



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCO ITALO RODRIGUES GOMES

AVALIAÇÃO PROTEÔMICA E MECANISMOS DE AÇÃO DO PEPTÍDEO
SINTÉTICO PEPGAT CONTRA *Candida albicans*

FORTALEZA

2025

FRANCISCO ITALO RODRIGUES GOMES

AVALIAÇÃO PROTEÔMICA E MECANISMOS DE AÇÃO DO PEPTÍDEO
SINTÉTICO PEPGAT CONTRA *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de
Souza

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G614a Gomes, Francisco Italo Rodrigues.
Avaliação proteômica e mecanismos de ação do peptídeo sintético PepGAT contra *Candida albicans* /
Francisco Italo Rodrigues Gomes. – 2025.
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza.

1. Peptídeo sintético. 2. Proteômica. 3. *Candida*. 4. Mecanismo de ação. I. Título.

CDD 572

FRANCISCO ITALO RODRIGUES GOMES

AVALIAÇÃO PROTEÔMICA E MECANISMOS DE AÇÃO DO PEPTÍDEO
SINTÉTICO PEPGAT CONTRA *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Noronha Filho de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rossana Aguiar de Cordeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Marlene e Xavier.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais Marlene Rodrigues Dias da Silva e Francisco Xavier Gomes da Silva por todo amor inefável e incentivos para que eu realizasse meus estudos. Obrigado por acreditarem em mim e me mostrar a importância do caminho dos estudos. A saudade de vocês é imensurável, não vejo a hora de poder nos reencontrar. Amo muito vocês!

Ao meu Orientador Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza que foi uma verdadeira fonte de inspiração para meu mestrado, me mostrando visões críticas por meio da sua excelente orientação. Pela amizade e parceria dentro e fora da Universidade, me acolhendo e ensinando como um pai-irmão que a vida me deu. Sou eternamente grato por todos os momentos professor, você é um grande exemplo na minha vida!

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro e Felipe Pantoja Mesquita pelo tempo disponibilizado, pelas valiosas colaborações e sugestões que enriquecerá esse trabalho.

Aqueles que fazem do Farmagen ser a luz que é hoje: Prof. Dra. Raquel Montenegro, Prof. Dr. Pedro Souza, Prof. Dr. Felipe Mesquita, Dra Luína Benevides, Dr Emerson Lucena.

A todos os demais professores que contribuíram significativamente para a minha formação, em especial Prof. Dr. Cleverton Diniz, Prof. Dr. Rômulo Carneiro, Prof. Dr. Carlos Paier.

Aos meus queridos amigos que contribuíram de maneira imensurável para a realização desse trabalho. Em especial aos meus grandes amigos do DBBM: Tawanny, Nilton, João Neto, Queilane, Thayná, Vivi; aos meus amigos-irmãos do NPDM: Nicholas Filho, João Lucas, Pedro Lima. Vocês todos, além de ajudar diretamente para que esse trabalho fosse realizado, me ajudaram no essencial: acreditando em mim e apoiando em todos os momentos. Obrigado de coração.

Aos meus queridos amigos de turma de mestrado, pelos momentos de críticas construtivas e parceria em todo esse período de formação: Laís, Amanda, João Neto, Gabrielle, Augusto, Beatriz, Victor e Jochuan

A todos meus amigos integrantes de laboratório do Farmagen e Labis. Vocês foram uma família ao me acolher e serem presentes no meu dia a dia. Obrigado a todos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O verdadeiro tesouro não é ouro nem prata, mas o conhecimento e as experiências que acumulamos ao longo do caminho.” (Sivers Rayleigh).

RESUMO

A *C. albicans* é uma das principais espécies patogênicas em humanos, causando infecções oportunistas resistentes à diversas classes de antifúngicos, principalmente na classe dos azóis, polienos e equinocandinas. Dessa forma, a busca por novas alternativas terapêuticas torna-se necessária. Assim, os peptídeos antimicrobianos sintéticos surgem como alternativas promissoras, visto que apresentam baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Neste estudo, foi investigado os mecanismos de ação do peptídeo sintético PepGAT, bioinspirado na quitinase de *Arabidopsis thaliana*, contra *C. albicans*. Neste trabalho foi empregado uma análise proteômica para entender se o PepGAT induzia mudanças no perfil proteico das células de *C. albicans* que fornecesse informações sobre o efeito do PepGAT. Adicionalmente, foram realizadas análises de atividade enzimática, interação com ergosterol, permeabilidade da membrana, ensaio de efeito combinatório com antifúngico. A proteômica revelou uma alteração no perfil das células de *C. albicans* tratadas que afeta diversas vias importantes para o desenvolvimento das células bem como sua resistência à drogas. Além disso, o PepGAT diminuiu a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e aumentou a atividade da catalase (CAT), sugerindo um impacto no sistema redox das células. No ensaio de interação como ergosterol, as células tratadas com o PepGAT apresentaram uma perda de atividade, indicando uma possível interação do PepGAT com ergosterol exógeno. Na microscopia de fluorescência, houve um aumento da permeabilidade da membrana celular, o que foi evidenciado pela formação de poros de pelos menos 6 kDa. Além disso, ensaios de efeito combinatório demonstraram que o PepGAT potencializou a ação do ITR em determinadas concentrações. Esses dados indicam que o PepGAT apresenta múltiplos mecanismos de ação contra a *C. albicans*, enfatizando seu potencial como agente antifúngico alternativo.

Palavras-chave: peptídeo sintético; proteômica; candida; mecanismo de ação.

ABSTRACT

C. albicans is one of the main pathogenic species in humans, causing opportunistic infections that are resistant to various classes of antifungals, primarily azoles, polyenes, and echinocandins. Therefore, the search for new therapeutic alternatives is necessary. In this context, synthetic antimicrobial peptides emerge as promising alternatives, as they have a low probability of inducing antimicrobial resistance. In this study, the mechanisms of action of the synthetic peptide PepGAT, bioinspired by the chitinase of *Arabidopsis thaliana*, were investigated against *C. albicans*. A proteomic analysis was employed to determine whether PepGAT induced changes in the proteomic profile of *C. albicans* cells, providing insights into its effects. Additionally, enzymatic activity assays, ergosterol interaction studies, membrane permeability assessments, and combinatorial effect trial with antifungal were conducted. Proteomic analysis revealed alterations in the protein profile of *C. albicans* cells treated with PepGAT, affecting several key pathways involved in cell development and drug resistance. Moreover, PepGAT decreased the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) while increasing catalase (CAT) activity, suggesting an impact on the cellular redox system. In the ergosterol interaction assay, PepGAT-treated cells exhibited a loss of activity, indicating a possible interaction between PepGAT and exogenous ergosterol. Fluorescence microscopy showed an increase in cell membrane permeability, evidenced by the formation of pores of at least 6 kDa. Additionally, synergy assays demonstrated that PepGAT enhanced the action of ITR at certain concentrations. These findings indicate that PepGAT exhibits multiple mechanisms of action against *C. albicans*, highlighting its potential as an alternative antifungal agent.

Keywords: synthetic peptide; proteomics; candida; mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mecanismos de resistência de antifúngicos	18
Figura 2	– Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos	25
Figura 3	– Proteínas acumuladas em células de <i>C. albicans</i>	37
Figura 4	– Distribuição das proteínas sobrepostas entre o controle (DMSO) e tratadas (PepGAT) de células de <i>C. albicans</i>	38
Figura 5	– Distribuição das proteínas do controle (DMSO) de células de <i>C. albicans</i> ...	39
Figura 6	– Distribuição das proteínas de células de <i>C. albicans</i> tratadas com o PepGAT.....	40
Figura 7	– Porcentagem de inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> na presença de ergosterol	48
Figura 8	– Atividades enzimáticas do sistema redox	50
Figura 9	– Microscopia de fluorescência mostrando formação de poros em célula de <i>C. albicans</i> tratadas (PepGAT) e não tratadas (Controle)	52
Figura 10	– Efeito combinatório de células de <i>C. albicans</i> tratadas com PepGAT e ITR	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Algumas propriedades físico-químicas do peptídeo sintético PepGAT	20
Tabela 2	– <i>Overlapping</i> de proteínas em células do controle e tratadas de <i>C. albicans</i> analisadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Resistência antimicrobiana no cenário atual	15
2.2	Evolução dos mecanismos de resistência dos fungos	16
2.3	Fungos patogênicos de humanos	19
2.4	O gênero <i>Candida</i> e sua relevância clínica.....	20
2.5	Peptídeos antimicrobianos e suas características	22
2.5.1	<i>Mecanismos de ação dos PAMs</i>	22
2.6	Peptídeos antimicrobianos sintéticos	24
2.7	Peptídeo sintético inspirado a partir de quitinase de <i>A. thaliana</i>	25
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo geral	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	Material biológico	29
5.2	Peptídeo sintético	29
5.3	Atividade antifúngica	29
5.4	Extração proteica	29
5.5	Espectrometria de massas.....	30
5.6	Identificação das proteínas	30
5.7	Interação com Ergosterol	31
5.8	Atividade enzimática do sistema redox	31
5.8.1	<i>Catalase (CAT)</i>	31
5.8.2	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	31
5.9	Ensaio de formação de poros na membrana	32
5.10	Ensaio de efeito combinatório	32
5.11	Análises estatísticas	33
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1	Perfil proteômico de células de <i>C. albicans</i> tratadas com PepGAT.....	34

6.1.1	<i>Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios</i>	38
6.1.2	<i>Proteínas relacionadas ao metabolismo energético</i>	40
6.1.3	<i>Proteínas relacionadas a função de transporte e estrutura celular</i>	40
6.1.4	<i>Proteínas relacionadas a sinalização ou regulação</i>	41
6.1.5	<i>Proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos nucleicos e carboidratos</i> ...	43
6.1.6	<i>Proteínas relacionadas a patogenicidade</i>	44
6.2	Atividade antimicrobiana e interação com ergosterol	45
6.3	Ensaio de atividades enzimáticas	47
6.4	Permeabilidade da membrana celular.....	48
6.5	Atividade combinatório com ITR	50
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO A – TABELA SUPLEMENTAR 1	65
	ANEXO B – TABELA SUPLEMENTAR 2	74
	ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO 1	78
	ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO 2	79
	ANEXO E –ARTIGO CIENTÍFICO 3	

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas representam um crescente desafio global à saúde, com cerca de 150 milhões de infecções anualmente e 1,7 milhões de mortes por ano (MUDENDA; MUDENDA, 2024). Particularmente aquelas causadas por *C. albicans* representam uma ameaça mundial significativa, sendo o patógeno predominante em aproximadamente 50% dos casos (PARAMBATH et al., 2024; QUINDÓS, 2014). Além dos impactos na saúde, a resistência antifúngica também impõe um ônus econômico significativo devido ao prolongamento das internações hospitalares e à necessidade de terapias mais complexas (BATISTA et al., 2024; WHITNEY et al., 2019).

Entre as principais classes de antifúngicos disponíveis, os azóis, são amplamente utilizados no tratamento de infecções por *Candida spp.* (WHALEY et al., 2017a). No entanto, a crescente resistência a esses fármacos, mediada por mecanismos como superexpressão de bombas de efluxo, modificações na membrana celular, mutações em genes-alvo e formação de biofilme, tem reduzido sua eficácia clínica (ARAÚJO et al., 2024; FAN et al., 2022).

Diante desse cenário, o uso de peptídeos antimicrobianos (PAMs) surge como uma promissora estratégia terapêutica devido ao seu amplo espectro de ação e menor propensão ao desenvolvimento de resistência microbiana. Esses peptídeos atuam, principalmente, por meio da interação com a membrana celular do patógeno, causando alterações na permeabilidade, induzindo a morte celular (LIMA et al., 2021). No entanto, PAMs naturais podem apresentar limitações, como alta toxicidade para células do hospedeiro, baixa estabilidade, meia-vida curta devido à degradação proteolítica (SARKAR; CHETIA; CHATTERJEE, 2021). Dessa maneira, o uso de peptídeos sintéticos pode evitar essas desvantagens. Atualmente, com auxílio da bioinformática, o desenho de peptídeos sintéticos permite uma otimização nas propriedades físico-químicas, aumentando a eficácia antimicrobiana, reduzindo efeitos indesejados e redução de custos (CARDOSO et al., 2020; CHEN et al., 2022).

Neste estudo, foi avaliado o mecanismo de ação do peptídeo sintético PepGAT contra *C. albicans*, investigando seus mecanismos de ação por meio de análises proteômicas, interação com ergosterol, ensaios de permeabilidade de membrana, atividade enzimática e testes de efeito combinatório com itraconazol. Os resultados contribuirão para o entendimento do potencial terapêutico do PepGAT e sua aplicação como alternativa no tratamento de infecções fúngicas resistentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resistência antimicrobiana no cenário atual

Nos últimos anos, a resistência aos medicamentos antimicrobianos tem se apresentado como uma emergente preocupação para saúde global, colocando em alerta a efetividade dos tratamentos destinados a combater as mais variedades de infecções causadas por agentes patogênicos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas (MAGALHÃES et al., 2025). A resistência antimicrobiana (RAM) compromete os efeitos das terapias medicamentosas resultando em infecções mais persistentes, além de aumentar a probabilidade de transmissão dessas doenças em áreas hospitalares (BATISTA et al., 2024). Além disso, a RAM torna mais difíceis intervenções médicas essenciais, como operações cirúrgicas, transplantes e tratamentos de quimioterapia, pois esses tratamentos possuem uma demanda crucial de fármacos antimicrobianos eficazes para prevenir infecções durante os procedimentos (RIBEIRO et al., 2024).

O fenômeno da resistência é algo natural e inevitável, ocorrendo geralmente quando os microrganismos sofrem mudanças em seu material genético, conferindo-lhes a capacidade de sobreviver aos medicamentos criados, a fim de eliminá-los (MUNITA; ARIAS, 2016). Contudo, a aquisição de resistência pode também ser influenciada por maneira não natural, destacando-se o uso indiscriminado e inadequado de fármacos, a prática de automedicação e a falha em seguir corretamente os regimes de tratamento prescritos (SOUZA et al., 2024)

A RAM é particularmente preocupante em infecções fúngicas, onde as opções terapêuticas já são limitadas. Em estudos recentes, fungos como *Candida auris* já demonstraram ser multirresistente a três das principais classes de antifúngicos comercializados, incluindo os azóis, as equinocandinas e os polienos (ARIKAN-AKDAGLI et al., 2018). Essa resistência multifatorial dificulta o tratamento de infecções fúngicas invasivas, onde em um outro levantamento, relatou que a mesma espécie apresentou infecções com uma taxa de mortalidade em cerca de 39% (CHEN et al., 2020).

Estima-se que até em 2050, se não for adequadamente tratada, cerca de 10 milhões de pessoas morrerão anualmente por consequências da RAM, ameaçando superar até mesmo o câncer como principal causa de mortalidade (CASTILHO et al., 2024; ROBINSON et al., 2023). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem liderado a criação de planos de ação internacionais que orientam os esforços nacionais e regionais para o

controle da resistência (SILVA et al., 2020; VÁZQUEZ-CABRERA et al., 2023). Esses planos incluem ações para otimizar o uso de antimicrobianos, aumentar a conscientização pública, reforçar a vigilância epidemiológica e fomentar a inovação na pesquisa de novos tratamentos. Países do mundo todo são incentivados a alinhar suas políticas nacionais com essas diretrizes globais, para conter e, eventualmente, erradicar a resistência (SHRIVASTAVA et al., 2018).

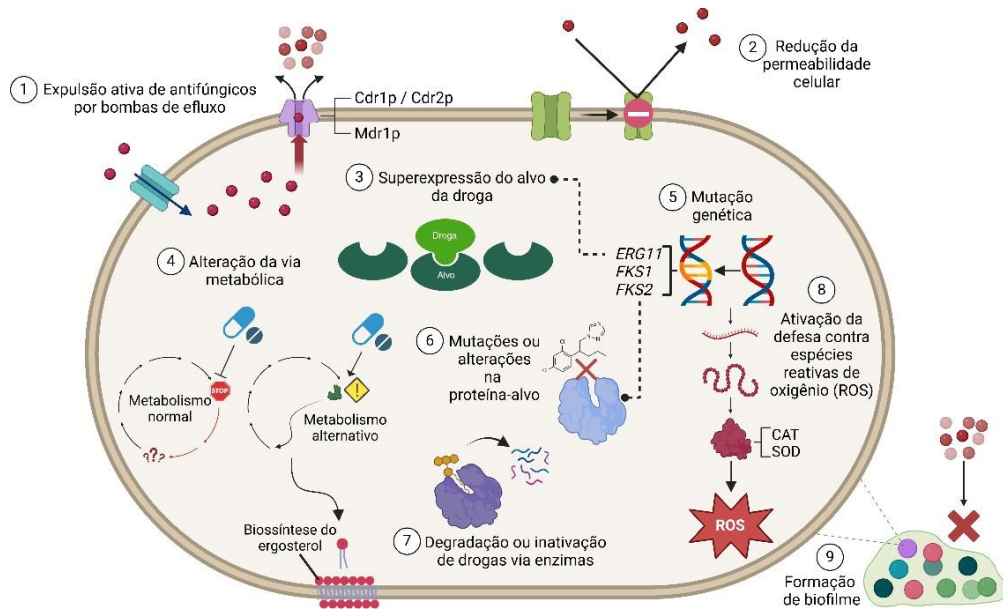
Contudo, os efeitos da RAM não se limitam à área da saúde, pois a resistência também impacta significativamente o planeta como um todo (ISLAM et al., 2019). O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e agricultura gera uma pressão seletiva e acelera o surgimento e a disseminação de patógenos resistentes também. Estudos indicam que aproximadamente 80% dos antibióticos comercializados apresentam uso indiscriminado em animais de produção (WESGUERBER et al., 2024).

Em síntese, a resistência aos antimicrobianos representa um verdadeiro desafio de saúde pública urgente, onde exige respostas rápidas e ações mais sustentáveis por diferentes entidades competentes. O uso do modelo *One Health* enfatiza a importância da colaboração e coordenação entre a saúde humana, animal e ambiental para enfrentar desafios complexos como a resistência aos antibióticos (CELLA et al., 2023). A conscientização da população, a educação de profissionais da saúde e as mudanças comportamentais nas abordagens industriais são essenciais para reduzir o uso indevido de antimicrobianos e garantir que os medicamentos existentes continuem sendo eficazes (FARIAS et al., 2024; PREMANANDH et al., 2016). Ao mesmo tempo, a inovação e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas serão cruciais para superar os desafios impostos pela resistência antimicrobiana, tanto no presente quanto no futuro.

