.8-fold and 5-fold increase for mononuclear and PMN cells, resp.) and LPS-injected TRPC5^{-/-} mice (2.1-fold and 3.4-fold increase for mononuclear and PMN cells, resp.) (Figure 4(a) and 4(c)). Treatment with ML204 did not significantly affect the peritoneal population of Trx-administered SIRS mice (Figure 4(a) and (c)); however, it further decreased the number of mononuclear cells in these mice.

Trx had no effects in PELF leukocytes of non-SIRS mice (Figure 4(b) and 4(d)), and this was not altered by ML204 treatment (Figure 4(b) and 4(d)).

3.5. E. coli-Derived Trx Inhibits LPS-Induced Phagocytosis in Macrophages via Activation of TRPC5. Bacterial Trx

facilitates evasion of phagocytosis [2]. Figure 4 shows that LPS-induced phagocytosis in macrophages was reduced by Trx treatment (~51%), an effect that was prevented by TRPC5 ablation or dual TRPC4/TRPC5 blockade (Figure 4(e) and 4(f)). Trx also reduced phagocytosis in macrophages of non-SIRS mice (45%) (Figure 4(f)); this response was not affected by ML204 treatment (Figure 4(f)).

3.6. TRPC4 and TRPC5 Differentially Regulate the Release of Peritoneal Inflammatory Mediators during SIRS. Changes in the generation of inflammatory mediators are essential to the host response to infection; thus, the levels of peritoneal mediators were analyzed. LPS triggered the release of cytokines, NO, and H₂O₂ in the peritoneal cavity of TRPC5-expressing mice (Tables 1 and 2). LPS-induced increases in cytokine and NO⁺ concentrations were higher in C57BL/6 (Table 1) than in TRPC5^{+/+} (Table 2) in comparison with their vehicle controls. On the other hand, LPS-injected TRPC5^{+/+} mice release greater amounts of H₂O₂ than mice of the C57BL/6 strain in comparison with vehicle controls (Tables 1 and 2). Fold increases in C57BL/6 mice were of 1.9, 191.9, 1.8, and 2.0 for TNF α , IL-6, IL-10, and NO⁺, respectively; whilst TRPC5^{+/+} animals presented with 1.5-, 7.3-, 1.2-, and 1.7-fold increases for TNF α , IL-6, IL-10, and H₂O₂ levels, respectively.

Whilst ML204 treatment decreased the production of cytokines (IL-6 and IL-10) in mice with SIRS (Table 2), the lack of TRPC5 did not affect this response (Table 1). Bacterial

Trx had no effects in the release of inflammatory mediators in the peritoneal cavity of SIRS TRPC5^{+/+} mice (Table 1) but impaired the production of peritoneal cytokines (TNF α , IL-6, and IL-10) and H₂O₂ in the C57BL/6 strain (Table 2). Also, Trx caused increased release of TNF α , IL-6, NO, and H₂O₂ in TRPC5^{-/-} animals injected with LPS in comparison with LPS controls or TRPC5^{+/+} mice administered with this protein (Table 1). ML204 treatment partially reversed Trx-induced reduction of peritoneal IL-6 and IL-10 in SIRS mice (Table 2).

The concentrations of PELF inflammatory mediators were also evaluated in non-SIRS mice. Data depicted on Table 2 shows that when administered with ML204, these mice produce higher levels of TNF α (1.8-fold increase), IL-10 (2.5-fold increase), and H₂O₂ (1.9-fold increase) but are impaired to release NO. Similarly, non-SIRS mice treated with bacterial Trx presented with increased levels of peritoneal TNF α and IL-10 (1.8- and 2.1-fold increase, resp.) and reduced (81%) NO concentrations. ML204 injection in non-SIRS mice administered with Trx resulted in further increase of TNF α and IL-10 (Table 2).

4. Discussion

Growing evidence has linked the activation of TRPC5 complexes to inflammation [15, 16, 26, 27]. Interestingly, these reports have suggested an anti-inflammatory and immunosuppressive role for these complexes. TRPC5 activation is also involved in multiple organ functions as a protective molecule in diseased states [24, 25]. TRPC5 channels can be activated by a range of endogenous stimuli such as G-protein coupled receptor activation, oxidised phospholipids, H₂O₂, and reduced Trx [15, 28–31]. Of note, Trx is involved in the antioxidant machinery of both mammals and microorganisms. Despite all these evidences, the relevance of TRPC5 complexes to the SIRS associated with bacterial infections has not yet been addressed; moreover, their importance as targets for bacterial Trx has never been explored.

