

AhpC1 AUMENTA A VIRULÊNCIA DA *Pseudomonas aeruginosa* ATRAVÉS DA REDUÇÃO DE OXIDANTES GERADOS DURANTE A INFLAMAÇÃO

Beatriz Pereira da Silva¹; Leonardo Silva Rocha²; Railmara Pereira da Silva³; Diogo de Abreu Meireles⁴; Thiago M.L. Correia⁵; Raphael P. de Paula⁵; Luis Eduardo Soares Netto⁶; Raphael Ferreira Queiroz⁷, Flavia Carla Meotti⁸

1. Graduada pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP)
2. Mestre pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PMBqBM-UESB)
3. Pesquisadora do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP)
4. Pesquisador do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP)
5. Pesquisador do programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal da Bahia (IMS-UFBA)
6. Professor do IB/USP - Departamento de Genética e Biologia Evolutiva
7. Professor do PMBqBM-UESB - Departamento de Ciências Naturais e Departamento de Ciências Biológicas
8. Professora do IQ/USP - Departamento de Bioquímica - Orientadora

Resumo

A virulência da *Pseudomonas aeruginosa* está associada à expressão de uma série de enzimas antioxidantes que auxiliam na detoxificação de espécies oxidativas produzidas pelo hospedeiro. Dentre essas enzimas, estão as peroxirredoxinas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento da peroxirredoxina AhpC1 de *P. aeruginosa* na defesa contra o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o hidroperóxido de urato (HOOU) em modelo *in vitro*, em cultura celular de neutrófilos e *in vivo*.

A deleção da AhpC1 resultou em uma maior sensibilidade da bactéria ao HOCl produzido por neutrófilos. Houve uma diminuição da virulência da cepa Δ ahpC1 em camundongos infectados, além de uma maior sobrevivência quando comparado à cepa selvagem. Ainda, a proteína AhpC1 tem um papel fundamental na eliminação de outros oxidantes, como o H₂O₂ e o HOOU. Em conclusão, essa proteína tem um papel central na sobrevivência e virulência de *P. aeruginosa*, contribuindo para sua patogenicidade.

Autorização legal: Comitê de ética em pesquisa humana - UESB (#46135315.4.0000.0055); Comitê de ética animal - UESB (171/2018).

Palavras-chave: neutrófilos; peroxirredoxinas; ácido úrico

Apoio financeiro: CNPq – PIBIC; FAPESB

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade de São Paulo - USP

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa oportunista presente em infecções que ocorrem principalmente no trato respiratório inferior de pacientes portadores de Fibrose Cística [2]. Sem intervenção, os pacientes apresentam infecções persistentes e queda da função respiratória, levando à morte precoce devido às complicações pulmonares [3]. Apesar dos recursos terapêuticos existentes, infecções causadas por *Pseudomonas* são de difícil tratamento tendo em vista o elevado potencial evasor dessa bactéria. Essa bactéria patogênica possui estratégias dedicadas à proteção contra oxidantes gerados durante uma resposta inflamatória, contando com a expressão de um vasto conjunto de enzimas antioxidantes para suportar o burst gerado pelo hospedeiro [4, 5]. O estudo destas enzimas antioxidantes, suas estruturas, funções catalíticas e o papel na virulência e proteção de algumas bactérias têm crescido, visto que elas são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias [9]. Neste trabalho, avaliamos a sensibilidade da cepa virulenta de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) frente a ação de um potente microbicida produzido por células imunes, o ácido hipocloroso (HOCl). Cepas mutantes que não expressam peroxidases específicas presentes nessa bactéria também foram testadas, mostrando que bactérias ausentes da proteína AhpC1 (Δ ahpC1) se mostraram significativamente mais sensíveis à ação do HOCl. Em infecções septicêmicas de *Pseudomonas aeruginosa*, foi mostrado que a presença de altos níveis de ácido úrico estava relacionada com um pior prognóstico da doença [6]. O ácido úrico é o produto final do metabolismo de purinas e se acumula no plasma de humanos em níveis entre 50-400µM. A presença do ácido úrico em um ambiente inflamatório permite que este metabólito funcione como substrato para a enzima mieloperoxidase (MPO), produzindo novos oxidantes – hidroperóxido de urato e

radical de urato – que contribuem para um ambiente mais pró-oxidativo [8]. Tendo em vista essa sensibilidade aumentada frente ao HOCl e o contexto inflamatório de uma infecção bacteriana, procuramos elucidar o papel da proteína AhpC1 durante uma resposta desencadeada por PA14. Para isto, comparamos a sobrevivência e virulência de cepas WT e $\Delta ahpC1$ em neutrófilos purificados e em camundongos infectados com a cepa de PA14 na presença ou ausência de ácido úrico, elucidando o papel dessa proteína na detoxificação do H₂O₂ e outros oxidantes.