2.2 Evolução dos mecanismos de resistência dos fungos

A resistência dos fungos a agentes antifúngicos é um fenômeno crescente que tem desafiado a medicina moderna. A evolução desses mecanismos de resistência é impulsionada por pressões seletivas, como o uso excessivo de antifúngicos em ambientes clínicos e agrícolas (AZEVEDO et al., 2015). Ao longo dos anos, fungos patogênicos desenvolveram uma variedade de estratégias para sobreviver na presença de agentes antifúngicos (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismos de resistência de antifúngicos



Fonte: elaborada pelo autor

Uma das principais adaptações são a superexpressão de bombas de efluxo, que são proteínas de transporte que expulsam os antifúngicos para fora da célula, reduzindo sua concentração intracelular e, conseqüentemente, sua eficácia. Esse mecanismo é particularmente relevante em espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*, que frequentemente exibem resistência a múltiplos fármacos (PARRA; CÁRDENAS, 2020; RAMAGE et al., 2002).

Um outro mecanismo consiste na diminuição da permeabilização da membrana celular, evitando assim, a estrada de drogas antifúngicas. Por exemplo, em *C. albicans* foi observado que alterações em sua composição lipídica da membrana foi crucial para a formação de biofilmes resistentes às drogas (ALIM et al., 2018). Paralelamente, em *C. auris* alterações feitas nos lipídios da membrana, incluindo a biossíntese de ergosterol, estão associadas a resistência à anfotericina B (SHIVARATHRI et al., 2022).

Alterações em vias metabólicas naturais também surge como uma das adaptações feitas por fungos para contornar o ataque de drogas intracelulares. Dessa maneira, ao contornar todo metabolismo, o fungo ativa vias alternativas visando mitigar o efeito do fármaco. Alguns fungos, como *Mucor circinelloides*, podem alterar suas vias biossintéticas de ergosterol, levando à produção de esteróis alternativos, o que confere uma resistência contra medicamentos como anfotericina B e azóis (NAVARRO-MENDOZA et al., 2024).

Por ora, uma outra estratégia abordada consiste na superexpressão de enzimas-alvo, como forma de neutralizar a ação dos antifúngicos ao diluir sua capacidade de inibição, de modo que a concentração do fármaco disponível intracelularmente seja insuficiente para exercer uma atividade favorável. Por exemplo a superexpressão do gene *MDR1*, que codifica uma proteína transportadora da membrana, é superexpresso em muitos isolados clínicos resistentes ao fluconazol, resultando em redução do acúmulo intracelular de fluconazol. (MISHRA et al., 2007; MORSCHHÄUSER, 2002).

Outros dois mecanismos de resistência envolvem mutações nos genes que codificam os alvos moleculares dos antifúngicos ou modificação da estrutura de proteínas reduzindo a afinidade com medicamento. Por exemplo, mutações no gene *ERG11*, que codifica a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, conferem resistência aos azóis, uma classe amplamente utilizada de antifúngicos (FLOWERS et al., 2015; XIANG et al., 2013). Essas mutações reduzem a afinidade do fármaco pela enzima, impedindo sua ação inibitória sobre a síntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica.

Além disso, a transferência horizontal de genes entre diferentes espécies de fungos pode contribuir para a disseminação de genes de resistência. Esse fenômeno foi observado no patógeno *Aspergillus fumigatus*, onde este fungo adquiriu resistência a triazóis através da transferência horizontal do gene *cyp51A*. Os pesquisadores identificaram que essa transferência pode ocorrer tanto por meio de cromossomos quanto de plasmídeos, especialmente sob condições de estresse ambiental ou infecções (MOROGOVSKY et al., 2022).

Alguns fungos produzem enzimas “detoxificantes” como um mecanismo de resistência, onde por meio da biotransformação adicionam grupos funcionais químicos que reduzem a atividade de drogas antifúngicas. Essas mesmas enzimas também podem apresentar uma capacidade de degradação a esses medicamentos, conferindo uma maior resistência e aumentando suas chances de sobrevivência (AKROUT et al., 2024; OLICÓN-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Os fungos desenvolveram mecanismos importantes para combater o estresse oxidativo. Em ambientes assim, eles recrutam enzimas antioxidantes como a superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT) e peroxidases para desintoxicar espécies reativas de oxigênio (EROS). Esse mecanismo adaptativo é crucial para sua sobrevivência em diversos ambientes hostis, influenciando no seu crescimento perante às adversidades e na sua patogenicidade (GOSTINČAR et al., 2018; ZHANG; FENG, 2018).

Por fim, a formação de biofilmes também desempenha um papel crucial na

resistência fúngica. Os biofilmes são comunidades microbianas envolvidas em uma matriz extracelular que protege os fungos de choques mecânicos, ação de antifúngicos e do sistema imunológico do hospedeiro, tornando as infecções mais difíceis de serem curadas (COSTA-ORLANDI et al., 2017). Essa estrutura complexa dificulta a penetração dos fármacos e cria microambientes que favorecem a sobrevivência e a proliferação desses microrganismos (FANNING; MITCHELL, 2012).

A evolução dos mecanismos de resistência dos fungos é um processo dinâmico e contínuo, influenciado por fatores genéticos, ambientais e clínicos. A compreensão desses mecanismos se torna essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para a implementação de medidas de controle que possam mitigar os impactos causados da resistência fúngica como um todo (ARAÚJO et al., 2024).

2.3 Fungos patogênicos de humanos

Os fungos causam diversas doenças em seres humanos, como micoses superficiais que afetam a integridade da pele até infecções sistêmicas comprometendo os órgãos internos. Essas infecções são um grande problema pra saúde da população no geral. A falta de um manejo adequado nos tratamentos de infecções pode apresentar um alto risco a pessoas imunocomprometidas, como portadores de HIV, recém transplantados e aquelas que estão em tratamento quimioterápico (RODRIGUES et al., 2023).

As infecções fúngicas afetam anualmente cerca de 1 bilhão de pessoas em infecções superficiais na pele, cabelos e unhas, enquanto infecções em mucosas orais ou vaginais podem afetar cerca de dezenas de milhões. Já as doenças fúngicas mais graves e invasivas afetam cerca de 150 milhões. Mesmo assim, apesar de representarem uma ameaça crescente para a saúde humana, de maneira global, as infecções fúngicas ainda recebem pouca atenção e disponibilização de recursos (BONGOMIN et al., 2017).

Atualmente, existem quatro classes de antifúngicos utilizados para tratar infecções clínicas, dentre eles: os azóis, as equinocandinas, os polienos e os análogos de pirimidina (VANREPELEN et al., 2023). Apesar da eficácia dos antifúngicos atualmente disponíveis, a utilização desses medicamentos está repleta de desafios. Esses medicamentos, embora muito eficazes no tratamento de infecções fúngicas, frequentemente estão acompanhados de uma enorme gama de efeitos colaterais indesejados, o que podem comprometer bastante o bem-estar do paciente. Além disso, a administração de terapias medicamentosas exige conhecimento especializado, uma vez que as interações medicamentosas são bastante comuns, tornando o

tratamento ainda mais complexo (NIAZI-ALI et al., 2021).

A recente pandemia do coronavírus (COVID-19) está associada a um grande aumento de infecções fúngicas. Isso porque durante os anos de 2020 a 2022, com o aumento do uso de antimicrobianos não apenas favoreceu o surgimento de cepas resistentes, como também alterou a microbiota dos pacientes tratados (SOUZA et al., 2023). Dessa forma, após a COVID-19, muitos relatos tem mostrado consequências devastadoras por doenças causadas por três grandes grupos, a aspergilose, mucormicose e candidemia (KAYAASLAN et al., 2021; RAMOS et al., 2022; RAUT; HUY, 2021).

Em 2022 a Organização Mundial da Saúde (OMS) postou um relatório informando espécies de fungos que são preocupantes à saúde humana. Em uma lista contando 19 espécies, os fungos foram classificados em grupos de prioridade levando em consideração a aumento de casos de resistência e infecções globais. No grupo mais crítico de prioridade, quatro espécies foram consideradas, sendo elas o *Cryptococcus neoformans*, *A. fumigatus* e duas espécies do mesmo gênero: *C. auris* e *C. albicans* (WHO, 2022).

2.4 O gênero *Candida* e sua relevância clínica

Em se tratando especificamente de fungos do gênero *Candida*, eles podem ser encontrados na forma de levedura, pseudo-hifas ou hifas, sendo essa última forma considerada a sua forma mais virulenta. Esses seres podem ser encontrados em diversos ambientes, sejam eles em meios aquáticos, em solos e em hospedeiros animais, como o ser humano. Nos seres humanos, são constituintes da microbiota natural e vivem simbioticamente na mucosa bucal e gastrointestinal (PÉREZ, 2021). Contudo, apesar de serem fungos comensais, podem virar patógenos oportunistas quando a imunidade do hospedeiro decai e gerar diversas doenças infecciosas. As patologias causadas por suas espécies variam entre candidíase oral, vaginal, orofaríngea, onicomicose e sistêmica (KHODADADI et al., 2021).

Estima-se que cerca de 90% de todas as infecções fúngicas relatadas estejam ligadas às espécies do gênero *Candida* (LEITE-JÚNIOR, 2023). Sendo que esse gênero compreende mais de 160 espécies, sendo 10 consideradas patógenos humanos. Por conseguinte, as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* representam cerca de 90% dos casos de candidíase na população geral (ROCHA et al., 2021).

A *C. albicans* é a espécie mais comum do gênero e mais bem estudada, ela é a responsável pela maioria das infecções fúngicas invasivas. Na literatura mostra que essa espécie

tem a capacidade de alterar sua morfologia leveduriforme para forma de pseudo-hifas ou hifas. Esse processo de morfogênese a torna mais virulenta, aumentando significativamente a sua capacidade de acesso a diferentes regiões do hospedeiro como a membrana de mucosas e até a corrente sanguínea (CHOW et al., 2021; JOSHI et al., 2022).

C. glabrata é um patógeno oportunista que costuma ocasionar infecções superficiais e fatais em hospedeiros imunocomprometidos. Sendo considerada uma das quatro espécies de *Candida spp.* que mais causa infecções nos seres humano afetando cerca de 13 milhões de mulheres com candidíase vulvovaginal (DENNING, 2024). Além disso, um ponto curioso é que, ao contrário de outras *Candida spp.*, a *C. glabrata* não possui capacidade de mudar sua morfologia para hifas (KUMAR et al., 2019).

A *C. parapsilosis* é considerada a segunda espécie do gênero *Candida* que mais causa infecções. Se destacando por uma espécie frequentemente encontrada em pacientes imunocomprometidos e pacientes com implantes cirúrgicos permanentes, essa característica é devida a sua excelente capacidade em formar biofilmes nesses dispositivos médicos (BRANCO et al., 2023).

C. tropicalis é um patógeno oportunista comumente encontrada na natureza, sendo um colonizador frequente da pele humana, cavidade oral e trato digestivo (GÓMEZ-GAVIRIA et al., 2022). Prevalentemente em regiões tropicais, foi relatado que essa espécie tem sido a principal responsável por causas de candidemia na Argélia devido o aumento de RAM (MEGRI et al., 2020).

A *C. krusei* é frequentemente encontrada em ambientes naturais como solos, alimentos, frutas e vegetais. Se destaca por ser um patógeno que apresenta uma resistência intrínseca ao antifúngico de primeira linha, fluconazol (ZHENG et al., 2024). Além disso, apresenta uma rápida capacidade de adquirir resistência a outros antifúngicos (JAMIU et al., 2021).

Por fim, a *C. auris*, um patógeno emergente e que tem causado uma preocupação global. Considerado um dos fungos “super-resistentes”, se destaca por apresentar multirresistência as mais diversas classes de antifúngicos, como os azóis, os polienos e as equinocandinas (BALAN et al., 2023; CHEN et al., 2020). Essas características fazem com que ocorra pequenos surtos em áreas hospitalares. Além disso, é capaz de persistir nas enfermarias, o que facilita sua disseminação dificultando o controle de infecções (PEREIRA et al., 2022).

2.5 Peptídeos antimicrobianos e suas características

A fim de combater as infecções causadas pelos microrganismos e a resistência aos antimicrobianos, há uma necessidade global da criação de novas drogas terapêuticas capazes de tratar infecções (ADEGOKE et al., 2016). Dentre as mais diversas alternativas, a prospecção e utilização de moléculas naturais tem se tornado um atrativo para criação de novas drogas eficazes. Esse é o caso dos peptídeos antimicrobianos (PAMs)(LIMA et al., 2021).

O uso de PAMs em abordagens terapêuticas é reforçada devido as mais diversas vantagens que eles apresentam. Uma delas é o amplo espectro que essas moléculas apresentam contra os mais diferentes tipos de microrganismos e outra é que um de seus alvos são as membranas celulares dos microrganismos, o que torna a aquisição da resistência antimicrobiana muito mais difícil de acontecer (GHOSH; HALDAR, 2015; LIMA et al., 2021).

Constituídos basicamente por moléculas pequenas, com cerca de 10 a 20 resíduos de aminoácidos, os PAMs costumam apresentar algumas características que são essenciais que conferem a eles a capacidade de interagir com membranas. Uma dessas características consiste na presença de uma carga líquida final positiva devido a presença de dois aminoácidos comuns, como a arginina e a lisina, o que torna fundamental para interagir com a membrana de microrganismos onde costumam apresentar uma carga negativa (OLIVEIRA et al., 2019). Outra característica importante é presença de aminoácidos que possuem grupos hidrofóbicos, visto que ao apresentar um determinado percentual de hidrofobicidade, é comprovado que tendem a interagir melhor com membranas celulares, respondendo justamente um de seus mecanismos de ação principal. Por outro lado, a presença de vários grupos carregados positivamente pode apresentar baixa seletividade e toxicidade ao hospedeiro (KANG et al., 2017; LIMA et al., 2021; ZHANG; GALLO, 2016).

Os PAMs possuem diversas estruturas secundárias, variando desde estruturas lineares, folhas β , e α hélices. Essa diversidade estrutural está diretamente relacionada à sua atividade biológica. As estruturas de folha β é caracterizada pela formação estável conferida pelas pontes dissulfetos entre os aminoácidos de cisteína (LIMA et al., 2021). Por outro lado, as α hélices são caracterizadas principalmente por apresentarem uma estrutura cilíndrica e anfipática, com forte presença de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos(HADIANAMREI et al., 2022).

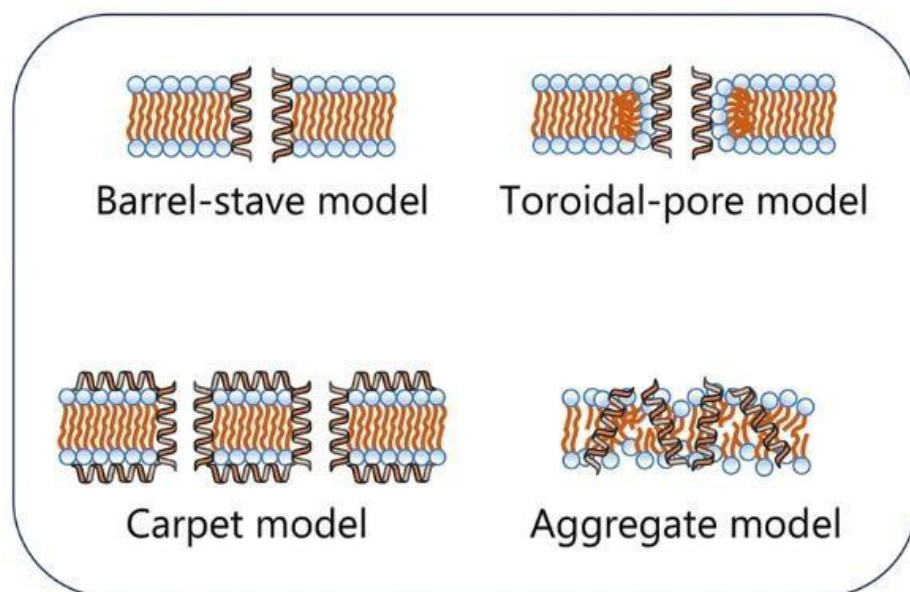
2.5.1 Mecanismos de ação dos PAMs

Como já relatado, a atividade antimicrobiana dos PAMs se dá através de uma

variedade de mecanismos, sendo os mais comuns a interação com membranas ou parede celular e a formação de poros. Essas interações são características que estão diretamente ligadas pela carga positiva dos PAMs, que se liga eletrostaticamente a fosfolipídios carregados negativamente na membrana microbiana. Além disso, a natureza anfipática dos PAMs facilita sua inserção na bicamada lipídica, levando à formação de poros, desestabilização da membrana e lise celular (AKBARI et al., 2018).

Seguindo por esse princípio, na literatura há quatro hipóteses de como os PAMs interagem com a membrana celular para fazer os poros (Figura 2). Dentre eles, podemos destacar o modelo barril onde os peptídeos se inserem na membrana de forma perpendicular (como ripas de um barril) devido aos seus grupamentos hidrofóbicos e ao mesmo tempo interagem entre si formando um canal transmembrana. Outro modelo parecido é o de polo toroidal, aqui os peptídeos não interagem diretamente entre si, mas sua parte hidrofóbica interage com a parte apolar dos fosfolipídios da membrana, enquanto a sua parte hidrofílica interage com o grupo hidrofílico. Tais interações peptídeo-membrana fazem com que gere uma curvatura e um poro também seja formado. Ao contrário do modelo anterior, nesse modelo os lipídeos das membranas participam da estrutura do poro causado também extravasamento celular (LIMA et al., 2021; SEYFI et al., 2020).

Figura 2 – Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos



Fonte: (ZHANG, 2021) (com modificações).

No modelo de carpete, os peptídeos vão interagindo e acumulando de maneira alinhada paralelamente com a membrana celular e, quando chegam em um determinado ponto crítico, eles desestabilizam a estrutura da membrana degradando-a, como se fosse um detergente, assim promovem uma desnaturação que aos poucos geram a formação de micelas que causarão a remoção parcial de pedaços da membrana, até a sua destruição completa ocasionando lise celular (BOGDANOVA et al., 2020).

Por último, tem o modelo formação de agregados onde à medida que os peptídeos vão se acumulando na membrana, ocorre inserções dos peptídeos para dentro da bicamada lipídica. Essas inserções geram agregados desordenados de peptídeo-fosfolipídio. Assim, essas estruturas conseguem atravessar a membrana celular levando consigo pequenos grupo dos fosfolipídios e desestabilizam a membrana, causando lise celular por conta da fragilização de sua estrutura (YAN et al., 2021).

Apesar desses mecanismos acima supracitados, os PAMs também podem atuar em outros componentes celulares que não seja necessariamente a membrana. Como por exemplo os ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e organelas. Um desses modelos é o peptídeo indolicidina que ataca alvos no DNA e interfere a replicação celular (GHOSH et al., 2014). A defensina HNP-1 por exemplo, induz a morte celular por apoptose ao interferir na função básica da mitocôndria, uma organela extremamente importante para o metabolismo energético (NAGAOKA et al., 2012). Alguns trabalhos também relataram que os PAMs podem também causar danos celulares ao induzirem acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) no interior da célula. Esse acúmulo interfere no equilíbrio redox celular causando danos e várias estruturas, como proteínas e ácidos nucleicos (AGUIAR et al., 2023; SOUZA et al., 2020a).