Herein, we evaluated the role of TRPC5 and TRPC4 complexes in a nonlethal mouse model of LPS-induced SIRS and especially its contribution to bacterial Trx signalling in

the host. Data gathered from TRPC5^{-/-} mice suggest that the endogenous activation of TRPC5 has little or no participation in the local and systemic inflammatory responses to LPS, as in its absence, only AST levels are regulated. On the other hand, dual blockade of TRPC4/TRPC5 complexes culminated with the regulation of different steps of SIRS (enhanced hypothermia, reduction of peritoneal mononuclear cell numbers, and diminished cytokine release), and this was associated with mortality (15%). These evidences suggest a role for TRPC4 but not TRPC5 receptors in LPS-induced responses. Recent reports demonstrated that LPS does not activate TRPC4 but induces its expression in pulmonary arterial smooth muscle cells *in vitro*; the same studies showed TRPC5 is not expressed on these cells [18, 19]. However, a potential role for TRPC5 in LPS responses is yet to be discarded as little is known of the existence of compensatory mechanisms in TRPC5^{-/-} mice in inflammation. Of note,

both TRPC5 deletion and TRPC4/TRPC5 blockade by ML204 were previously demonstrated to increase cytokine release in complete Freund's adjuvant- (CFA-) injected mice [16], suggesting these channels may respond differently to different inflammatory challenges (i.e., LPS versus CFA).

We also found that in non-SIRS mice, ML204 increases the peritoneal concentrations of TNF α , IL-10, and H₂O₂ whilst reducing NO levels. Treatment with bacterial Trx resulted in similar responses for TNF α , IL-10, and NO, and its coadministration with ML204 further exacerbated the release of TNF α and IL-10. These alterations caused by either ML204 or bacterial Trx in non-SIRS animals had little or no effect in the other evaluated parameters, except for body temperature. However, the relevance of these data is unclear, especially in regards to bacterial Trx, as this protein is only expected to be present at systemic levels in the host if there is an ongoing bacterial infection.

Different strains of mice were used in our study (C57BL/6 and 129Si/SvImJ) and, as such, the intensity of the inflammatory response varied between them. Differences between mouse strains have also been shown in other studies in regard to inflammatory mediator release and leukocyte migration [23, 32, 33]. Despite that, we show that *E.coli*-derived Trx regulates a series of inflammatory events in our model, causing reduction of peritoneal leukocytes, cytokines (IL-6 and IL-10), and H₂O₂, in addition to impaired macrophage-mediated phagocytosis. These responses were associated with increased mouse mortality (28%). This was expected as the ability of bacterial Trx to mediate mortality during infection is not novel. Indeed, due to its antioxidant properties, bacterial Trx was previously associated with increased mortality by *Salmonella enterica in vivo* [14]. This protein is also known to contribute to bacterial virulence and evasion from the host immune system [1, 2, 10–14].

Our data also shows that cytokine (TNF α and IL-6), NO, and H₂O₂ release in the peritoneum is exacerbated in SIRS TRPC5^{-/-} mice pretreated with Trx whilst ML204 partially reversed the inhibitory effects of this protein on IL-6 and IL-10 production, without affecting NO and H₂O₂ levels. These data allow us to suggest that TRPC4 and TRPC5 channels may play different roles in the generation of inflammatory mediators upon Trx stimuli.

Interestingly, the suppression of macrophage-mediated phagocytosis by Trx was absent in TRPC5^{-/-} and also in those administered with ML204, indicating that both TRPC5 and TRPC4 mediate Trx responses in SIRS mice. Of note, the ability of TRPC4 and TRPC5 to form homo- and heterodimers, in addition to the lack of selective antagonists for each of these receptors, makes difficult to distinguish their individual physiological and pathological roles. Despite that, it was demonstrated herein that these channels may act as additional targets for bacterial Trx during SIRS.

Although different regulatory pathways may be associated with TRPC4 and TRPC5, enhanced mortality (65% rate) was observed in LPS-injected mice treated with *E.coli*-derived Trx and ML204; therefore, suggesting for the first time, a protective role for TRPC4/TRPC5 channels in infections caused by this microorganism. It is possible that TRPC4

and TRPC5 also play similar roles in infections caused by other bacteria, but this remains to be evaluated.