Metodologia

Cultura bacteriana: As cepas PA14 (WT, $\Delta ahpC1$ e $\Delta ahpC1::ahpC$) foram crescidas por 18h em meio LB à 37°C. A suspensão foi diluída para a DO_{625nm} = 0,1 até atingir a nova DO_{625nm} = 1,2, alcançando a fase de crescimento exponencial tardia.

Sobrevivência bacteriana frente aos oxidantes: As cepas PA14 (1×10^6 CFU/mL) foram incubadas com HOCl (5-50 μ M), H₂O₂ (0,01–4 mM) e H₂O₂ (5-100 μ M) em meio mínimo a 37°C. Após 30 minutos de incubação, a suspensão bacteriana foi diluída 200x em meio LB e plaqueada em placa LB agar. As placas foram mantidas a 30°C por 18h e a sobrevivência bacteriana estimada pela contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) residual. O cálculo de EC50 foi calculado no GraphPad Prism usando o log das concentrações ajustado para curva sigmoide de dose-resposta.

Coleta e purificação de neutrófilos de sangue periférico: Neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de pacientes saudáveis através do protocolo de centrifugação por gradiente, como consta a seguir [1]. Os neutrófilos purificados foram contados em Câmara de Neubauer através do método de exclusão com azul de trypan 0,2%.

Avaliação da atividade bactericida de neutrófilos: As cepas de PA14 foram diluídas em PBS-glicose e opsonizadas a 37°C por 20min com 10% de soro humano inativado. Em seguida, os neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram desafiados com as bactérias (1×10^7 CFU/mL) em MOI de 1:10 na presença ou ausência de ácido úrico (200 e 400 μ M), usando como controle o inibidor da MPO, 50 μ M de ABAH (ácido 4-aminobenzóico hidrazida) ou inibidor da NADPH oxidase, 1mM de APO (apocinina). Após 1h, 10% de Triton X-100 foi adicionado para lise das células. A suspensão foi diluída e plaqueada em MH agar. As placas foram mantidas a 30°C por 18h e a sobrevivência bacteriana estimada pela contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) residual.

Infecção intranasal em modelo animal: Foram utilizados camundongos machos com 8 semanas da linhagem C57BL/6. As cepas bacterianas foram cultivadas como descrito anteriormente e a infecção foi realizada pela via intranasal, utilizando salina estéril para o grupo controle. Após 24h, as análises histológicas foram realizadas. A contagem de células infiltradas no lavado broncoalveolar (LBA) foi realizada na câmara de Neubauer após a lise total das hemácias. Para identificação do infiltrado neutrofílico, o pulmão foi seccionado, fixado e parafinado, seguido da técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE). A quantificação em duplo-cego do número de neutrófilos por campo foi feita com auxílio do programa ImageJ. Para contagem de bactérias no pulmão, o órgão foi homogeneizado em tampão PBS e cultivado em placa de MH agar. Após crescimento overnight a 30°C, as unidades formadoras de colônia (CFU) foram contadas e expressas na forma de CFU/g de tecido.

Análise da sobrevivência animal: Após infecção via intranasal com as cepas bacterianas de PA14, os animais foram acompanhados por 15 dias para análise da sobrevivência. O grupo controle recebeu apenas salina estéril intranasalmente.