2.6 Peptídeos antimicrobianos sintéticos

O uso de PAMs naturais é uma grande descoberta para o combate de infecções de microrganismos patogênicos persistentes. Porém os PAMs de origem natural possuem alguns obstáculos que os tornam menos eficazes em determinadas situações. Dentre elas pode-se destacar a citotoxicidade, baixa estabilidade estrutural, fácil degradação por meio de proteases, baixa solubilidade e até interações com alvos indesejados (RODRÍGUEZ et al., 2021). Além dessas limitações intrínsecas, um outro ponto relevante é que a sua obtenção por fontes naturais se torna muito onerosa, pois geralmente apresentam dificuldades nos processos de purificação e um rendimento final muito baixo, tornando-os inviáveis para produção em larga escala e, conseqüentemente, um custo financeiro massivo para sua obtenção (OLIVEIRA et al., 2019).

Contudo, como forma de contorno dessas limitações, a produção de peptídeos sintéticos antimicrobianos se torna uma excelente aliada. Por meio dos avanços da bioinformática, os PAMs sintéticos podem ser desenhados e até bioinspirados em peptídeos naturais. A vantagem aqui se dá pelo fato de os peptídeos sintéticos possuírem versões modificadas e projetadas por meio de *softwares*, que visam melhorias na sua estabilidade, redução de grupamentos que podem gerar efeitos tóxicos, troca de aminoácidos indesejados, além de permitir a edição de fatores essenciais como carga líquida, hidrofobicidade, estrutura secundária e realizar predições em ensaios *in silico* do seu potencial antimicrobiano. Dessa maneira, os PAMs sintéticos representam uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas. Com os avanços da biotecnologia e da química de proteínas, eles oferecem um grande potencial no tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos (LIMA et al., 2021; SOUZA et al., 2020b).

2.7 Peptídeo sintético inspirado a partir de quitinase de *A. Thaliana*

Em trabalhos anteriores, o nosso grupo de pesquisa desenhou e sintetizou alguns peptídeos com potencial antimicrobiano bioinspirados em uma proteína quitinase de *A. thaliana*. Esse trabalho gerou o peptídeo PepGAT (GATIRAVNSR), que em ensaios do mesmo trabalho identificou potencial antimicrobiano em *C. albicans* e a bactéria *Salmonella enterica* (SOUZA et al., 2020a).

A sequência proteica da quitinase bioinspirada foi extraída do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Contudo, graças a *softwares* gratuitos para modelagem computacional, os peptídeos foram desenhados de maneira racional aplicando alguns critérios chaves para conferir uma boa atividade antimicrobiana. Esses parâmetros (Tabela 1) consistiam em carga líquida positiva, percentual de hidrofobicidade, índice de Boman $\leq 2,5$; além da obtenção da estrutura 3D desses peptídeos; parâmetros como Tm e sOPEP também foram obtidos pelo *software* PEP-FOLD (SOUZA et al., 2020a).

Tabela 1. Algumas propriedades físico-químicas do peptídeo sintético PepGAT.

Propriedades	PepGAT
⁶ Sequência	GATIRAVNSR
¹ Massa molecular calculada (Da)	1044,18
² Massa molecular experimental (Da)	1044,90
³ pI	12.00
¹ Índice de Boman	2.19
¹ Razão hidrofóbica (%)	40
¹ Carga Líquida	+ 2
⁴ Gráfico de Ramachandran (%)	98
⁵ Tm	0,360
⁵ OPEP	-7,39

Fonte: Souza et al. (2020)

¹Calculado usando o banco de dados de peptídeos antimicrobianos.

²Dados obtidos por espectrometria de massa conduzida

³Calculado usando ExPASy ProtParam.

⁴Obtido usando Rampage.

⁵Obtido por Half Life Prediction;

3 HIPÓTESE

O peptídeo sintético PepGAT exerce sua atividade contra *C. albicans* através da alteração do perfil proteômico das células afetando funções vitais para a vida celular.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de ação do peptídeo sintético PepGAT contra *C. albicans in vitro* investigando seu potencial na atividade antimicrobiana.

4.2 Objetivos específicos

Realizar uma análise proteômica para identificar alterações no perfil proteico das células de *C. albicans* após a exposição com o PepGAT

Determinar a atividade antifúngica do PepGAT contra *C. albicans* por meio da avaliação da inibição e crescimento celular;

Investigar o mecanismo de interação do peptídeo PepGAT com a membrana celular de *C. albicans*;

Elucidar os efeitos causados pelo PepGAT no metabolismo redox das células fúngicas;

Avaliar a formação de poros na membrana celular da *C. albicans* por meio da microscopia de fluorescência;

Investigar os efeitos combinatórios entre o PepGAT e o itraconazol.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material biológico

A cepa de *C. albicans* (ATCC 10231) foi obtida no Laboratório de Bioinformática Aplicada à Saúde do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

5.2 Peptídeo sintético

O peptídeo sintético PepGAT (SOUZA et al., 2020a) foi sintetizado quimicamente pela empresa *ChemPeptide* (Xangai, China) com pureza >98%.

5.3 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi feita segundo a metodologia descrita anteriormente (DIAS et al., 2020). Inicialmente a cepa de *C. albicans* foi cultivada em placas de petri contento meio Sabouraud Dextrose Ágar, por 24h à 37 °C. Posteriormente, uma colônia da levedura foi transferida para meio Sabouraud Dextrose líquido. Após 24h, as células foram padronizadas a $(2,5 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1})$. Em seguida, uma alíquota de 50 μL das células suspensas de *C. albicans* foi misturada com 50 μL do peptídeo PepGAT na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A mistura foi feita em placa de 96 poços e incubada a 37 °C por 24h. Após esse período, o crescimento celular foi mensurado por meio da absorbância de um leitor de microplacas à 600 nm (Epoch, Biotek, Santa Clara, CA, USA). Cada ensaio foi realizado em triplicata e o controle negativo foi a solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M.

5.4 Extração proteica

Para obtenção do extrato proteico, foi obtido 1 mL de cada amostra conforme exposto acima na etapa de atividade antifúngica. Em seguida, como descrito por Branco et al. (2022), foram realizadas três lavagens para remoção de excesso do meio com 500 μL de solução de tampão acetato (500 mM, pH 5,2) e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. As amostras foram ressuspensas em 300 μL do tampão acetato e congeladas a -20 °C por 24 h. Por fim, após esse período as amostras foram descongeladas em sonicação por 30 min. Após o

descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente (10.000 x g por 10 min a 4 °C). O precipitado foi descartado e o conteúdo sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

5.5 Espectrometria de massas

As proteínas foram extraídas conforme descrito na seção acima. As amostras de células do controle e as tratadas foram incubadas com uma solução de DTT 10 mM por 1 h a 37 °C no escuro, a fim de promover a redução das proteínas. Após esse período, foi adicionada iodoacetamida a uma concentração final de 15 mM e as amostras foram incubadas por 30 min em ambiente escuro para a alquilação das proteínas reduzidas.

Em seguida, as proteínas foram digeridas com tripsina *gold* (Promega, Madison, WI, EUA) na proporção de 1:20 (m/m), conforme as instruções do fabricante, por 16 h a 37 °C. Após a digestão, as amostras foram secas em um *speed vacuum* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 3 h e analisadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF (BRANCO et al., 2022).

5.6 Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada conforme o método descrito anteriormente (BRANCO et al., 2022). Os espectros de massas tandem foram exportados como arquivos .pkl e carregados na busca de íons MS/MS do MASCOT, da MATRIXSCIENCE (https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS, acessado em 15 de abril de 2023), utilizando os bancos de dados UP2311_S_cerevisiae, UP219602_F_oxysporum e SwissProt. A busca foi realizada com os seguintes parâmetros: Carbamidometilação (C) como modificação fixa e Oxidação (O) como modificação variável; a carga do peptídeo foi definida como 2+, 3+ e 4+; e o instrumento foi configurado para ESI- QUAD-TOF. As proteínas identificadas foram pesquisadas no UNIPROT e agrupadas em três categorias: (1) únicas do controle, para as proteínas identificadas exclusivamente nas amostras controle, (2) únicas das células tratadas com PepGAT, para as proteínas identificadas exclusivamente nas amostras tratadas, e (3) proteínas sobrepostas entre PepGAT e controle.

As proteínas com valor de *fold-change* $\geq 1,5$ ($p < 0,05$ teste de Tukey) foram consideradas aumentadas (abundância aumentada), enquanto aquelas com valor de *fold-*

$change \leq 0,5$ ($p < 0,05$ teste de Tukey) foram consideradas diminuídas (abundância diminuída) e incluídas nas comparações. As proteínas com *fold-change* entre 0,5 e 1,5 foram consideradas sem alteração significativa. Para cada proteína, o arquivo FASTA correspondente foi baixado. O programa blast2go (<https://www.blast2go.com/>, acessado em 06 de junho de 2023) foi utilizado para categorizar as proteínas detectadas com base na anotação *Gene Ontology* (GO), considerando a função molecular, atividade biológica e localização subcelular.

5.7 Interação com ergosterol

A reação foi realizada em placas de 96 poços, onde foram adicionados o inóculo de levedura ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL), ergosterol diluído em Tween 80 em diferentes concentrações (200, 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$), PepGAT (50 $\mu\text{g/mL}$) e meio Sabouraud Dextrose, na proporção de 1:1:1:1 (v/v), totalizando 200 μL por poço. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após o período de incubação, o crescimento fúngico foi avaliado por espectrofotometria a 620nm., O controle negativo foi composto por etanol 96% e Tween 80, 1:1, v/v que foram as soluções empregadas na preparação dos esteróis (PEIXOTO et al., 2017).

5.8 Atividade enzimática do sistema redox

5.8.1 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada conforme a metodologia previamente descrita (SOUZA et al., 2017), onde 800 μL de solução tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 foram incubados com uma alíquota de 100 μL do extrato proteico (Seção 5.4) das amostras tratadas e não tratadas a 30 °C por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de H_2O_2 112 mM, iniciando a reação. A mistura foi transferida imediatamente para uma cubeta de quartzo (1 cm^{-1}) onde foram realizadas as leituras por absorbância a 240 nm em um espectrofotômetro (Biochron, Libra 394 S12). Foi mensurado a diminuição da absorbância em intervalos de 10s até atingir 1min. Assumiu-se que uma diminuição de 1,0 unidade de absorbância por minuto representa 1 unidade de atividade de catalase por mL (UA mgP^{-1}).

5.8.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi mensurada de acordo com a metodologia

descrita previamente (VAN-ROSSUM et al., 1997). Por meio de uma placa de 96 poços a reação consiste na adição de 10 μL de tampão fosfato de potássio 1 M em pH 7,8, 20 μL de EDTA 1mM, 10 μL 0,25% Triton X-100, 20 μL de L-Metionina 130 mM, 100 μL de amostra de extrato proteico (Seção 5.4), 20 μL de riboflavina 100 mM e por fim 20 μL de NBT 750 μM . A reação foi homogeneizada e logo em seguida a placa foi mantida no escuro por 5 minutos. Após esse período foi realizado a primeira leitura de absorbância em leitor de microplacas a 630 nm, sendo esse a leitura no tempo 0. Posteriormente a placa foi exposta a luz fluorescente de 32 W por mais 5min, onde a cada 1 min foram realizadas leituras das absorbâncias com o passar do tempo também a 630 nm. O experimento foi realizado em triplicata tanto para as amostras tratadas com o peptídeo e o controle negativo contendo DMSO 5%.

5.9 Ensaio de formação de poros na membrana

A integridade da membrana foi avaliada como descrito anteriormente por Dias et al. (2020). Para avaliar o tamanho dos poros formados. As células de *C. albicans* foram tratadas como descritas na etapa de atividade antifúngica (Seção 5.3). Em seguida, foram lavadas com solução NaCl 0,15 M e centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos a 4°C. Após as lavagens, foram incubadas com 10 μM de isotiocianato de fluoresceína conjugado (FITC)-Dextrana com 6 kDa (Sigma Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Passado o período de incubação, foram armazenadas por 30 min a 25 °C no escuro. Depois dessa etapa, as células foram lavadas como descrito acima e observadas as fluorescências no Cytation 3 Cell Multi-mode Reader (BioTek®), com comprimento de onda de excitação de 490 nm e comprimento de onda de emissão de 520nm.

5.10 Ensaio de efeito combinatório

O efeito combinatório foi feito de acordo com a metodologia de Souza et al. (2020b). Resumidamente, utilizando placas de 96 poços, o ensaio de atividade combinatória consistiu na adição de 50 μL das células de *C. albicans* + 25 μL do PepGAT na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + 25 μL do antifúngico ITR diluído 12 vezes em concentrações partindo de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle positivo, foi utilizado 50 μL das células + 50 μL do ITR nas mesmas condições anteriores. O controle negativo consistiu em 50 μL das células + 50 μL da solução salina 0,15 M + DMSO 5%. Os ensaios foram realizados em triplicatas e após a montagem do experimento, a placa foi incubada a 37 °C por 24 h. No dia seguinte, as placas

foram submetidas a leitura de absorvância à 600 nm, utilizando um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, Santa Clara, CA, USA).

5.11 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prisma (versão 5.01) para Microsoft Windows. Os dados obtidos nos ensaios foram comparados por meio da análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Perfil proteômico de células de *C. albicans* tratadas com PepGAT

A proteômica, combinada com espectrometria de massa, surgiu como uma ferramenta poderosa para estudar peptídeos antimicrobianos (PAMs) e seus mecanismos de ação contra diversos microrganismos (MARTINEZ et al., 2016). Essa abordagem permite que os pesquisadores analisem as mudanças sutis na expressão de proteínas dos microrganismos após o tratamento com PAMs, fornecendo insights detalhados sobre as mudanças geradas pelas interações com o peptídeo antimicrobiano (SCHÄFER; WENZEL, 2020).

Como mostrado anteriormente, alguns resultados apresentaram diferentes mecanismos de ação contra as células da *C. albicans*. Contudo, para entender de maneira mais detalhada esses mecanismos, por meio de uma análise proteômica buscamos avaliar as mudanças geradas em *C. albicans* tratadas com o PepGAT. Nossos resultados mostraram alterações interessantes no perfil proteico. Nas células tratadas, foram observadas a presença de 117 proteínas (ANEXO B – Tabela suplementar 2), enquanto nas células do controle 319 proteínas foram detectadas (ANEXO A – Tabela suplementar 1). Em adição, cerca de 6 proteínas apresentaram uma sobreposição (*overlapping*) entre os dois grupos analisados (Figura 3). Nessas proteínas presentes nos dois grupos, foi ponderado um valor de *fold-change* (variação relativa de proteínas acumuladas), onde variações de abundância $\geq 1,5$ foram consideradas proteínas *up-accumulated* (aumento na abundância), enquanto valores $\leq 0,5$ foram proteínas *down-accumulated* (diminuição na abundância) e por fim, proteínas entre $0,5 - 1,5$ foram consideradas inalteradas em abundância. Ainda sobre as proteínas que apresentaram *overlapping*, para exemplificar a discriminação acima, a proteína *nonribosomal peptide synthase agiA* apresentou um *fold-change* de 2,92 em células tratadas com o PepGAT em relação as células do controle, indicando um maior acúmulo. Enquanto a proteína *methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating)* apresentou um *fold-change* de 0,08, representando uma diminuição no acúmulo. Por outro lado, a proteína *cytosolic Fe-S cluster assembly factor NAR* apresentou um valor de 1,28, indicando uma abundância inalterada entre os dois grupos analisados (Tabela 2).

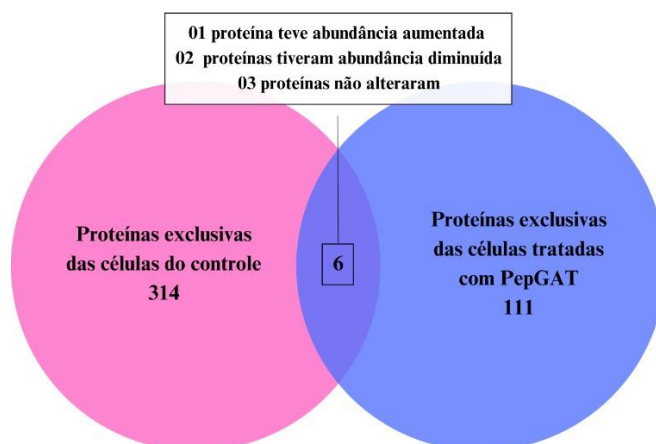


Figura 3 - Proteínas acumuladas em células de *C. albicans*. O diagrama de Venn destaca a distribuição de proteínas em células tratadas e não tratadas exclusivas de cada grupo. Além das proteínas sobreposta encontrada em ambos os grupos com acumulação diferencial.

Tabela 2 – *Overlapping* de proteínas em células do controle e tratadas de *C. albicans* analisadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF.

Protein Identification	Uniprot/NCBI/code	Reference Organisms	Cellular Component	Fold-Change Treated/Control cells
DNA and RNA Binding				
Regulatory protein SIR4	P11978	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus	1,16
Ion Binding				
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NAR1	NAR1_PHANO	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Cytoplasm	1,28
Multifunctional enzyme				
Nonribosomal peptide synthase <i>agiA</i>	AGIA_ASPFN	<i>Aspergillus flavus</i>	Endoplasmic reticulum	2,92
Oxidoreductase				
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating)	A0A2H3I2J3	<i>Fusarium oxysporum f. sp.</i>	Mitochondrion	0,08
Transport or Structural Activity				
Ras-related protein SEC4	P07560	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm	0,23
Unknown				

As proteínas do *overlapping* foram analisadas e classificadas de acordo com a sua Função Molecular (*Molecular Function*) e Processo Biológico (*Biological Process*), utilizando as informações presentes no *Gene Ontology* (Figura 4). Em relação a função molecular, as proteínas foram classificadas em 6 grupos, onde cada proteína foi enquadrada em um dos 6 grupos encontrados: Ligação à DNA/RNA (*DNA and RNA Binding*); Transporte ou Atividade Estrutural (*Transport or Structural Activity*); Oxidorredutase (*Oxidoreductase*); Desconhecido (*Unknown*); Enzima Multifuncional (*Multifunctional Enzyme*); Ligação de Íons (*Ion Binding*); totalizando uma distribuição igual de 16,6% no total de proteínas (Figura 4A). Em relação a processo biológico, 4 grupos foram observados, sendo duas proteínas encontradas no grupo de Outros Metabólitos (*Other Metabolites*), duas proteínas no grupo Desconhecido (*Unknown*), uma em cada um dos grupos de Transporte (*Transport*) e Fator de Regulação ou Sinalização (*Regulation Factor or Signaling*), representando cerca de 33% nos dois primeiros grupos e 17% nos demais (Figura 4B).

Figura 4 – Distribuição das proteínas sobrepostas entre o controle (DMSO) e tratadas (PepGAT) de células de *C. albicans*.