Overall, these data indicate that bacterial Trx effects in LPS-induced responses depend on the activation of both TRPC4 and TRPC5 channels, with these playing distinct and additional roles in disease outcome. Further *in vitro* and *in vivo* studies addressing the potential of TRPC4/TRPC5 selective agonists as protective molecules against bacterial infections remain to be investigated.

Data Availability

The datasets used to support this study will be made available upon request. Requests should be sent to the corresponding author.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Domingos M. S. Pereira and Saulo J. F. Mendes contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors thank Professor David E. Clapham (Howard Hughes Medical Institute, Boston, U.S.A) for the donation of TRPC5^{+/+} and TRPC5^{-/-} mouse breeding pairs, from which the studied colony was bred. The authors also acknowledge the support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Grant no. 3325/2013), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant nos. 474999/2012-2 and 309046/2016-5), Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (Grant no. APCINTER-00311/14), and Programa INCT-INOVAMED. Nágila C. F. Sousa is an undergraduate student and Domingos M. S. Pereira and Saulo J. F. Mendes are PhD students receiving studentships from CAPES. João F. R. da Silva is a PhD student receiving a studentship from FAPEMA.

References

- [1] A. Negrea, E. Bjur, S. Puiaç, S. E. Ygberg, F. Aslund, and M. Rhen, "Thioredoxin 1 participates in the activity of the Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system," *Journal of Bacteriology*, vol. 191, no. 22, pp. 6918–6927, 2009.
- [2] Z. Ma, H. Zhang, J. Zheng et al., "Interaction between M-like protein and macrophage thioredoxin facilitates antiphagocytosis for Streptococcus equi ssp. zooepidemicus," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, article e32099, 2012.
- [3] K. C. Das, "c-Jun NH2-terminal kinase-mediated redox-dependent degradation of IkappaB: role of thioredoxin in NF-kappaB activation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 7, pp. 4662–4670, 2001.
- [4] K. Hirota, H. Nakamura, H. Masutani, and J. Yodoi, "Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 957, no. 1, pp. 189–199, 2002.
- [5] S. Lee, S. M. Kim, and R. T. Lee, "Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 10, pp. 1165–1207, 2013.
- [6] R. RANCOURT, R. LEE, H. ONEILL, F. ACCURSO, and C. WHITE, "Reduced thioredoxin increases proinflammatory cytokines and neutrophil influx in rat airways: modulation by airway mucus," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 42, no. 9, pp. 1441–1453, 2007.
- [7] S. Yoshida, T. Katoh, T. Tetsuka, K. Uno, N. Matsui, and T. Okamoto, "Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts," *The Journal of Immunology*, vol. 163, no. 1, pp. 351–358, 1999.
- [8] H. Okuyama, H. Nakamura, Y. Shimahara et al., "Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice," *Hepatology*, vol. 37, no. 5, pp. 1015–1025, 2003.
- [9] H. Sano, T. Sata, H. Nanri, M. Ikeda, and A. Shigematsu, "Thioredoxin is associated with endotoxin tolerance in mice," *Critical Care Medicine*, vol. 30, no. 1, pp. 190–194, 2002.
- [10] C. Cheng, Z. Dong, X. Han et al., "Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of Listeria monocytogenes via redox interactions," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7, p. 287, 2017.
- [11] E. R. Rocha, A. O. Tzianabos, and C. J. Smith, "Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe Bacteroides fragilis," *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 22, pp. 8015–8023, 2007.
- [12] M. Song, J. S. Kim, L. Liu, M. Husain, and A. Vazquez-Torres, "Antioxidant defense by thioredoxin can occur independently of canonical thiol-disulfide oxidoreductase enzymatic activity," *Cell Reports*, vol. 14, no. 12, pp. 2901–2911, 2016.
- [13] T. Takemoto, Q. M. Zhang, and S. Yonei, "Different mechanisms of thioredoxin in its reduced and oxidized forms in defense against hydrogen peroxide in Escherichia coli," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 24, no. 4, pp. 556–562, 1998.
- [14] X. Sem and M. Rhen, "Pathogenicity of Salmonella enterica in Caenorhabditis elegans relies on disseminated oxidative stress in the infected host," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, article e45417, 2012.
- [15] S. Z. Xu, P. Sukumar, F. Zeng et al., "TRPC channel activation by extracellular thioredoxin," *Nature*, vol. 451, no. 7174, pp. 69–72, 2008.
- [16] K. M. Alawi, F. A. Russell, A. A. Aubdool et al., "Transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) protects against pain and vascular inflammation in arthritis and joint inflammation," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 76, no. 1, pp. 252–260, 2017.
- [17] T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz, and T. Gudermann, "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 11, pp. 7461–7466, 2002.
- [18] G. L. Chen, H. Jiang, and F. Zou, "Upregulation of transient receptor potential canonical channels contributes to endotoxin-induced pulmonary arterial stenosis," *Medical Science Monitor*, vol. 22, pp. 2679–2684, 2016.