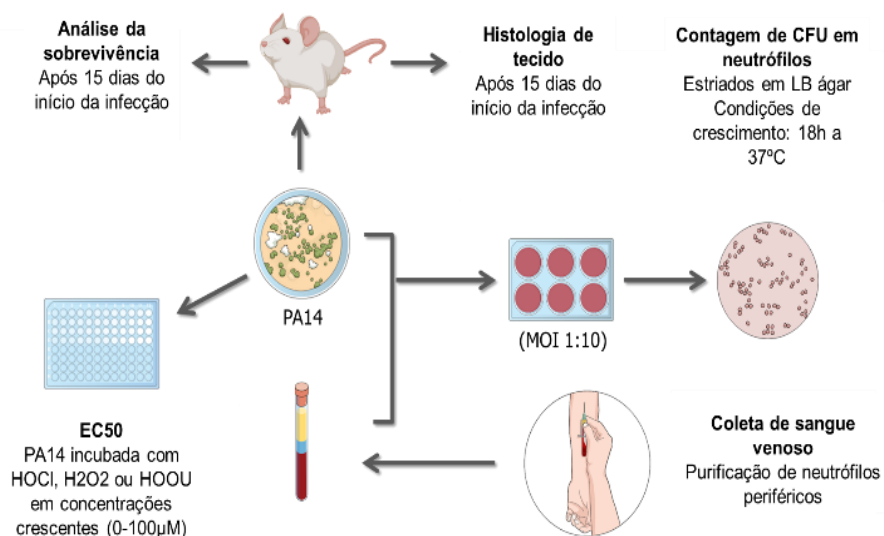


Fig 1. Esquema representativo da metodologia

Resultados e Discussão

Iniciamos a análise incubando as cepas PA14 WT e $\Delta ahpC1$ na presença do ácido hipocloroso (HOCl) a fim de calcular o EC50 referente à sobrevivência bacteriana. A cepa WT apresentou EC50 de 2,8 μ M de HOCl, enquanto que a cepa $\Delta ahpC1$ obteve EC50 de 21,5 μ M de HOCl. Para avaliar a capacidade de lidar com outros oxidantes produzidos no meio intracelular, incubamos essas cepas com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em que o perfil de sobrevivência também se mostrou alterado. A cepa $\Delta ahpC1$ apresentou uma redução expressiva do EC50 quando comparado ao grupo WT, com concentração de 91,8 μ M e 496,5 μ M, respectivamente. Além da cepa $\Delta ahpC1$, realizamos o ensaio de EC50 para H₂O₂ com uma nova cepa complementada, partindo da cepa mutante $\Delta ahpC1$ e inserindo novamente o gene que codifica para a proteína de interesse. A sensibilidade ao H₂O₂ dessa nova cepa $\Delta ahpC1::ahpC$ foi restabelecida para concentração de EC50 próximo a cepa WT, com contração de 660,3 μ M de H₂O₂. Considerando a presença do ácido úrico e, sabendo que ele pode ser substrato da enzima MPO para ser oxidado a hidroperóxido de urato (HOOU), decidimos avaliar o papel que esse oxidante assume na sobrevivência da bactéria. Quando incubadas com HOOU, a cepa WT não apresentou diferença em nenhuma concentração de HOOU aplicada (5-100 μ M), ao passo que a cepa $\Delta ahpC1$ apresentou uma redução na sobrevivência quando desafiadas com 5, 10 e 20 μ M de HOOU. O potencial microbicida de neutrófilos em relação às cepas de PA14 se mostrou diferente quando na presença ou ausência da proteína AhpC1. A cepa $\Delta ahpC1$ se mostrou mais sensível à ação microbicida dos neutrófilos do que a cepa WT, visualizado por um menor crescimento bacteriano após incubação com as células em modelo *in vitro*. Na presença do ácido úrico (200-400 μ M), ocorreu uma maior sobrevivência das cepas WT. Isso pode ser explicado pelo fato de que a enzima MPO utiliza o ácido úrico como substrato para produção de HOOU, diminuindo a ação do seu principal e mais potente microbicida, o HOCl. Como mostrado anteriormente, a incubação de bactérias WT com concentrações diferentes de HOOU não alterou a sobrevivência bacteriana, indicando que essa cepa é capaz de reduzir esse oxidante e lidar com o *burst* gerado dentro do grânulo neutrofílico. Já a cepa $\Delta ahpC1$, quando na presença de ácido úrico (200-400 μ M), teve uma redução significativa em sua sobrevivência. Além disso, mostramos que essa cepa mutante tem uma menor sobrevivência quando incubada com concentrações pequenas de HOOU (5-20 μ M), indicando que a proteína AhpC1 pode ter um papel fundamental na redução deste oxidante. Assim, a presença do ácido úrico e consequente produção do HOOU limita a sobrevivência bacteriana *in vitro* em células neutrofílicas.