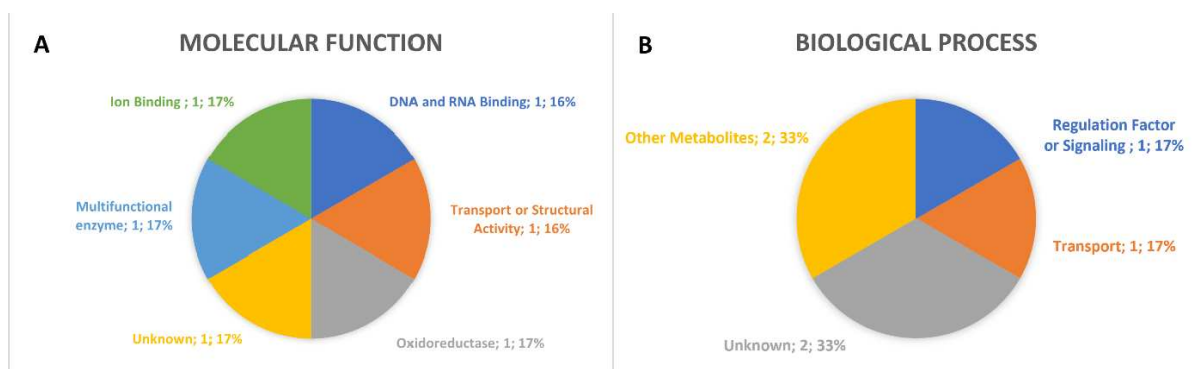


Figura 4. Distribuição de proteínas em *overlapping* de *C. albicans* obtidas após tratamento com PepGAT. (A) mostra a distribuição de proteínas distribuídas por *Molecular Function*. (B) mostra a distribuição de proteínas distribuídas por *Biological Process*. As proteínas foram identificadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF.

Figura 6 – Distribuição das proteínas de células de *C. albicans* tratadas com o PepGAT.

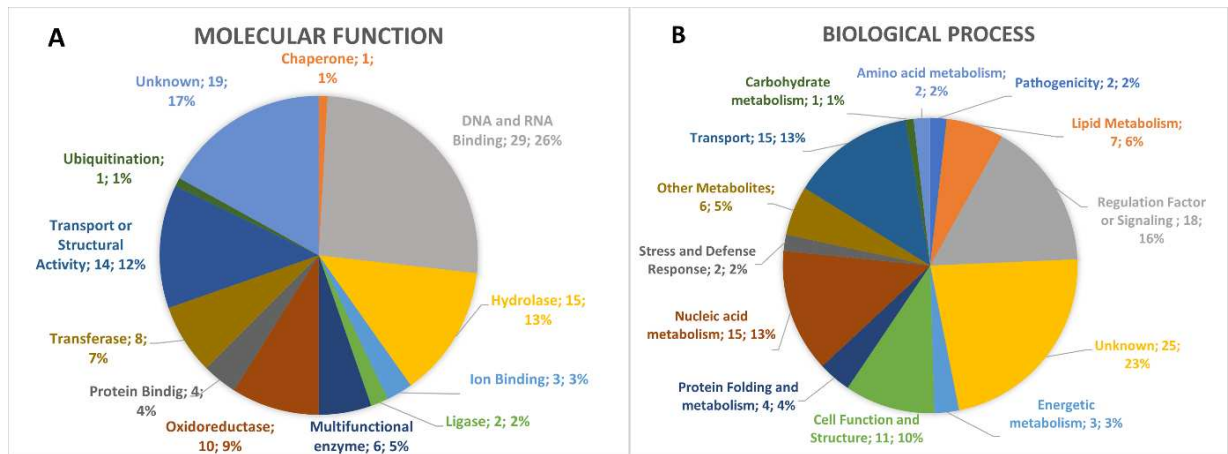


Figura 6. Distribuição de proteínas de *C. albicans* obtidas após tratamento com PepGAT. (A) mostra a distribuição de proteínas distribuídas por *Molecular Function*. (B) mostra a distribuição de proteínas distribuídas por *Biological Process*. As proteínas foram identificadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF.

6.1.1 Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios

Nesse grupo de proteínas analisadas, podemos destacar a presença de duas que são importantes para o transporte de esteróis, como o ergosterol, na membrana celular. Nas células exclusivas do controle foi encontrada a proteína *Phosphatidylinositol 4-kinase LSB6* (PI4K), enquanto a proteína *Membrane-anchored lipid-binding protein LAM4* estava presente apenas nas células tratadas. A PI4K que participa da síntese de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) desempenha um papel crucial na membrana plasmática de fungos, afetando o crescimento das hifas e a organização da parede celular, o tráfego vesicular e a manutenção da homeostase de lipídios nas membranas, incluindo o ergosterol (HOLIČ et al., 2014; KONOPKA, 2022). A presença dessa proteína no controle sugere uma membrana celular estruturalmente estável. No grupo tratado com PepGAT, a *Membrane-anchored lipid-binding protein LAM4* foi identificada, sugerindo uma resposta adaptativa ao tratamento. Visto que esta proteína está envolvida na homeostase de esteróis e na resposta ao estresse de membrana causadas por antifúngicos da classe do azóis - que visam a inibir a síntese de ergosterol. Estudos demonstraram que a exclusão de genes da família LAM aumenta a concentração total de esteróis e o acúmulo dessas moléculas nas células (SOKOLOV et al., 2020). Portanto, a

presença de LAM4 pode indicar um mecanismo compensatório para regular o metabolismo de esteróis após a exposição ao peptídeo, a qual foi confirmado que o PepGAT interage com ergosterol.

Ainda nesse grupo, a proteína *Lysophospholipase ARB_05919*, encontrada no controle, está envolvida na hidrólise de fosfolipídios, que é crucial para a invasão do epitélio por diversas classes de fungos (BARMAN et al., 2018). Além do mais, em *C. albicans*, a presença dessa proteína desempenha um papel crucial na remodelação de fosfolipídios e na composição da membrana (AYYASH et al., 2014). Portanto, a ausência no grupo tratado pode indicar uma interrupção na via de reciclagem de fosfolipídios, além da diminuição de virulência em infecções. Por outro lado, a presença de duas proteínas essenciais para virulência foram encontradas nas células tratadas com o PepGAT, a *Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 1, mitochondrial* (Psd1) e a *Patatin-like phospholipase domain-containing protein CNBE2340*. A Psd1 é responsável pela síntese de fosfatidiletanolamina a partir de fosfatidilserina é essencial para a virulência de *C. albicans*. A perda dessa via de síntese compromete severamente a virulência em modelos de candidíase sistêmica, indicando que a Psd1 é crucial para a patogenicidade do fungo (CASSILLY; REYNOLDS, 2018). Em contrapartida, estudos mostraram que a composição lipídica da membrana plasmática, influenciada pela Psd1, afeta a fluidez da membrana e a susceptibilidade a drogas, onde a deleção da Psd1 resulta em uma fluidez maior da membrana e, conseqüentemente, um aumento na susceptibilidade de drogas, como os azóis, tornando as células mais sensíveis a esses antifúngicos (CHEN et al., 2010). Portanto, embora a presença da Psd1 seja importante para a virulência, a presença dela no grupo tratado com o PepGAT pode ser justificado como uma tentativa da célula de remodelar sua membrana para resistir às ações antifúngicas do peptídeo.

Por fim, a proteína *Patatin-like phospholipase domain-containing protein CNBE2340* está relacionada à reparação de danos na membrana, resistência a antifúngicos, resposta ao estresse oxidativo e manutenção da virulência. Estudos mostraram que cepas resistentes ao fluconazol exibiam maiores expressões de fosfolipase B1 conferindo uma maior resistência antifúngica (YING; CHUNYANG, 2012). Esses achados destacam a complexidade da resposta celular ao PepGAT indicando que a exposição ao peptídeo pode levar a uma possível tentativa de reorganização do metabolismo de fosfolipídios, modulando proteínas envolvidas na degradação e remodelação da membrana celular, o que pode estar diretamente relacionado à ação antifúngica do peptídeo.

6.1.2 Proteínas relacionadas ao metabolismo energético

Nessa classe de proteínas, podemos destacar uma proteína encontrada nas células controle, a *Isocitrate lyase*, uma enzima que está envolvida na manutenção do equilíbrio redox intracelular, sendo essencial em adaptações metabólicas, além disso, ela permite que *C. albicans* se adapte metabolicamente utilizando fontes alternativas de carbono, sendo crucial para a sobrevivência em ambientes com nutrientes limitados (GERGONDEY et al., 2016). Por outro lado, a proteína *D-lactate dehydrogenase [cytochrome], mitochondrial* (LDH) foi encontrada apenas nas células tratadas com PepGAT. As LDHs têm como função a conversão de lactato em piruvato (vice-versa). A atividade da enzima LDH afeta diretamente o estresse oxidativo celular por meio da regulação dos conteúdos de NAD/NADH. Dessa forma, essa enzima é considerada um sensor de EROS ao contribuir para a eliminação dessas espécies (LIN; WANG; LI, 2022).

A ausência da proteína *Isocitrate lyase* nas amostras tratadas com o PepGAT, e a presença da *D-lactate dehydrogenase [cytochrome], mitochondrial* em células tratadas nos revela que o PepGAT afeta a homeostase redox da célula. Corroborando com os nossos resultados apresentados na atividade da CAT e da SOD.

6.1.3 Proteínas relacionadas a função de transporte e estrutura celular

Nessa classe, em células do controle, foram identificadas as seguintes proteínas: *Serine/threonine protein kinase* (KIN1); *Azole resistance protein 1* (AZR1); *KNR4/SMII homolog*. A presença dessas três proteínas está diretamente associada a processos essenciais à para adaptações fúngicas como sobrevivência a condições adversas, resistência ao estresse oxidativo e manutenção na integridade da parede celular.

A KIN1 está associada à resposta ao estresse e à regulação do crescimento celular, o que é crucial para a virulência fúngica. Estudos demonstraram que proteínas quinases, como KIN1, desempenham papéis em processos celulares fundamentais para a formação de biofilmes e adaptações ao ambiente hostil em *C. albicans* (KRAMARA et al., 2024). Além disso, a exclusão de KIN1 afeta a suscetibilidade de *A. fumigatus* aos antifúngicos que têm como alvo a parede celular e a membrana, sugerindo um papel essencial na integridade da parede celular (JUVVADI et al., 2018).

Em adição, a proteína AZR1, uma transportadora de membrana da família *Major Facilitator Superfamily* (MFS), está associada à resistência a antifúngicos azólicos,

promovendo o efluxo desses compostos para reduzir sua toxicidade (PRASAD DR; RAWAL, 2014). Em *S. cerevisiae*, AZR1 confere resistência aos azóis, permitindo a sobrevivência em ambientes com alta pressão seletiva desses antifúngicos (SANDRA TENREIRO, 2000).

A proteína específica de fungos *KNR4/SMI1 homolog* desempenha um papel crucial na integridade da parede celular, sendo essencial na resistência ao estresse em várias espécies. Sua exclusão resulta em hipersensibilidade a agentes antifúngicos e estresses da parede celular, enquanto a superexpressão aumenta a adesão celular (MARTIN-YKEN et al., 2018).

A ausência dessas proteínas nas células tratadas com o PepGAT, sugere que o peptídeo pode estar afetando a integridade da parede celular, bem como a resposta ao estresse e os mecanismos de resistência antifúngica. A redução na abundância de KIN1 e *KNR4/SMI1 homolog* pode indicar uma fragilização da estrutura celular, tornando *C. albicans* mais suscetível a agentes antifúngicos e ao estresse ambiental. Além disso, a ausência da proteína AZR1 sugere que o tratamento com PepGAT pode comprometer os mecanismos de efluxo de antifúngicos, tornando as células mais sensíveis aos agentes azóis e potencializando a ação dessas drogas.

Por outro lado, nas células tratadas com o PepGAT podemos destacar a proteína *Peroxisomal membrane protein PEX17*, uma proteína de membrana periférica associada aos peroxissomos. Os peroxissomos são organelas essenciais para o metabolismo lipídico e a resposta ao estresse oxidativo, participando da β -oxidação de ácidos graxos e da homeostase redox (OKUMOTO et al., 2020). A presença dessa proteína nas células tratadas reforça a hipótese de que o PepGAT induz estresse oxidativo, estimulando a ativação de vias antioxidantes para compensar o dano celular, como foi apresentado nos ensaios de atividades enzimáticas do sistema redox.

Esses achados condizem com os resultados experimentais analisados, onde o PepGAT além de afetar a homeostase redox, estimulando a ativação de vias antioxidantes para compensar o dano celular, interage com a membrana gerando formação de poros. Tais observações só reforçam o potencial do PepGAT como um agente antifúngico que pode atuar de maneira combinada com os tratamentos convencionais como o ITR.

6.1.4 Proteínas relacionadas a sinalização ou regulação

Em células tratadas com o PepGAT, foram identificadas proteínas envolvidas na regulação da transcrição e na remodelação da cromatina, incluindo *Chromatin structure-*

remodeling complex protein RSC3, AP-1-like transcription factor YAP1 e Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16. A presença dessas proteínas sugere que a *C. albicans* ativou mecanismos adaptativos para responder ao estresse causado pelo PepGAT, promovendo alterações na expressão gênica e ajustes na homeostase celular.

A RSC30 faz parte do complexo RSC (*Remodeling the Structure of Chromatin*) e é crucial para a regulação da expressão gênica, manutenção da integridade celular e adaptação a condições de estresse (BALACHANDRA et al., 2020). A ausência de RSC30 pode levar a uma sensibilidade aumentada a estresses ambientais, como danos à parede celular e despolimerização de microtúbulos, devido à desregulação transcricional (ANGUS-HILL et al., 2001; WILSON et al., 2006). Além disso, a presença de RSC30 é relacionada como um fator importante no reparo de quebras de fita dupla de DNA, essencial para a sobrevivência celular e manutenção da integridade genômica (SHIM et al., 2005). Sendo assim, a presença de RSC30 no grupo tratado sugere que o PepGAT pode estar induzindo modificações na estrutura da cromatina como uma tentativa da célula de adaptar-se ao ambiente estressante.

Ainda mais, em células tratadas foi detectado a presença da *AP-1-like transcription factor YAP1*, que desempenha um papel crucial na resposta ao estresse oxidativo e na patogenicidade fúngica. Em *C. albicans*, Cap1 (um homólogo de YAP1) é essencial para a resposta ao peróxido de hidrogênio, promovendo a acumulação nuclear e a expressão gênica mediada por Gpx3 e Ybp1 (PATTERSON et al., 2013). De maneira semelhante, em *C. neoformans*, YAP1 é regulado em resposta a diversos tipos de estresse, contribuindo para a resistência ao estresse oxidativo (SO et al., 2019). Portanto, a detecção de YAP1 em células tratadas com o PepGAT pode ter levado à ativação de YAP1, que, por sua vez, poderia estar regulando a expressão de genes antioxidantes, incluindo a catalase (CAT). Essa relação pode ser reforçada pela observação do aumento da atividade de CAT nas células tratadas com PepGAT, indicando que a indução do estresse oxidativo, mediada por YAP1, pode ter ativado respostas celulares para mitigar os danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROS), incluindo a ativação da CAT.

Por fim, a *Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16* (MED16), componente do complexo *Mediator*, desempenha um papel crucial na patogênese fúngica e nas respostas de defesa. Em fungos patogênicos como a *C. albicans*, o MED16 regula genes envolvidos na virulência e na resistência a medicamentos antifúngicos (O'CONNOR-MONELEY et al., 2023). Isso inclui genes relacionados à morfogênese e formação de biofilmes, que são essenciais para a patogenicidade (UWAMAHORO et al., 2012). Portanto, a detecção de MED16 no grupo tratado com PepGAT pode induzir que o peptídeo está

interferindo em vias de transcrição que controlam processos de patogenicidade, como a formação de biofilmes e a morfogênese, além de influenciar na resistência a antifúngicos.

A presença dessas proteínas apenas nas células tratadas reforça a hipótese de que o PepGAT induz estresse celular significativo, levando à ativação de mecanismos de remodelação da cromatina, reparo de DNA e resposta ao estresse oxidativo. Esses achados corroboram os resultados experimentais apresentados onde indicam que o PepGAT causa formação de poros e afeta a homeostase redox, evidenciando seu potencial como agente antifúngico.

6.1.5 Proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos nucleicos e carboidratos

A presença das proteínas *Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1* e *Histone acetyltransferase SAS3* encontradas em células tratadas com o PepGAT são de grande importância na adaptação e resposta a condições estressantes, além de desempenharem papéis fundamentais na patogenicidade de *C. albicans*.

A *Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1* é uma enzima envolvida na biossíntese da parede celular, especificamente na modificação de glicanos com a adição de resíduos de manose. Essa modificação é essencial para a integridade da parede celular, conidiação, tolerância ao estresse e virulência (PEJENAUTE-OCHOA et al., 2021; WANG et al., 2014). Ademais, a exclusão de genes que codificam essas enzimas geralmente resulta em virulência atenuada, destacando sua importância para o desenvolvimento patogênico de fungos, afetando a adesão, formação de biofilme (DÍAZ-JIMÉNEZ., 2017). A presença dessa proteína nas células tratadas com PepGAT sugere que o peptídeo pode estar interferindo na modulação da parede celular da *C. albicans*, impactando processos vitais para a virulência como a adesão e resistência a condições adversas.

Por outro lado, a *Histone acetyltransferase SAS3* é uma proteína chave no controle da expressão gênica, atuando na acetilação das histonas e, conseqüentemente, na regulação da cromatina. A acetilação das histonas facilita o acesso dos fatores de transcrição ao DNA, promovendo a expressão de genes necessários para a adaptação celular, incluindo aqueles relacionados à resposta ao estresse e à patogenicidade como foi observado em *A. fumigatus* (WANG et al., 2024). Em *C. albicans*, a modulação da acetilação de histonas está associada à regulação de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (KIM; PARK; LEE, 2018). A presença da SAS3 nas células tratadas com PepGAT sugere que o peptídeo pode estar interferindo na regulação genética, afetando a expressão de genes-chave para a virulência e a

resistência aos estresses oxidativo, especificamente aqueles causados por EROS.

Portanto, a detecção dessas duas proteínas nas células tratadas com PepGAT indica que o peptídeo pode estar modulando processos biológicos essenciais para a virulência e sobrevivência em ambientes com estresse oxidativo.