- [19] L. H. Jiang, N. Gamper, and D. J. Beech, "Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1," *Current Drug Targets*, vol. 12, no. 5, pp. 724–736, 2011.
- [20] A. Riccio, Y. Li, J. Moon et al., "Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior," *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 761–772, 2009.
- [21] M. Miller, J. Shi, Y. Zhu et al., "Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 38, pp. 33436–33446, 2011.
- [22] S. J. F. Mendes, F. I. A. B. Sousa, D. M. S. Pereira et al., "Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms," *International Immunopharmacology*, vol. 34, pp. 60–70, 2016.
- [23] E. S. Fernandes, L. Liang, S. J. Smillie et al., "TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome," *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 11, pp. 5741–5751, 2012.
- [24] K. M. Alawi, D. Tandio, J. Xu et al., "Transient receptor potential canonical 5 channels plays an essential role in hepatic dyslipidemia associated with cholestasis," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 2338, 2017.
- [25] T. Schaldecker, S. Kim, C. Tarabanis et al., "Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 12, pp. 5298–5309, 2013.
- [26] P. Sukumar, A. Sedo, J. Li et al., "Constitutively active TRPC channels of adipocytes confer a mechanism for sensing dietary fatty acids and regulating adiponectin," *Circulation Research*, vol. 111, no. 2, pp. 191–200, 2012.
- [27] G. Wu, Z. H. Lu, H. J. Gabius, R. W. Ledeen, and D. Bleich, "Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression," *Diabetes*, vol. 60, no. 9, pp. 2341–2349, 2011.
- [28] E. Al-Shawaf, J. Naylor, H. Taylor et al., "Short-term stimulation of calcium-permeable transient receptor potential canonical 5-containing channels by oxidized phospholipids," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 7, pp. 1453–1459, 2010.
- [29] J. Naylor, E. Al-Shawaf, L. McKeown et al., "TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbenes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 7, pp. 5078–5086, 2011.
- [30] M. Naziroğlu, D. M. Dikici, and Ş. Dursun, "Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels," *Neurochemical Research*, vol. 37, no. 10, pp. 2065–2075, 2012.
- [31] T. Wuensch, F. Thilo, K. Krueger, A. Scholze, M. Ristow, and M. Tepel, "High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes," *Diabetes*, vol. 59, no. 4, pp. 844–849, 2010.
- [32] I. V. Yang, S. Alper, B. Lackford et al., "Novel regulators of the systemic response to lipopolysaccharide," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 45, no. 2, pp. 393–402, 2011.
- [33] H. H. Arnardottir, J. Freysdottir, and I. Hardardottir, "Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice," *Inflammation Research*, vol. 61, no. 9, pp. 931–939, 2012.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Trx é uma proteína altamente conservada em todas as espécies, de mamíferos a bactérias. Além de funcionar como *scavenger* de EROS, várias outras funções tem sido atribuídas a esta proteína, desde sua participação na síntese de DNA e reparo de proteínas até a inibição de vias relacionadas a imunidade inata, como, por exemplo, fagocitose e sistema complemento, sendo considerada assim, como importante fator de virulência de patógenos.

Diferentes alvos foram anteriormente descritos para a Trx bacteriana no hospedeiro, incluindo enzimas como C5 convertase e proteína M de macrófagos; entretanto, não existem relatos de sua atividade sobre o TRPC5 e seus complexos, expressos em células neuronais e não neuronais.

Este trabalho apresentou as primeiras evidências de que os receptores TRPC4/TRPC5 podem exercer um papel protetor na sepse induzida por bactérias. De forma geral, os dados aqui discutidos indicam que os efeitos da Trx bacteriana em infecções que envolvem a interação entre LPS e o hospedeiro dependem da ativação de ambos TRPC4 e TRPC5, e que estes exercem papéis complementares no prognóstico da sepse.