Durante uma infecção *in vivo*, animais que foram infectados com as cepas WT e $\Delta ahpC1::ahpC$ tiveram maior mortalidade quando comparados aos animais não infectados ou infectados com $\Delta ahpC1$. A contagem de CFU das bactérias no tecido pulmonar do animal infectado se mostrou mais elevada no grupo infectado com a WT do que no grupo infectado com $\Delta ahpC1$, indicando uma maior infectividade da cepa selvagem. Analisando parâmetros de infiltrado inflamatório, constatamos que de fato a cepa $\Delta ahpC1$ promove um menor infiltrado de leucócitos e neutrófilos quando comparado com WT, indicando além de menor infectividade, uma menor virulência.

Conclusões

Esse trabalho demonstrou, pela primeira vez, o papel da proteína AhpC1 na virulência da *Pseudomonas aeruginosa*. AhpC1 se mostrou essencial na sobrevivência da bactéria exposta a diferentes oxidantes, podendo atuar diretamente na eliminação do ácido hipocloroso, o principal e mais potente microbicida produzido por neutrófilos. Dentro deste contexto inflamatório, a oxidação do ácido úrico à hidroperóxido de urato pela enzima MPO ocorre dentro dos neutrófilos. Sendo essa enzima também a responsável pela produção de ácido hipocloroso, a presença de altos níveis de ácido úrico leva a uma diminuição da produção de HOCl e aumento da produção de HOOU [7]. A proteína AhpC1 se mostrou também eficaz em reduzir o HOOU e garantir proteção à bactéria, visto nos experimentos em que a cepa $\Delta ahpC1$ apresentou uma maior sensibilidade tanto ao HOOU, quanto as células neutrofílicas na presença do ácido úrico. O papel dessa peroxidase foi comprovado também no modelo animal, já que a ausência dessa proteína permitiu a sobrevivência do animal e reduziu os parâmetros inflamatórios e reduziu a presença da bactéria no órgão primário de infecção. Assim, nossos resultados elucidam que o AhpC1 reage diretamente com o hidroperóxido de urato, ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio, contribuindo para sua redução e. Em conclusão, essa proteína tem um papel central na sobrevivência e virulência de *Pseudomonas aeruginosa* tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Referências bibliográficas

1. English, D. & Andersen, Br. 1974. **Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of ficoll-hypaque.** Journal of Immunological Methods, v. 5, p. 249-252.
2. Cystic Fibrosis Foundation, "**Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry**" 2018.
3. Dudley, Michael N., Jeff Loutit, and David C. Griffith. "**Aerosol antibiotics: considerations in pharmacological and clinical evaluation.**" Current Opinion in Biotechnology 19.6 (2008): 637-643
4. He, J., et al., **The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes.** Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(8): p. 2530-5.
5. Iiyama, K., et al., **Effect of superoxide dismutase gene inactivation on virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, Bombyx mori.** Appl Environ Microbiol, 2007. 73(5): p. 1569-75.
6. Akbar, Sr.; Long, Dm.; Hussain, K.; Alhajhusain, A.; Ahmed, Us.; Iqbal, Hi.; Ali, Aw.; Leonard, R. & Dalton C. 2015. **Hyperuricemia: and early marker for severity of illness in sepsis.** International Journal of Nephrology, v. 2015, p. 1-8.
7. Carvalho, Lac.; Lopes, Jppb.; Kaihami, Gh.; Silva, Rp.; Bruni-cardoso, A.; Baldini, Rl.; Meotti, Fc. 2018. **Uric acid disrupts hypochlorous acid production and the bactericidal activity of HL-60 cells.** Redox Biology, v. 16, p. 179-188.
8. Meotti, Fc.; Jameson, Gnl.; Turner, F.; Harwoold, Dt.; Stockwell, S.; Rees, Md.; Thomas, Sr. & Kettle, A. 2011. **Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for hyperuricemia and inflammation.** The Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 15, p. 2901-2911.
9. Kaihami, Gi.; Almeida, Jrf.; Santos, Ss.; Netto, Les.; Almeida, Sr. & Baldini, Lr. 2014. **Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence.** Plos Pathogens, v. 10, n. 10, p. 1-10