6.1.6 Proteínas relacionadas a patogenicidade

Nas células do controle foi observada a presença da proteína *Extracellular metalloproteinase*. Contudo, nas anotações do *Gene Ontology*, essa proteína ainda não está completamente elucidada (sendo classificada como *Unknow*). Porém, na literatura há indícios que essa é uma proteína fortemente relacionada a processos ligados a patogênese dos fungos. A *Extracellular metalloproteinase* é uma enzima conhecida por sua capacidade de degradar proteínas extracelulares, especialmente na interação com a matriz extracelular, um aspecto importante da virulência de fungos patogênicos. Por exemplo, no corpo humano, ela atua especificamente destruindo as barreiras e defesas do hospedeiro, interrompendo a homeostase devido a sua alta atividade proteolítica (SATALA et al., 2023). Em um outro estudo utilizando

C. neoformans, foi descoberto uma metaloprotease secretada (Mpr1) que é essencial para a invasão no sistema nervoso central, facilitando a migração através da barreira hematoencefálica (VU et al., 2014). Em *C. albicans*, essas metaloproteínas têm sido associadas à capacidade do fungo de invadir os tecidos hospedeiros, facilitando a formação de biofilmes, modulação da resposta imune, promovendo a resistência a tratamentos antifúngicos (BRAS et al., 2024). A presença dessa proteína nas células de controle sugere que ela é uma peça-chave no comportamento virulento de *C. albicans*, facilitando a adaptação ao ambiente hostil e modulando a resposta imune dos hospedeiros.

Por outro lado, a *2-methylcitrate synthase, mitochondrial*, uma proteína encontrada nas células tratadas, é uma enzima-chave no ciclo do metilcitrato, desempenhando um papel crucial no metabolismo e na patogenicidade dos fungos ao desintoxicar o propionil-CoA, um metabólito tóxico (MAERKER et al., 2005). Esta enzima é essencial para o crescimento, desenvolvimento e virulência dos fungos, tornando-a um alvo potencial para terapias antifúngicas. A inibição desta enzima em *Paracoccidioides brasiliensis* leva a mudanças metabólicas, incluindo aumento da proteólise, degradação lipídica e estresse oxidativo (ROCHA et al., 2023). A presença dessa proteína nas células tratadas só reforça que o PepGAT influencia no metabolismo energético das células de *C. albicans*, como foi apresentado por meio da atividade do sistema redox.

6.2 Atividade antimicrobiana e interação com ergosterol

Todos os experimentos desse estudo foram utilizados 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do PepGAT como estabelecido em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (SOUZA et al., 2020a). No mesmo estudo, outros mecanismos de ações foram avaliados. Neste trabalho, novas análises foram feitas a fim de avaliar de maneira mais detalhada o mecanismo de ação do PepGAT contra as células de *C. albicans*.

A membrana celular dos fungos desempenha um papel crucial na estrutura e função celular (SANT et al., 2016). Diferente das células animais, que possuem colesterol como principal esterol, os fungos sintetizam e incorporam o ergosterol em sua membrana celular (KAZAN; GARDINER, 2017). Entender a biossíntese do ergosterol e suas interações com componentes da membrana é crucial para desenvolver tratamentos antifúngicos mais eficazes e abordar a resistência aos medicamentos (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2012).

Nesse trabalho, a partir dos resultados obtidos na proteômica de possíveis proteínas relacionadas a integridade da membrana celular, buscamos avaliar a atividade do peptídeo PepGAT na presença de ergosterol. Nossos resultados demonstraram uma inibição significativa do crescimento de *C. albicans*. Como mostrado no trabalho de Souza et al. (2020a), na Figura 7, o tratamento com PepGAT sozinho resulta em aproximadamente 50% de inibição. Contudo, ao avaliar a combinação do PepGAT com diferentes concentrações de ergosterol, observou-se uma redução da atividade inibitória nas condições PepGAT + ergosterol 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e PepGAT

+ ergosterol 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com inibição variando entre 20-25%. Por outro lado, a combinação PepGAT + ergosterol 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou uma porcentagem de inibição do PepGAT para níveis semelhantes ao tratamento com PepGAT sozinho, cerca de 45,95%.

Figura 7 – Porcentagem de inibição de crescimento de *C. albicans* na presença de ergosterol.

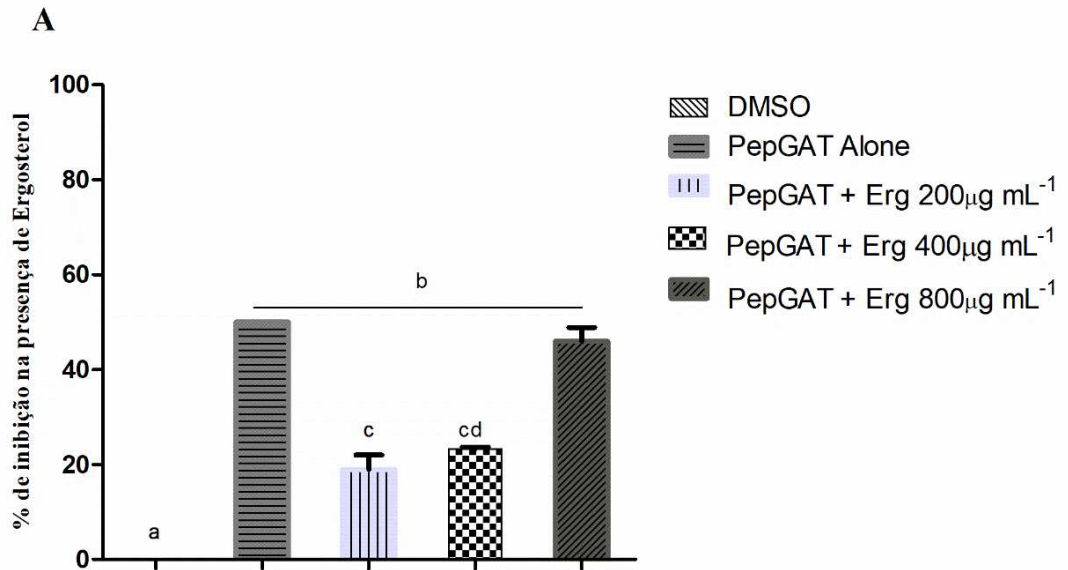


Figura 7. Atividade antifúngica do PepGAT 50 µg mL⁻¹ na presença de ergosterol. Foi utilizado o teste de Tukey. Diferentes letras representam a diferença estatística ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Ensaio realizado em triplicatas.

Uma possível explicação para esses efeitos pode ser a saturação das interações do PepGAT com o ergosterol, ou seja, a concentração de ergosterol pode ter atingido um ponto de saturação, onde não há mais aumento significativo da atividade do peptídeo. Esse efeito pode indicar uma preferência de interações do peptídeo com o ergosterol livre. Em estudos anteriores do nosso grupo, demonstraram que o PepGAT perdeu totalmente sua atividade contra *C. neoformans* à medida que aumentava a concentração de ergosterol (AGUIAR et al., 2022). Por conseguinte, na literatura é relatado que moléculas que possuem interação com o ergosterol podem desestabilizar a membrana plasmática, gerando possíveis danos e, conseqüentemente, morte celular. Isso já foi mostrado experimentalmente, onde o PepGAT causou um desequilíbrio na estrutura da membrana plasmática de *C. albicans* gerando formação de poros pelo teste de iodeto e propídio (PI) (SOUZA et al., 2020a).

Por meio da proteômica, foi mostrado que o PepGAT interferiu em proteínas relacionadas a integridade da membrana celular, como a presença da *Phosphatidylinositol 4-kinase LSB6* (PI4K) no grupo controle e a presença da *Membrane-anchored lipid-binding protein LAM4* no grupo tratado. Diante o exposto, podemos afirmar que o PepGAT em condições normais, na ausência de ergosterol livre, prefere atingir o ergosterol na membrana das células fúngicas, gerando um desequilíbrio estrutural e, possivelmente, a morte celular.

6.3 Ensaios de atividades enzimáticas

Espécies reativas de oxigênio (EROS) desempenham um papel essencial nos processos celulares. As EROS, em níveis basais, atuam como moléculas de sinalização celular, regulando funções proteicas, a proliferação e a diferenciação celular (AVERILL-BATES, 2024). No entanto, quando os mecanismos antioxidantes falham em manter a homeostase das EROS, ocorre estresse oxidativo, levando a danos celulares e várias patologias (HAJAM et al., 2022).

Nesse estudo, foi avaliado a atividade de duas enzimas importantes para o sistema redox: CAT e SOD. A primeira enzima analisada foi a SOD, uma enzima que converte o O_2^- para H_2O_2 . As células do controle que apresentaram uma atividade de $0,80 \text{ AU mgP}^{-1}$. Enquanto as células tratadas com o PepGAT apresentaram atividade de $0,417 \text{ AU mgP}^{-1}$ (Figura 8A), representando uma redução aproximada de duas vezes menor na atividade da SOD pelas células tratadas com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo.

Na atividade da CAT, uma enzima que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , as células do controle apresentaram uma atividade de $7,2 \text{ AU mgP}^{-1}$. Enquanto as células tratadas com o PepGAT apresentaram $12,26 \text{ AU mgP}^{-1}$ em atividade da CAT (Figura 8B), levando a um aumento de aproximadamente 70% em relação ao controle.

Figura 8 – Atividades enzimáticas do sistema redox

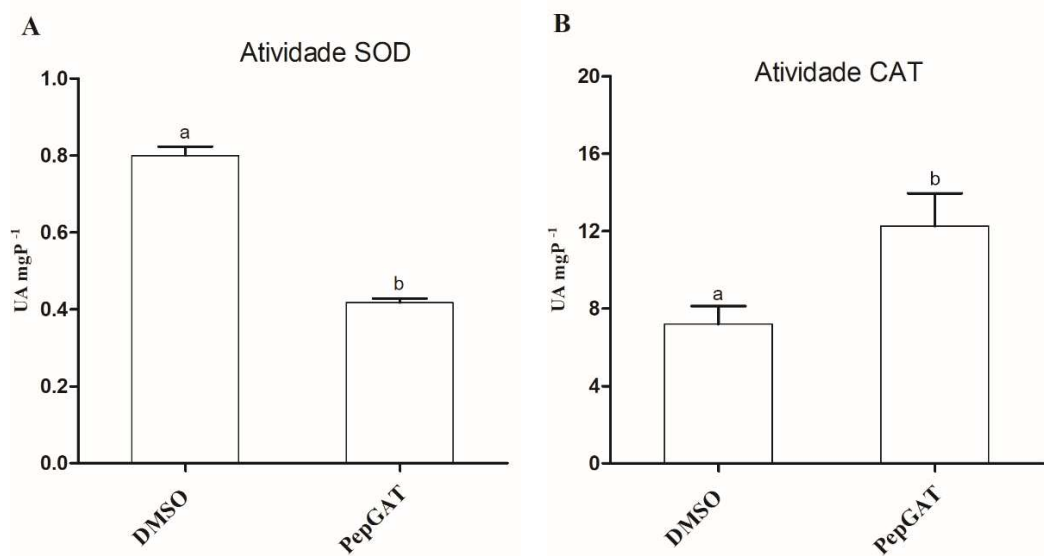


Figura 8 – Atividade das enzimas envolvidas em EROS em células de *C. albicans* tratadas com o PepGAT $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. (A) representa a atividade da enzima SOD que converte O^- em $H O$. (B) a atividade da CAT que converte H_2O_2 em H_2O e O_2 . A atividade enzimática foi testada em células tratadas de *C. albicans* com o PepGAT e não

tratadas (DMSO). Foi utilizado o teste de Tukey. Diferentes letras representam a diferença estatística ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Ensaio realizado em triplicatas.

Como exposto na Figura 8, o PepGAT causa mudanças no metabolismo redox das células de *C. albicans*. No caso da SOD, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa que também usaram o PepGAT mostraram esse perfil de atividade em células de *C. neoformans* (AGUIAR et al., 2023). Embora a enzima SOD faça a conversão da molécula instável de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , que é uma molécula mais estável, o H_2O_2 possui maior letalidade. Isso justifica o fato de que o PepGAT, de maneira ainda desconhecida, induziu um desequilíbrio de EROS em células de *C. albicans*, representado por um acúmulo de H_2O_2 como foi mostrado no trabalho anterior de Souza et al. (2020a).

Em contrapartida, a atividade da CAT foi aumentada nas células tratadas com o PepGAT. Embora a quantidade de estudos que investiguem as variações nas enzimas do sistema redox em resposta a peptídeos antimicrobianos seja escassa, nossa hipótese é que o PepGAT induz uma mudança no equilíbrio do sistema redox celular, gerando um estresse oxidativo. Onde esse aumento na atividade da CAT é uma resposta ao estresse celular, sugerindo uma modulação do mecanismo de defesa para minimizar danos causados pelo desequilíbrio homeostático. A presença das proteínas SAS3, *Peroxisomal membrane protein PEX17* e a *D-lactate dehydrogenase [cytochrome], mitochondrial*, apenas em células tratadas mostrou isso.

6.4 Permeabilidade da membrana celular

A integridade da membrana celular é crucial para os fungos, pois influencia diretamente na sua patogenicidade, resistência a agentes antifúngicos e funções celulares gerais. Um desequilíbrio na integridade da membrana pode aumentar a suscetibilidade a agentes antifúngicos, como visto em *C. neoformans*, onde membranas comprometidas aumentaram a sensibilidade à caspofungina (MOREIRA-WALSH et al., 2022).

A formação de um poro na membrana é uma grande preocupação para as células liderem, visto que as consequências podem variar desde apoptose, dissipação de gradientes iônicos e potencial de membrana, resultando em lise celular (ROMERO et al., 2020; OSTOLAZA et al., 2019).

Sendo assim, nesse trabalho foi avaliado a capacidade da *C. albicans* manter a integridade da membrana celular na presença do PepGAT. No estudo anterior descrito por Souza

et al. (2020a), foi observado a formação de poros na membrana por meio do teste de PI. Essa metodologia gera um sinal fluorescente e que só pode ser observado quando há formação de poros na estrutura da membrana celular, visto que o PI ao entrar na célula interage com moléculas de DNA e emite fluorescência de cor vermelha. Todavia, essa metodologia apenas relata que há uma formação de poros na membrana das células analisadas. Contudo, nesse trabalho buscamos avaliar o tamanho desse poro formado por meio do teste de adição de dextrana 6-kDa conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) – um fluorescente de cor verde.

Figura 9 – Microscopia de fluorescência mostrando formação de poros em célula de *C. albicans* tratadas (PepGAT) e não tratadas (Controle).

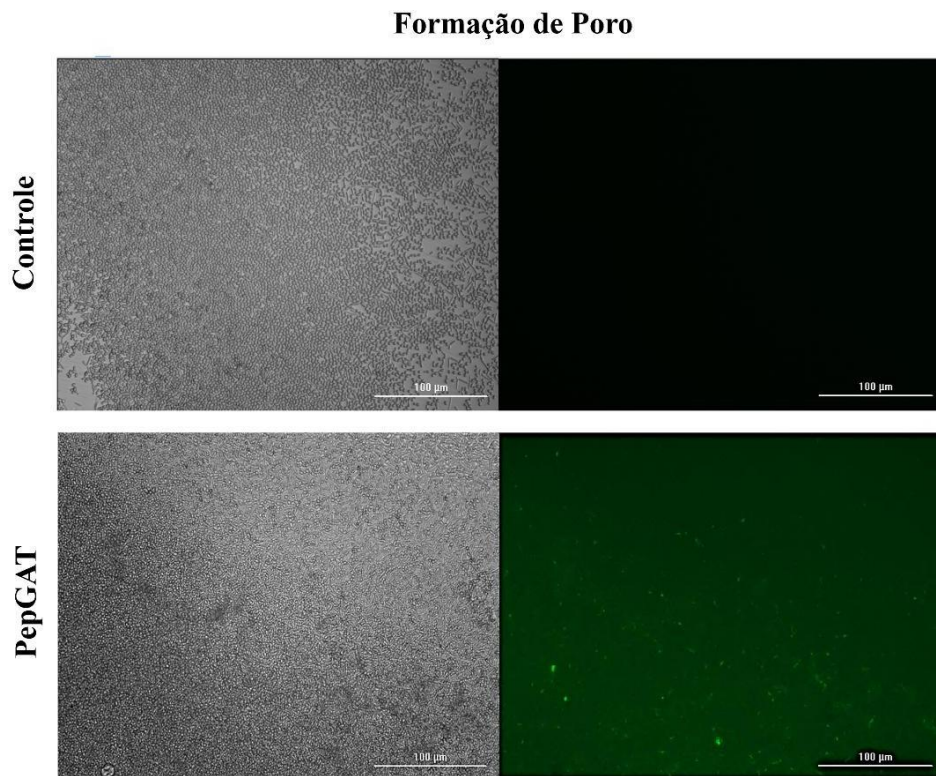


Figura 9. imagens de fluorescência mostrando a formação de poros de membrana usando isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrana (6 kDa) induzido pelo PepGAT em $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. As células de *C. albicans* foram incubadas com o PepGAT (tratamento) e DMSO (controle). A detecção de fluorescência verde indica que as células internalizaram o FITC-dextrana. Barras: $100 \mu\text{m}$.

Como observado na Figura 9, as células tratadas com o PepGAT apresentaram fluorescência quando incubadas com dextrana-FITC. Em contrapartida, as células do controle não apresentaram nenhuma fluorescência. Isso corrobora com os dados anteriores encontrados

pelo teste do PI, onde nenhuma célula do controle tiveram formação de poro na membrana. Em adição, por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM), as células tratadas com PepGAT tiveram sua estrutura morfológica totalmente danificada, apresentando rugas, mudanças estruturais e extravasamento celular (SOUZA et al., 2020a).

Contudo, esses resultados geram questionamentos: como que o PepGAT causa essa permeabilidade celular? Para responder essa pergunta, é necessário entender a origem do PepGAT. Inicialmente, o PepGAT foi projetado e inspirado a partir de uma proteína antifúngica (quitinase de *A. thaliana*). Suas características físico-químicas consistem em apresentar uma carga catiônica (+2), ter uma proporção hidrofóbica moderada (cerca de 40%) e por fim, baixo índice de Boman (2,19) (SOUZA et al., 2020a). Essas três características são essenciais para entender o comportamento do PepGAT. Em primeiro lugar, peptídeos de características catiônicas tem um grande potencial antimicrobiano pois tendem a ser atraído para alvos com cargas aniônicas, como a membrana celular dos fungos (RAUTENBACH et al., 2016). Em segundo, peptídeos que possuem porções hidrofóbicas moderadas conseguem ter um melhor acesso à região interna de membrana (uma estrutura altamente hidrofóbica e seletiva) perturbando a organização dos fosfolipídios. Essa última característica é fundamental para a penetração de peptídeos na membrana, enquanto as interações eletrostáticas ajudam a manter os peptídeos atraídos na superfície da membrana (LINS et al., 2008).

Por último, o índice de Boman diz que quanto maior o valor, mais o peptídeo tende a interagir com alvos proteicos, enquanto índices menores possuem interações mais fracas, dando preferência a interagir com membranas celulares (BOMAN, 2003). Dessa forma, o PepGAT apresentar um índice intermediário, nos revela que ele possui uma grande propensão a interagir com proteínas, mas também ter interação com a membrana celular.

A partir dos dados mostrados na proteômica, esses resultados só reforçam nossa hipótese de ele forma poro na membrana de *C. albicans* ao interagir com compostos hidrofóbicos, como foi mostrado pela interação com ergosterol e que ele induz estresse oxidativo (via EROS), o que pode envolver interações com as enzimas do estresse oxidativo.

6.5 Atividade combinatória com ITR

As infecções fúngicas representam uma ameaça global e significativa à saúde, afetando desde humanos até animais (GNAT et al., 2021). Essas infecções estão se tornando cada vez mais reconhecidas como um grande problema mundial, principalmente entre indivíduos imunocomprometidos. Os medicamentos antifúngicos disponibilizados têm

limitações em eficácia e tolerabilidade, necessitando do desenvolvimento de novas terapias medicamentosas (MUNZEN et al., 2023). A terapia combinada no combate a infecções fúngicas é uma estratégia promissora para aumentar a eficácia de tratamentos e superar as limitações causadas pela resistência de medicamentos. A combinação de diferentes moléculas terapêuticas, faz com que potencialize os efeitos de antifúngicos já utilizados no combate a infecções, além de contribuir para a redução da dose necessária a ser utilizada, diminuindo a toxicidade dos tratamentos (SPITZER et al., 2017).

Os azóis são antifúngicos que atuam inibindo a síntese de ergosterol como o itraconazol (ITR), o fluconazol e cetoconazol. O ITR um agente de amplo espectro, continua a ser uma opção valiosa no tratamento de infecções fúngicas, além de apresentar um perfil de segurança favorável e eficácia comprovada em várias condições clínicas (SOUSA et al., 2024). Contudo, na literatura já foi relatado que os fungos do gênero *Candida* já possuem uma resistência a essa classe de fármaco, seja por mutações genéticas, a super expressão de bombas de efluxo, e formação de biofilme (MORACE et al., 2014; WHALEY et al., 2017).

A ausência da proteína AZR1 nas células tratadas com o PepGAT, identificada pela análise proteômica, motivou uma investigação do efeito combinatório entre o PepGAT e o ITR. Nossos resultados mostraram que nos experimentos que utiliza as células do controle (DMSO) + ITR ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$), apenas a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ITR teve uma inibição no crescimento fúngico, com cerca de 13,7% como mostra a Figura 10. Enquanto nas células tratadas com o PepGAT + ITR, apenas as concentrações de 62,5; 31,25; 15,62; 3,9; 1,95 e $0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ITR apresentaram inibição em cerca de 17,4%, 21%, 30,3%, 1,7%, 29,95% e 17,75, respectivamente.

Diante os resultados obtidos no efeito combinatório, embora em baixa porcentagem, há um modesto potencial entra as células tratadas com o PepGAT e o ITR. Onde o tratamento com PepGAT pode ter comprometido os mecanismos de efluxo de antifúngicos das células de *C. albicans*, tornando as células mais sensíveis aos agentes azóis e potencializando a ação do ITR.

Figura 10 – Ensaio de efeito combinatório de células de *C. albicans* tratadas com PepGAT e ITR

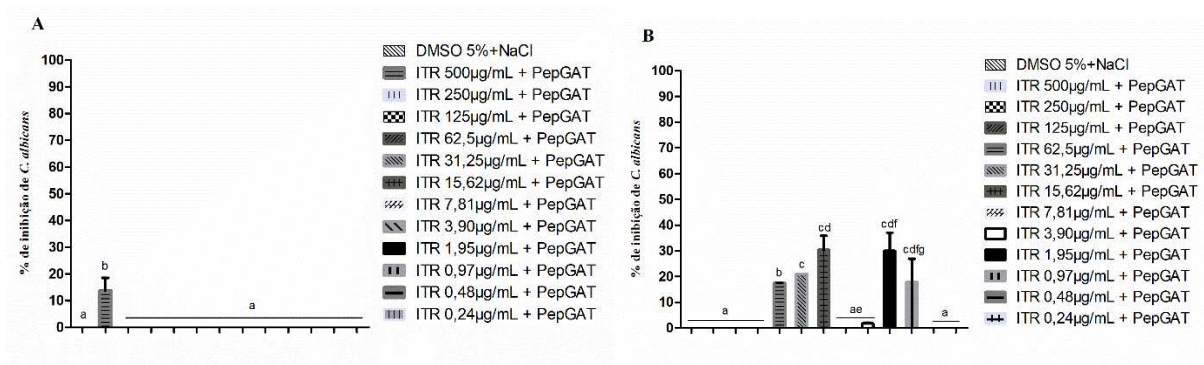


Figura 10 – Atividade combinada do PepGAT 50 µg mL⁻¹ a itraconazol (ITR) contra *C. albicans*. (A) Células da *C. albicans* apenas com ITR em diferentes concentrações. (B) *C. albicans* tratadas com o PepGAT + ITR em diferentes concentrações. Diferentes letras representam a diferença estatística ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Ensaio realizado em triplicatas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram o mecanismo de ação antimicrobiana do peptídeo sintético PepGAT, o qual foi bioinspirado em uma proteína vegetal de defesa. A análise proteômica mostrou que houve uma diminuição significativa no perfil de proteínas em células tratadas, especificamente àquelas relacionadas a funções básicas de transporte, estrutura da membrana e parede celular.

Os resultados apresentados elucidaram seus mecanismos de ação, mostrando que sua atividade se dá por meio de danos e formação de poros na membrana ao interagir com o ergosterol e desequilíbrio no sistema redox ao induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

Esses resultados mostram que o peptídeo utilizado nesse trabalho é um agente antifúngico promissor e que pode ser aliado a tratamentos contra infecções causadas por *C. Albicans*.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, A. A. *et al.* Antibiotic Resistant Superbugs: Assessment of the Interrelationship of Occurrence in Clinical Settings and Environmental Niches. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 29, 27 dez. 2016.
- AGUIAR, T. K. B. *et al.* Antifungal Potential of Synthetic Peptides against *Cryptococcus neoformans*: Mechanism of Action Studies Reveal Synthetic Peptides Induce Membrane–Pore Formation, DNA Degradation, and Apoptosis. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 1678, 12 ago. 2022.
- AGUIAR, T. K. B. *et al.* No Chance to Survive: Mo-CBP3-PepII Synthetic Peptide Acts on *Cryptococcus neoformans* by Multiple Mechanisms of Action. **Antibiotics**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 378, 1 fev. 2023.
- AKBARI, R. *et al.* Action mechanism of melittin-derived antimicrobial peptides, MDP1 and MDP2, de novo designed against multidrug resistant bacteria. **Amino Acids**, [s.l.], v. 50, n. 9, p. 1231–1243, 1 set. 2018.
- AKROUT, I. *et al.* Valorizing fungal diversity for the degradation of fluoroquinolones. **Heliyon**, [s.l.], v. 10, n. 10, p. 30611, 2024.
- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 33242, 10 jan. 2012.
- ALIM, D. *et al.* The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 140, 18 dez. 2018.
- ANGUS-HILL, M. L. *et al.* A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 741–751, 1 abr. 2001.
- ARAÚJO, T. C. *et al.* Mecanismos de resistência antifúngica: exploração dos aspectos moleculares e genéticos. **REVISTA FOCO**, [s.l.], v. 17, n. 9, p. e5810, 2 set. 2024a.
- ARIKAN-AKDAGLI, S *et al.* Antifungal Resistance: Specific Focus on Multidrug Resistance in *Candida auris* and Secondary Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 129, 5 dez. 2018.
- AVERILL-BATES, D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1871, n. 2, p. 119573, 1 fev. 2024.
- AYYASH, M. *et al.* Characterization of a lysophospholipid acyltransferase involved in membrane remodeling in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s.l.], v. 1841, n. 4, p. 505–513, 1 abr. 2014.
- AZEVEDO, M. M. *et al.* Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 34, p. 7463–7468, 2

set. 2015.

BALACHANDRA, V. K. *et al.* The RSC (Remodels the Structure of Chromatin) complex of *Candida albicans* shows compositional divergence with distinct roles in regulating pathogenic traits. **PLOS Genetics**, [s.l.], v. 16, n. 11, p. e1009071, 5 nov. 2020.

BALAN, C. *et al.* *Candida auris*: um novo patógeno globalmente emergente. **Revista Interdisciplinar de Saúde e Educação**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 171–202, 5 jan. 2023.

BARMAN, A. *et al.* Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 209, p. 55–69, 1 abr. 2018.

BATISTA, P. H. M. *et al.* Implicações da resistência antimicrobiana na prática clínica. **International Journal of Health Management Review**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. e356, 13 ago. 2024.

BOGDANOVA, L. R. *et al.* Spectroscopic, zeta potential and molecular dynamics studies of the interaction of antimicrobial peptides with model bacterial membrane. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 242, p. 118785, 5 dez. 2020.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, [s.l.], v. 254, n. 3, p. 197–215, 1 set. 2003.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017.

BRANCO, J. *et al.* *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 80, 5 jan. 2023.

BRANCO, L. A. C. *et al.* New Insights into the Mechanism of Antibacterial Action of Synthetic Peptide Mo-CBP3-PepI against *Klebsiella pneumoniae*. **Antibiotics**, [s.l.], v. 11, n. 12, p. 1753, 1 dez. 2022.

BRAS, G. *et al.* Secreted Aspartic Proteinases: Key Factors in *Candida* Infections and Host-Pathogen Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 4775, 27 abr. 2024.

CARDOSO, M. H. *et al.* Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates? **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 501217, 22 jan. 2020.

CASSILLY, C. D.; REYNOLDS, T. B. PS, It's Complicated: The Roles of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in the Pathogenesis of *Candida albicans* and Other Microbial Pathogens. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 28, 20 fev. 2018.

CASTILHO, P. F. DE *et al.* Desafios e alternativas promissoras na luta contra a resistência antimicrobiana. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [s.l.], v. 24, n. 5, p. e15237–e15237, 28

maio 2024.

CELLA, E. *et al.* Joining Forces against Antibiotic Resistance: The One Health Solution. **Pathogens**, [s.l.], v. 12, n. 9, p. 1074, 23 ago. 2023.

CHEN, C. H. *et al.* Synthetic molecular evolution of antimicrobial peptides. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 75, p. 102718, 1 jun. 2022.

CHEN, J. *et al.* Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and meta-analysis of global epidemiology and mortality of *Candida auris*. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2020.

CHEN, Y. L. *et al.* Phosphatidylserine synthase and phosphatidylserine decarboxylase are essential for cell wall integrity and virulence in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 75, n. 5, p. 1112–1132, 1 mar. 2010.

CHOW, E. W. L. *et al.* From Jekyll to Hyde: The Yeast–Hyphal Transition of *Candida albicans*. **Pathogens**, [s.l.], v. 10, n. 7, p. 859, 7 jul. 2021.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 22, 10 maio 2017.

DENNING, D. W. Renaming *Candida glabrata*—A case of taxonomic purity over clinical and public health pragmatism. **PLOS Pathogens**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. e1012055, 1 mar. 2024.

DIAS, L. P. *et al.* RcAlb-PepII, A synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis*, is a potent antimicrobial agent against *Klebsiella pneumoniae* and *Candida parapsilosis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1862, n. 2, p. 183092, 1 fev. 2020.

DÍAZ-JIMÉNEZ., D. F. Fungal Mannosyltransferases as Fitness Attributes and their Contribution to Virulence. **Current Protein & Peptide Science**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 1065–1073, 17 ago. 2017.

FAN, F. M. *et al.* *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 60, n. 5–6, p. 106673, 1 nov. 2022.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLOS Pathogens**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FARIAS, M. DE O. DE *et al.* Uso de antimicrobianos na prática clínica: desafios e estratégias. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 1–13, 13 dez. 2024.

ROMERO, H. F. *et al.* Pore formation in regulated cell death. **The EMBO Journal**, [s.l.], v. 39, n. 23, 30 dez. 2020.

FLOWERS, S. A. *et al.* Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 59, n. 1,

p. 450–460, 1 jan. 2015.

GERGONDEY, R. *et al.* The adaptive metabolic response involves specific protein glutathionylation during the filamentation process in the pathogen *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [s.l.], v. 1862, n. 7, p. 1309–1323, 1 jul. 2016.

GHOSH, A. *et al.* Indolicidin Targets Duplex DNA: Structural and Mechanistic Insight through a Combination of Spectroscopy and Microscopy. **ChemMedChem**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. 2052–2058, 1 set. 2014.

GHOSH, C.; HALDAR, J. Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. **ChemMedChem**, [s.l.], v. 10, n. 10, p. 1606–1624, 1 out. 2015.

GNAT, S. *et al.* A global view on fungal infections in humans and animals: infections caused by dimorphic fungi and dermatophytes. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 131, n. 6, p. 2688–2704, 1 dez. 2021.

GÓMEZ-GAVIRIA, M. *et al.* Non-albicans *Candida* Species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative Therapies. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 11, 21 dez. 2022.

GOSTINČAR, C. *et al.* Overview of Oxidative Stress Response Genes in Selected Halophilic Fungi. **Genes**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 143, 6 mar. 2018.

HADIANAMREI, R. *et al.* Rationally designed short cationic α -helical peptides with selective anticancer activity. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 607, p. 488–501, 1 fev. 2022.

HAJAM, Y. A. *et al.* Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 552, 5 fev. 2022.

HOLIČ, R. *et al.* Phosphatidylinositol binding of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr16p represents an essential feature of this lipid transfer protein to provide protection against azole antifungals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s.l.], v. 1841, n. 10, p. 1483–1490, 1 out. 2014.

ISLAM, S.; ALDSTADT, J.; AGA, D. Global antimicrobial resistance: a complex and dire threat with few definite answers. **Tropical Medicine & International Health**, [s.l.], v. 24, n. 6, p. 658–662, 1 jun. 2019.

JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 14–30, 4 jan. 2021.

JOSHI, K. M. *et al.* Biofilm inhibition in *Candida albicans* with biogenic hierarchical zinc-oxide nanoparticles. **Biomaterials Advances**, [s.l.], v. 134, p. 112592, 1 mar. 2022.

JUVVADI, P. R. *et al.* Kin1 kinase localizes at the hyphal septum and is dephosphorylated by calcineurin but is dispensable for septation and virulence in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 505, n. 3, p.

740–746, 2 nov. 2018.

KANG, H. K. *et al.* The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2017.

KAYAASLAN, B. *et al.* Characteristics of candidemia in COVID-19 patients; increased incidence, earlier occurrence and higher mortality rates compared to non-COVID-19 patients. **Mycoses**, [s.l.], v. 64, n. 9, p. 1083–1091, 1 set. 2021.

KAZAN, K.; GARDINER, D. M. Targeting pathogen sterols: Defence and counterdefence? **PLOS Pathogens**, [s.l.], v. 13, n. 5, p. e1006297, 1 maio 2017.

KHODADADI, H. *et al.* Prevalence of superficial-cutaneous fungal infections in Shiraz, Iran: A five-year retrospective study (2015–2019). **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s.l.], v. 35, n. 7, p. e23850, 1 jul. 2021.

KIM, J.; PARK, S.; LEE, J. S. Epigenetic Control of Oxidative Stresses by Histone Acetyltransferases in *Candida albicans*. **J. Microbiol. Biotechnol**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 181–189, 28 fev. 2018.

KONOPKA, J. B. Plasma Membrane Phosphatidylinositol 4-Phosphate Is Necessary for Virulence of *Candida albicans*. **mBio**, [s.l.], v. 13, n. 3, 1 jun. 2022.

KRAMARA, J. *et al.* Systematic analysis of the *Candida albicans* kinome reveals environmentally contingent protein kinase-mediated regulation of filamentation and biofilm formation in vitro and in vivo. **mBio**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. e0124924, 1 ago. 2024.

KUMAR, K. *et al.* *Candida glabrata*: A Lot More Than Meets the Eye. **Microorganisms**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 39, 30 jan. 2019.

LIMA, P. G. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sciences**, [s.l.], v. 278, p. 119647, 1 ago. 2021a.

LIN, Y. *et al.* Mutual regulation of lactate dehydrogenase and redox robustness. **Frontiers in Physiology**, [s.l.], v. 13, p. 1038421, 4 nov. 2022.

LINS, L. *et al.* Relationships between the orientation and the structural properties of peptides and their membrane interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1778, n. 7–8, p. 1537–1544, 1 jul. 2008.

MAERKER, C. *et al.* Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. **The FEBS Journal**, [s.l.], v. 272, n. 14, p. 3615–3630, 1 jul. 2005.

MAGALHÃES, V. M. da S. *et al.* Desafios no combate à resistência antimicrobiana: abordagem global e local. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 248–257, 8 jan. 2025.

MARTINEZ, O. F. *et al.* Deciphering bioactive peptides and their action mechanisms through proteomics. **Expert Review of Proteomics**, [s.l.], v. 13, n. 11, p. 1007–1016, 1 nov. 2016.

- MARTIN-YKEN, H. *et al.* A conserved fungal hub protein involved in adhesion and drug resistance in the human pathogen *Candida albicans*. **The Cell Surface**, [s.l.], v. 4, p. 10–19, 1 dez. 2018.
- MEGRI, Y. *et al.* *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: The urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 7 abr. 2020.
- MISHRA, N. N. *et al.* Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, [s.l.], v. 54, n. 3, p. 201–235, 27 ago. 2007.
- LEITE-JÚNIOR, D. P. *et al.* The *Candida* Genus Complex: Biology, Evolution, Pathogenicity and Virulence, Beyond the *Candida Albicans* Paradigm. A Comprehensive Review. **Virology & Immunology Journal**, [s.l.], v. 7, n. 2, 08 nov. 2023
- MORACE, G. *et al.* Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 254–259, 1 dez. 2014.
- MOREIRA-WALSH, B. *et al.* Membrane Integrity Contributes to Resistance of *Cryptococcus neoformans* to the Cell Wall Inhibitor Caspofungin. **mSphere**, [s.l.], v. 7, n. 4, 31 ago. 2022.
- MOROGOVSKEY, A. *et al.* Horizontal Gene Transfer of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology Spectrum**, [s.l.], v. 10, n. 3, 29 jun. 2022.
- MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [s.l.], v. 1587, n. 2–3, p. 240–248, 18 jul. 2002.
- MUDENDA, S.; MUDENDA, S. Global Burden of Fungal Infections and Antifungal Resistance from 1961 to 2024: Findings and Future Implications. **Pharmacology & Pharmacy**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 81–112, 12 abr. 2024.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, [s.l.], v. 4, n. 2, 25 mar. 2016.
- MUNZEN, M. E. *et al.* An Update on the Global Treatment of Invasive Fungal Infections. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 15, p. 1095–1117, 1 nov. 2023.
- NAGAOKA, I. *et al.* Modulation of Neutrophil Apoptosis by Antimicrobial Peptides. **International Scholarly Research Notices**, [s.l.], v. 2012, n. 1, p. 345791, 1 jan. 2012.
- NAVARRO-MENDOZA, M. I. *et al.* Alternative ergosterol biosynthetic pathways confer antifungal drug resistance in the human pathogens within the *Mucor* species complex. **mBio**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. e0166124, 14 ago. 2024.
- NIAZI-ALI, S. *et al.* Drug–drug interaction database for safe prescribing of systemic antifungal agents. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, [s.l.], v. 8, 30 abr. 2021.

- O'CONNOR-MONELEY, J. *et al.* The role of the Mediator complex in fungal pathogenesis and response to antifungal agents. **Essays in Biochemistry**, [s.l.], v. 67, n. 5, p. 843–851, 13 set. 2023.
- OKUMOTO, K. *et al.* Peroxisome: Metabolic Functions and Biogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s.l.], v. 1299, p. 3–17, 2020.
- OLICÓN-HERNÁNDEZ, D. R. *et al.* Overview on the biochemical potential of filamentous fungi to degrade pharmaceutical compounds. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. SEP, p. 256025, 20 set. 2017.
- OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, [s.l.], v. 157, p. 10–21, 1 fev. 2019.
- OSTOLAZA, H. *et al.* Membrane Permeabilization by Pore-Forming RTX Toxins: What Kind of Lesions Do These Toxins Form? **Toxins**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. 354, 18 jun. 2019.
- PARAMBATH, S. *et al.* *Candida albicans*—A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 62, n. 6, 27 jun. 2024.
- PARRA, L. Y. C.; CÁRDENAS, J. E. P. Mecanismos de resistencia a fluconazol expresados por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. **Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo**, [s.l.], v. 22, 22 jul. 2020.
- PATTERSON, M. J. *et al.* Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the cap1 transcription factor and macrophage escape. **Antioxidants and Redox Signaling**, [s.l.], v. 19, n. 18, p. 2244–2260, 20 dez. 2013.
- PEIXOTO, L. R. *et al.* Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida spp.* **Archives of Oral Biology**, [s.l.], v. 73, p. 179–185, 1 jan. 2017.
- PEJENAUTE-OCHOA, M. D. *et al.* Structural, evolutionary, and functional analysis of the protein o-mannosyltransferase family in pathogenic fungi. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 328, 23 abr. 2021.
- PEREIRA, C. M. *et al.* Epidemiologia, biologia, resistência a antifúngicos e virulência do fungo emergente em *Candida auris*. **Brazilian Journal of Development**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 74815–74825, 24 nov. 2022.
- PÉREZ, J. C. Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance. **International Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 311, n. 3, p. 151490, 1 abr. 2021.
- PRASAD DR, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 5, p. 107996, 29 ago. 2014.
- PREMANANDH, J.; SAMARA, B. S.; MAZEN, A. N. Race Against Antimicrobial

- Resistance Requires Coordinated Action – An Overview. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, p. 168431, 2 fev. 2016.
- QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 42–48, 1 jan. 2014.
- RAMAGE, G. *et al.* Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 6, p. 973–980, 1 jun. 2002.
- RAMOS, J. F. *et al.* Incidência de aspergilose invasiva em pacientes com diagnóstico de covid-19 grave internados em unidades críticas e semicríticas em um hospital privado brasileiro. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 26, p. 102408, 1 set. 2022.
- RAUT, A.; HUYN, N. T. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave? **The Lancet Respiratory Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. e77, 1 ago. 2021.
- RAUTENBACH, M. *et al.* Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. **Biochimie**, [s.l.], v. 130, p. 132–145, 1 nov. 2016.
- RIBEIRO, V. A. *et al.* Desafios da resistência antimicrobiana no manejo de doenças infecciosas em adultos. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, [s.l.], v. 24, p. e18455–e18455, 2 dez. 2024.
- ROBINSON, H. F. J. *et al.* Resistencia Antibiótica de Microorganismos del grupo ESKAPE y la Relevancia de las Prácticas de Uso Prudente de Antibióticos (PROA). **Código Científico Revista de Investigación**, [s.l.], v. 4, n. E2, p. 240–254, 29 set. 2023.
- ROCHA, W. R. V. DA *et al.* *Candida* genus - Virulence factores, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. e43910414283, 17 abr. 2021.
- ROCHA, O. B. *et al.* New Methylcitrate Synthase Inhibitor Induces Proteolysis, Lipid Degradation and Pyruvate Excretion in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 108, 1 jan. 2023.
- RODRIGUES, F. *et al.* Impact of fungi on public health – A review. **Caderno de ANAIS HOME**, [s.l.], 24 ago. 2023.
- RODRÍGUEZ, A. A. *et al.* Discovery, Optimization, and Clinical Application of Natural Antimicrobial Peptides. **Biomedicines**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 1381, 3 out. 2021.
- SANDRA-TENREIRO, P. C. R. Expression of the *AZR1* gene (ORF YGR224w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, [s.l.], v. 16, n. 16, p. 1469–1481, 20 out. 2000.
- SANT, D. G. *et al.* Fungal cell membrane—promising drug target for antifungal therapy. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 121, n. 6, p. 1498–1510, 1 dez. 2016.

SARKAR, T.; CHETIA, M.; CHATTERJEE, S. Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature's Reservoir to the Laboratory and Beyond. **Frontiers in Chemistry**, [s.l.], v. 9, p. 691532, 18 jun. 2021.

SATALA, D. *et al.* More than Just Protein Degradation: The Regulatory Roles and Moonlighting Functions of Extracellular Proteases Produced by Fungi Pathogenic for Humans. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 121, 15 jan. 2023.

SCHÄFER, A. B.; WENZEL, M. A How-To Guide for Mode of Action Analysis of Antimicrobial Peptides. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 540898, 19 out. 2020.

SEYFI, R. *et al.* Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 1 set. 2020.

SHIM, E. Y. *et al.* The Yeast Chromatin Remodeler RSC Complex Facilitates End Joining Repair of DNA Double-Strand Breaks. **Molecular and Cellular Biology**, [s.l.], v. 25, n. 10, p. 3934, 1 maio 2005.

SHIVARATHRI, R. *et al.* Comparative Transcriptomics Reveal Possible Mechanisms of Amphotericin B Resistance in *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 66, n. 6, 1 jun. 2022.

SHRIVASTAVA, S. R.; SHRIVASTAVA, P. S.; RAMASAMY, J. Responding to the challenge of antibiotic resistance: World Health Organization. **Journal of Research in Medical Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 3, 1 mar. 2018.

SILVA, R. A. da *et al.* Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, [s.l.], v. 44, n. 126, p. 607–623, 16 nov. 2020.

SO, Y.-S. *et al.* Regulatory Mechanism of the Atypical AP-1-Like Transcription Factor Yap1 in *Cryptococcus neoformans*. **mSphere**, [s.l.], v. 4, n. 6, 18 dez. 2019.

SOKOLOV, S. S. *et al.* LAM Genes Contribute to Environmental Stress Tolerance but Sensibilize Yeast Cells to Azoles. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 11, p. 495642, 28 jan. 2020.

SOUSA, Y. V. *et al.* Itraconazole in human medicine and veterinary practice. **Journal of Medical Mycology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 101473, 1 jun. 2024.

SOUZA, A. DE S. *et al.* O aumento das resistências bacterianas associado ao uso de antimicrobianos durante a pandemia de covid-19: uma revisão integrativa. **Revista Contemporânea**, [s.l.], v. 3, n. 12, p. 29815–29832, 16 dez. 2023.

SOUZA, P. F. N. *et al.* Antidermatophytic activity of synthetic peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin. **Mycoses**, [s.l.], v. 63, n. 9, p. 979–992, 1 set. 2020b.

- SOUZA, P. F. N. *et al.* Photosynthetic and biochemical mechanisms of an EMS-mutagenized cowpea associated with its resistance to cowpea severe mosaic virus. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 219–234, 1 jan. 2017.
- SOUZA, P. F. N. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, [s.l.], v. 175, p. 132–145, 1 ago. 2020a.
- SOUZA, R. F. C DE; DANTAS, R. T. P. Resistência bacteriana aos antimicrobianos com ênfase nas lesões infecciosas hepáticas. **REVISTA FOCO**, [s.l.], v. 17, n. 12, p. e7345, 30 dez. 2024.
- SPITZER, M. *et al.* Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 169–185, 17 fev. 2017.
- UWAMAHORO, N. *et al.* The Functions of Mediator in *Candida albicans* Support a Role in Shaping Species-Specific Gene Expression. **PLOS Genetics**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. e1002613, abr.2012.
- VAN-ROSSUM, M. W. P. C. *et al.* Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, [s.l.], v. 130, n. 2, p. 207–216, 22 dez. 1997.
- VANREPELEN, G. *et al.* Sources of Antifungal Drugs. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 171, 28 jan. 2023.
- VÁZQUEZ-CABRERA, N.; ESPINOSA-MÁRQUEZ, A.; CEDILLO-RAMÍREZ, M. L. Evolución histórica de la Organización Mundial de la Salud y la resistencia a los antimicrobianos. **Rev Panam Salud Publica**, [s.l.], v. 47, p. 51, fev. 2023.
- VU, K. *et al.* Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, [s.l.], v. 5, n. 3, 3 jun. 2014.
- WANG, J. J. *et al.* Three α -1,2-mannosyltransferases contribute differentially to conidiation, cell wall integrity, multistress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, [s.l.], v. 70, p. 1–10, 1 set. 2014.
- WANG, Y. *et al.* Histone acetyltransferase Sas3 contributes to fungal development, cell wall integrity, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 90, n. 4, 1 abr. 2024.
- WESGUERBER, T. *et al.* A influência do uso de antimicrobianos na produção animal e o impacto nos produtos derivados destinados à alimentação humana e animal. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. e71369–e71369, 22 jul. 2024.
- WHALEY, S. G. *et al.* Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 7, 11 jan. 2017.
- WHITNEY, L. *et al.* Effectiveness of an antifungal stewardship programme at a London teaching hospital 2010–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 234–241, 1 jan. 2019.

WHO. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization Report**, p. 25, out. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241> Acesso em 21 jan. 2025.

WILSON, B. *et al.* The RSC Chromatin Remodeling Complex Bears an Essential Fungal-Specific Protein Module With Broad Functional Roles. **Genetics**, [s.l.], v. 172, n. 2, p. 795–809, 1 fev. 2006.

XIANG, M. J. *et al.* *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 386–393, 1 jun. 2013.

YAN, Y. *et al.* Advances of peptides for antibacterial applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 202, p. 111682, 1 jun. 2021.

YING, S.; CHUNYANG, L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. **Mycoses**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 50–55, 1 jan. 2012.

ZHANG, L. BIN; FENG, M. G. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 102, n. 12, p. 4995–5004, 1 jun. 2018.

ZHANG, L. J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. R14–R19, 11 jan. 2016.

ZHANG, Q. Y. *et al.* Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1–25, 9 Sep. 2021.

ZHENG, T. *et al.* Biology and genetic diversity of *Candida krusei* isolates from fermented vegetables and clinical samples in China. **Virulence**, [s.l.], v. 15, n. 1, 31 dez. 2024.

ANEXO A – TABELA SUPLEMENTAR 1

Tabela Suplementar - Proteínas do controle (DMSO) – Processo biológico
(*Biological Process*)

Proteínas identificadas por MS/MS - ESI-QUAD-TOF

Protein Name	ID (Uniprot)	Organism Reference	Cellular Compartment
<u>Carbohydrate Binding</u>			
D-ribose-5-phosphate ketol-isomerase	A0A2H3HDL0	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Probable pectate lyase D	PLYD_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Secreted
<u>Chaperone</u>			
T-complex protein 1 subunit delta	P39078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
T-complex protein 1 subunit alpha	P12612	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim10	TIM10_ASPFU	<i>Neosartorya fumigata</i>	Mitochondrion inner membrane
Histone chaperone asf1	ASF1_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nucleus
<u>DNA and RNA Binding</u>			
General transcription and DNA repair factor IIH subunit TFB1	P32776	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
mRNA-binding protein PUF3	Q07807	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion outer membrane
Eukaryotic translation initiation factor 4B	P34167	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
DNA polymerase zeta catalytic subunit	P14284	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
Pre-rRNA-processing protein RIX1	P38883	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Silenced mating-type protein ALPHA1	POCY07	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Fork head protein homolog 2	P41813	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
tRNA-aminoacylation cofactor ARC1	P46672	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
THO complex subunit 2	P53552	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
DNA replication licensing factor MCM3	P24279	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Telomere length regulation protein ELG1	Q12050	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
ATP-dependent DNA helicase CHL1	P22516	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
General negative regulator of transcription subunit 1	P25655	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
mRNA transport regulator MTR10	Q99189	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
U3 small nucleolar RNA-associated protein 20	P35194	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Nuclear mRNA export protein THP1	Q08231	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
tRNA pseudouridine synthase 4	P48567	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
MutS protein homolog 5	Q12175	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus

Origin recognition complex subunit 5	P50874	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
U3 small nucleolar RNA-associated protein 25	P40498	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Small nuclear ribonucleoprotein E	Q12330	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Eukaryotic initiation factor 4F subunit p130	P39936	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Protein SSD1	P24276	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cellular bud neck
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3HGX1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3G8R4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3HE52	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
ATP-dependent DNA helicase	A0A2H3G5K9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Nucleolar protein 58	A0A2H3GL28	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Nucleolar protein 58	A0A2H3GL28	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Csm1 domain-containing protein	A0A2H3HPM7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3H5E1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Fungal_trans domain-containing protein	A0A2H3GV43	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
60S ribosomal protein L3	RL3_ASPFU	<i>Neosartorya fumigata</i>	Cytoplasm
U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	RU2A_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nucleus
Depudecin biosynthesis cluster-specific transcription activator	DEP6_FUSLA	<i>Fusarium langsethiae</i>	Nucleus
DEP6			
Fork-head transcriptional regulator	FHL1_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Nucleus
FHL			
RNA exonuclease 4	REXO4_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Nucleus
ATP-dependent rRNA helicase	RRP3_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nucleus
RRP3			
Pre-mRNA-splicing factor RSE1	RSE1_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Nucleus
Branchpoint-bridging protein	BBP_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Nucleus
Beauvericin cluster-specific repressor BEA4	BEA4_GIBF5	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Nucleus
Ribosome biogenesis protein YTM1	YTM1_CHATD	<i>Chaetomium thermophilum</i>	Nucleus
Exportin-T	XPOT_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Nucleus
Pre-mRNA-splicing factor CEF1	CEF1_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Cytoplasm
Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	NACB_CRYNB	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D</i>	Cytoplasm
ATP-dependent RNA helicase	MRH4_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Mitochondrion
MRH4, mitochondrial			
Chromatin modification-related protein EAF1	EAF1_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nucleus
ATP-dependent RNA helicase	ROK1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Nucleus
ROK1			
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	SRB8_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Nucleus
Helicase SWR1	SWR1_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nucleus
MADS-box MEF2 type	MIG1_MAGO7	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Nucleus
transcription factor MIG1			
DNA mismatch repair protein msh3	MSH3_ASPCL	<i>Aspergillus clavatus</i>	Nucleus
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Cytoplasm
Cytochrome B pre-mRNA-processing protein 2	CBP2_SACPA	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Mitochondrion
Probable DNA polymerase (Fragment)	DPOM_AGABT	<i>Agaricus bitorquis</i>	Mitochondrion
ARS-binding factor 1	ABF1_KLUMA	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Nucleus
Replication factor C subunit 3	RFC3_BLAAD	<i>Blastobotrys adenivorans</i>	Nucleus
ATP-dependent DNA helicase	CHL1_VANPO	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	Nucleus
CHL1			

Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	MED14_CHAGB	<i>Chaetomium globosum</i>	Nucleus
RuvB-like helicase 2	RUVB2_CRYNB	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D</i>	Nucleus
General transcription and DNA repair factor IIH subunit TFB2	TFB2_CANGB	<i>Candida glabrata</i>	Nucleus
<u>extraase</u>			
Aminopeptidase 2, mitochondrial	P32454	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
Calcium-transporting ATPase 2	P38929	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vacuole membrane
Serine/threonine-protein phosphatase PP-Z1	P26570	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Polyphosphatase	P38698	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Mitochondrial intermediate peptidase	P35999	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion matrix
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	Q02863	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrial outer membrane
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	P11914	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
5'-deoxynucleotidase YBR242W	P38331	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Oligomycin resistance ATP-dependent permease YOR1	P53049	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cell membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3HSF8	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Uncharacterized protein	A0A2H3GUF3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Carboxylic ester hydrolase	A0A2H3GG51	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
PAD domain-containing protein	A0A2H3GKY6	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3HD78	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Uncharacterized protein	A0A2H3GZH2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Carboxylic ester hydrolase	A0A2H3G2F1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Vesicle-fusing ATPase	A0A2H3H277	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Sulfatase domain-containing protein	A0A2H3HXV7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Alpha-glucuronidase A	AGUA_ASPTU	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Secreted
GPI inositol-deacylase	BST1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Methionine aminopeptidase 2-2	MAP22_AJEDR	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Cytoplasm
Putative alpha-galactosidase 8	AGAL8_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Secreted
COP9 signalosome complex subunit 6	CSN6_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Cytoplasm
Probable Xaa-Pro aminopeptidase P	AMPP1_PARBD	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	cellular anatomical entity
Kynurenine formamidase	KFA_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Cytoplasm
Probable dipeptidyl-aminopeptidase B	DAPB_MAGO7	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Vacuole membrane
Mitochondrial intermediate peptidase	PMIP_COPC7	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Mitochondrion
Methionine aminopeptidase 2-1	MAP21_ASPNC	<i>Aspergillus niger</i>	Cytoplasm
Putative rhamnogalacturonase D	RHGD_ASPNC	<i>Aspergillus niger</i>	Secreted
DNA damage-inducible protein 1	DDII_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Cytoplasm
Lipase 10	LIP10_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Secreted
Tyrosine-protein phosphatase cdcA	CDC14_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Nucleus
Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	CBHA_ASPTN	<i>Aspergillus terreus</i>	Secreted
Vacuolar membrane protease	PFF1_SCLS1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Vacuole membrane
Separin	NM111_VANPO	<i>Emericella nidulans</i>	Nucleus
ATPase get3	GET3_PENRW	<i>Penicillium rubens</i>	Cytoplasm
Lysophospholipase ARB_05919	PLB1_ARTBC	<i>Arthroderma benhamiae</i>	Secreted
Probable alpha-galactosidase D	AGALD_ASPFC	<i>Neosartorya fumigata</i>	Secreted
Pro-apoptotic serine protease NMA111	NM111_VANPO	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	Nucleusmeta
Peroxisomal ATPase PEX6	PEX6_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Peroxisome membrane
<u>Ion Binding</u>			
Isocitrate lyase	P28240	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm

Uncharacterized protein	A0A2H3G9Y8	<i>Fusarium oxysporum</i>	extracellular, including cell wall
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3HE24	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
VOC domain-containing protein	A0A2H3G9B5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
Uncharacterized protein	A0A2H3GG63	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3H7B9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Uncharacterized protein OS	A0A2H3I2L7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Mitochondrion inner membrane
RING-type domain-containing protein	A0A2H3H9P3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Mitochondrion
MYND-type zinc finger protein samB	A0A2H3H3K5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3G8S2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3FYC8	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	LEU3_DEBHA	<i>Candida glabrata</i>	Cytoplasm
Mechanosensitive ion channel protein A	MSCA_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Mitochondrial intermediate peptidase	PMIP_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Mitochondrion
Translationally-controlled tumor protein homolog	TCTP_ASPFU	<i>Neosartorya fumigata</i>	Cytoplasm, cytoskeleton
<u>Ligase</u>			
Dihydrofolate synthetase	Q12676	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Asparagine synthetase domain-containing protein YML096W	Q04489	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Putative proline--tRNA ligase YHR020W	P38708	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	P36421	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3G860	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Nonribosomal peptide synthetase 7	FUSA2_GIBZE	<i>Gibberella zeae</i>	Endoplasmic reticulum
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondrial	GATB_NEOFI	<i>Neosartorya fischeri</i>	Mitochondrion
Nonribosomal peptide synthetase sidC	SIDC_ASPFU	<i>Neosartorya fumigata</i>	Cytoplasm
<u>Multifunctional enzyme</u>			
Acetyl-CoA carboxylase	Q00955	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Serine/threonine protein kinase KIN1	P13185	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Protein URA2	P07259	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	P32361	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Asperuranone polyketide synthase afoG	AFOG_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Nucleus
Highly reducing polyketide synthase cla2	CLA2_CLACD	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Nucleus
Bifunctional cytochrome P450/NADPH--P450 reductase	FUM6_GIBM7	<i>Gibberella moniliformis</i>	Mitochondrion
Atrochrysone carboxylic acid synthase Agnps1	AGPKS_PAEDI	<i>Paecilomyces divaricatus</i>	Nucleus
Highly reducing polyketide synthase sdnO	SDNO_SORAA	<i>Sordaria araneosa</i>	Cytoplasm
Polyketide synthase 1	PKS1_METAS	<i>Metarhizium album</i>	Nucleus
Highly reducing polyketide synthase ausV	AUSV_ASPCI	<i>Aspergillus calidoustus</i>	Nucleus
Non-reducing polyketide synthase Dhc5	DHC5_ALTCI	<i>Alternaria cinerariae</i>	Nucleus

Highly reducing polyketide synthase frbB	FRBB_BLOB1	<i>Fungal</i>	Nucleus
Highly reducing polyketide synthase otaA	OTAA_ASPC5	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Nucleus
Fatty acid synthase subunit beta	FAS1_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nucleus
Trichostatin synthetase PKS-NRPS1	EQXS_GIBF5	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Endoplasmic reticulum
Pentafunctional AROM polypeptide 1	ARO11_LODEL	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Cytoplasm
Ophiobolin F synthase obla	OBLA_ASACL	<i>Aspergillus clavatus</i>	Nucleus
Low-reducing polyketide synthase drtA	DRTA_ASPCI	<i>Aspergillus calidoustus</i>	Nucleus
3-methylcinnaldehyde synthase	PKS1_SARSH	<i>Sarocladium schorii</i>	Nucleus
<u><i>Oxidoreductase</i></u>			
Chorismate synthase	P28777	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Aldehyde dehydrogenase 5, mitochondrial	P40047	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	P08067	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion inner membrane
NADPH-dependent aldehyde reductase ARII	P53111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Aldedh domain-containing protein	A0A2H3HJ18	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Uncharacterized protein	A0A2H3G928	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Aldehyde dehydrogenase	A0A2H3GXQ4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Endoplasmic reticulum
Uncharacterized protein	A0A2H3G4S9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
FMN hydroxy acid dehydrogenase domain-containing protein	A0A2H3HFU2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Mitochondrion
AMP-binding domain-containing protein	A0A2H3GKE3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3FP72	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Cytochrome P450 monooxygenase virE	VIRE_HYPVG	<i>Hypocrea virens</i>	Mitochondrion
Alternative oxidase, mitochondrial	AOX_PICST	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Mitochondrion
Squalene monooxygenase	ERG1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Microsome membrane
3-isopropylmalate dehydrogenase	LEU3_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Cytoplasm
Cytochrome c peroxidase, mitochondrial	CCPR_ASPFU	<i>Neosartorya fumigata</i>	Mitochondrion
2-oxoglutarate-dependent dioxygenase gloC	GLOC_GLAL2	<i>Glarea lozoyensis</i>	Cytoplasm
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD_ASPNG	<i>Aspergillus niger</i>	Cytoplasm
Cytochrome P450 monooxygenase flvC	FLVC_ASPFN	<i>Aspergillus flavus</i>	Membrane
Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	MIA40_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Mitochondrion inner membrane
2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate reductase	RIB7_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Mitochondrion
FAD-dependent monooxygenase SAT7	SAT7_STACB	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Membrane
Cytochrome P450 monooxygenase iliC	ILIC_NEOS2	<i>Neonectria sp.</i>	Membrane
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	GPD_LACTH	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Cytoplasm
Short chain dehydrogenase macD	MACD_PENTR	<i>Penicillium terrestre</i>	Mitochondrion
<u><i>Protein Bindig</i></u>			
Vacuolar protein sorting-associated protein 45	P38932	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Vacuolar protein-sorting-associated protein 24	P36095	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm

Hercynylcysteine sulfoxide lyase Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	EGT2_NEUCR PPID_DEBHA	<i>Neurospora crassa</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	Cytoplasm Cytoplasm
<u>Transferase</u>			
Phosphatidylinositol 4-kinase LSB6	P42951	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cell membrane
tRNA wybutosine-synthesizing protein 4	Q08282	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Probable mannosyltransferase YUR1	P26725	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Golgi apparatus membrane
E3 ubiquitin-protein ligase RSP5	P39940	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Thiamine pyrophosphokinase	P35202	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
tRNA (uracil(54)-C(5))- methyltransferase	P33753	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Deoxyhypusine synthase	P38791	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Serine/threonine-protein kinase MEC1	P38111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Phospho-2-dehydro-3- deoxyheptonate aldolase, tyrosine- inhibited	P32449	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Telomere length regulation protein TEN1	Q07921	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Purine nucleoside phosphorylase	Q05788	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Actin-regulating kinase 1	P53974	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm, cytoskeleton, actin patch
2-(3-amino-3- carboxypropyl)histidine synthase subunit 2	P32461	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase	P25576	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Vacuole morphology and inheritance protein 14	Q06708	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vacuole membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3HIV0	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
PUA domain-containing protein	A0A2H3H509	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Protein kinase domain-containing protein	A0A2H3HUL9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
HECT domain-containing protein	A0A2H3I3B4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Flavin mononucleotide kinase 1	A0A2H3GG63	<i>Fusarium oxysporum f.</i>	Cytoplasm
Autophagy-related protein 1	A0A2H3FZQ0	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Plasma membrane ATPase	A0A2H3HTQ4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cell membrane
Cyclophilin-60	A0A2H3GML0	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Protein kinase domain-containing protein	A0A2H3I6J7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Thymidylate synthase	A0A2H3I1X2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Protein kinase domain-containing protein	A0A2H3H2L9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
C3H1-type domain-containing protein	A0A2H3H6H8	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Cytokinesis protein sepH	SEPH_ASPTN	<i>Aspergillus terreus</i>	cellular anatomical entity
Spindle assembly checkpoint kinase	IPL1_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Nucleus
Lipoyl synthase, mitochondrial	LIPA_ARTOC	<i>Arthroderma otae</i>	Mitochondrion
GPI ethanolamine phosphate transferase 2	GPI7_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	Endoplasmic reticulum membrane
O-acyltransferase ausQ	AUSQ_ASPCI	<i>Aspergillus calidoustus</i>	Cytoplasm
Non-reducing polyketide synthase pks27	PKS27_ASPFN	<i>Aspergillus flavus</i>	Cytoplasm
rRNA methyltransferase 1, mitochondrial (Fragment)	MRM1_LACK1	<i>Lachancea kluyveri</i>	Mitochondrion
Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-4 specific	SET1_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	Chromosome
mRNA-capping enzyme subunit alpha	MCE1_CANAX	<i>Candida albicans</i>	Nucleus

Transport or Structural Activity

37S ribosomal protein S24, mitochondrial	Q03976	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
Spindle pole component 29	P33419	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Valine amino-acid permease	P41815	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Membrane
Cytokinesis protein 3	Q07533	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
GTPase-activating protein GYP7	P48365	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
26S proteasome regulatory subunit RPN3	P40016	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteasome complex
Trafficking protein particle complex II-specific subunit 130	Q03660	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Golgi apparatus
GTPase-activating protein GYP1	Q08484	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Golgi apparatus
Importin subunit beta-3	P32337	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Protein SLM4	P38247	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vacuole membrane
Protein CSF1	Q12150	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cell membrane
Azole resistance protein 1	P50080	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cell membrane
GTPase-activating protein GYP3	P48566	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Quinidine resistance protein 3	P38227	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cell membrane
Guanine nucleotide exchange factor subunit RIC1	P40395	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Golgi apparatus membrane
Vacuolar basic amino acid transporter 3	P25594	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vacuole membrane
SCF E3 ubiquitin ligase complex F-box protein GRR1	P24814	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3GKN7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3GSI7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
C2 domain-containing protein	A0A2H3GY02	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
MFS domain-containing protein	A0A2H3I225	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Protein transport protein BOS1	A0A2H3HH64	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
YccF domain-containing protein	A0A2H3GTX1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
STAS domain-containing protein	A0A2H3HZ87	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3HE89	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Ras-GAP domain-containing protein	A0A2H3GZII	<i>Fusarium oxysporum</i>	Endoplasmic reticulum
Uncharacterized protein	A0A2H3I757	<i>Fusarium oxysporum</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Septin-type G domain-containing protein	A0A2H3HBX0	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cell cortex
Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 2	A0A2H3HG12	<i>Fusarium oxysporum</i>	Golgi apparatus membrane
Phospholipid-transporting ATPase	A0A2H3GRK5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3GE97	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
MFS domain-containing protein	A0A2H3GFC5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Probable lysosomal cobalamin transporter	LMBD1_ASPFC	<i>Neosartorya fumigata</i>	Lysosome membrane
Nuclear distribution protein PAC1-1	LIS11_SORMK	<i>Sordaria macrospora</i>	Cytoplasm, cytoskeleton
MFS-type efflux pump MMF1	MMF1_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Cell membrane
Myosin-1	MYO1_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Cytoplasm, cytoskeleton, actin patch
37S ribosomal protein S25, mitochondrial	RT25_VANPO	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	Mitochondrion
ABC transporter atnG	ATNG_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Cell membrane
Actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1	PAN1_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Endosome membrane
Nucleoporin NUP188	NU188_CHATD	<i>Chaetomium thermophilum</i>	Nucleus, nuclear pore complex
Tubulin gamma chain	TBG_COPC7	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Cytoplasm, cytoskeleton, microtubule organizing center, spindle pole body
Nuclear distribution protein PAC1	LIS1_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Cytoplasm, cytoskeleton
60S ribosomal protein L17	RL17_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Cytoplasm
<u>Ubiquitination</u>			
Alpha1-proteinase inhibitor-degradation deficient protein 37	Q03233	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm

Ribosome quality control complex subunit 1	Q05468	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
E3 ubiquitin-protein ligase linker protein MMS1	Q06211	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
ERAD-associated E3 ubiquitin-protein ligase component HRD3	Q05787	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Ubiquitin thioesterase OTU1	P43558	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Arrestin_N domain-containing protein	A0A2H3FYT2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Ubiquitinyl hydrolase 1	A0A2H3HWZ1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Probable E3 ubiquitin-protein ligase TOM1	TOM1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Nucleus
Defective in cullin neddylation protein 1	DCN1_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Ubiquitin ligase complex
E3 ubiquitin-protein ligase RSP5	RSP5_CHATD	<i>Chaetomium thermophilum</i>	Cytoplasm
<u>Unknown</u>			
Protein FMP16, mitochondrial	Q12497	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
Uncharacterized protein YNL146C-A	Q3E7Z1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unknown
Uncharacterized protein YDL176W	Q12027	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
BTB/POZ domain-containing protein YLR108C	Q12259	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Accumulates dyads protein 3	Q07732	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prospore membrane
Uncharacterized protein YKL023C-A	Q2V2P3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Membrane
Ankyrin repeat-containing protein YCR051W	P25631	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Protein FMP27, mitochondrial	Q06179	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion membrane
Uncharacterized protein YMR103C	Q04436	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unknown
Facilitator of iron transport 3	Q08907	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Secreted, cell wall
Early meiotic induction protein 1	Q04406	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Trans-acting factor D	Q06891	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Uncharacterized protein YLR149C	Q99296	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unknown
Mitochondrial fusion and transport protein UGO1	Q03327	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion outer membrane
Putative uncharacterized protein YER138W-A	P0C270	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unknown
Cell wall protein YOR214C	Q12282	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Secreted, cell wall
Uncharacterized protein YBR225W	P38321	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unknown
Altered inheritance of mitochondria protein 20	P40451	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vacuole membrane
Putative transcriptional activator MSA2	P36157	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Ino eighty subunit 1	P43579	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	P36121	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
HET domain-containing protein	A0A2H3HA18	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
Vac14_Fig4_bd domain-containing protein	A0A2H3HI61	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
GST N-terminal domain-containing protein	A0A2H3G8W5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Elongator complex protein 1	A0A2H3GM62	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3GKN9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
CFEM domain-containing protein	A0A2H3HXN2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Uncharacterized protein		<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
MmgE_Prpd_C domain-containing protein	A0A2H3HSN0	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Uncharacterized protein	A0A2H3HL55	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Autophagy-related protein 27	ATG27_ARTBC	<i>Arthroderma benhamiae</i>	Cytoplasmic vesicle membrane
KNR4/SMI1 homolog	SMI1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Celular bud neck

Vacuolar protein sorting/targeting protein 10	VPS10_ARTBC	<i>Arthroderma benhamiae</i>	Golgi apparatus, trans-Golgi network membrane
Stress response protein NST1	NST1_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Cytoplasm
Altered inheritance of mitochondria protein 9, mitochondrial	AIM9_VANPO	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	Mitochondrion
Autophagy-related protein 2	ATG2_GIBZE	<i>Gibberella zeae</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Meiotic sister-chromatid recombination protein 6, mitochondrial	MSC6_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Mitochondrion
Vesicular-fusion protein SEC17	SEC17_COPC7	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Membrane
Vacuolar protein sorting/targeting protein 10	VPS10_TALMQ	<i>Talaromyces marneffe</i>	Golgi apparatus, trans-Golgi network membrane
Required for respiratory growth protein 1, mitochondrial	RRG1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Mitochondrion
Probable kinetochore protein NDC80	NDC80_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Chromosome, centromere, kinetochore
Vacuolar protein sorting/targeting protein 10	VPS10_COCP7	<i>Coccidioides posadasii</i>	Golgi apparatus, trans-Golgi network membrane
pH-response regulator protein palH/prr-4	PALH_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Cell membrane
Woronin sorting complex protein	WSC_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Peroxisome membrane
Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein 1	CIAO1_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	CIA complex
WD repeat-containing protein JIP5	JIP5_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Nucleus, nucleolus
Extracellular metalloproteinase	A0A2H3GNA2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Secreted

ANEXO B – TABELA SUPLEMENTAR 2

Tabela Suplementar – Proteínas do tratamento com o PepGAT – Processo biológico
(*Biological Process*)

Proteínas identificadas por MS/MS - ESI-QUAD-TOF

Protein Name	ID (Uniprot)	Organism Reference	Cellular Compartment
<u>Chaperone</u>			
Histone chaperone RTT106	RT106_COCIM	<i>Coccidioides immitis</i>	Nucleus
<u>DNA and RNA Binding</u>			
ATP-dependent DNA helicase RRM3	P38766	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Ribosome biogenesis protein TSR1	Q07381	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
DNA polymerase alpha-binding protein	Q01454	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Pre-mRNA-splicing factor CEF1	Q03654	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
ATP-dependent rRNA helicase RRP3	P38712	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Thiamine biosynthesis regulatory protein	P38141	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Transcriptional regulatory protein ASH1	P34233	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16	P32259	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Guanine nucleotide exchange factor SRM1	P21827	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Regulatory protein CAT8	P39113	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Transcription initiation factor TFIID subunit 6	P53040	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	P38249	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Chromatin structure-remodeling complex protein RSC30	P38781	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3GN99	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Uncharacterized protein	A0A2H3GZB2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Mitochondrion
Uncharacterized protein	A0A2H3GZH5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
Uncharacterized protein	A0A2H3HVM2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
RRM domain-containing protein	A0A2H3FSP2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Sec2p domain-containing protein	A0A2H3H356	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	A0A2H3H2I8	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Transcription elongation factor SPT6	SPT6_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Nucleus

General transcription and DNA repair factor IIH subunit TFB2	TFB2_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nucleus
Sterigmatocystin biosynthesis regulatory protein	AFLR_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Nucleus
Pre-mRNA-splicing factor SYF1	SYF1_KLULC	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Nucleus
Transcription factor pbcR	PBCR_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	Nucleus
AP-1-like transcription factor YAP1	AP1_KLULC	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Nucleus
Protein HIR1	HIR1_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Nucleus
Cyanate hydratase	CYNS_AJEDR	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Cytoplasm
ATP-dependent RNA helicase DHH1	DHH1_COCIM	<i>Coccidioides immitis</i>	Cytoplasm

Hydrolase

Protein SNQ2	P32568	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Membrane
Mitochondrial inner membrane i-AAA protease supercomplex subunit YME1	P32795	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion inner membrane
Histone acetyltransferase SAS3	P34218	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Histone deacetylase RPD3	P32561	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3G8A7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cell wall
Uncharacterized protein	A0A2H3HKE9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
AAA domain-containing protein	A0A2H3HWT9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Patatin-like phospholipase domain-containing protein CNBE2340	PLPL_CRYNB	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D</i>	Membrane
Translation factor guf1, mitochondrial	GUF1_ASPNC	<i>Aspergillus niger</i>	Mitochondrion inner membrane
Patatin-like phospholipase domain-containing protein NFIA_019760	PLPL_NEOFI	<i>Neosartorya fischeri</i>	Membrane
Endoribonuclease ysh-1	YSH1_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Nucleus
ATP-dependent RNA helicase MAK5	MAK5_LODEL	<i>Loederomyces elongisporus</i>	Nucleus
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor CFD1	CFD1_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Cytoplasm
ATP-dependent RNA helicase MSS116, mitochondrial	MS116_PICGU	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Mitochondrion matrix
Type 1 phosphatases regulator YPI1	YPI1_MAGO7	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Nucleus
Putative subtilisin-like proteinase 1	SPL1_ENCCU	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Secreted, extracellular space

Ion Binding

Uncharacterized protein	A0A2H3I5T3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
PHD domain-containing protein	A0A2H3H536	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Presilphiperfolan-8-beta-ol synthase	BOT2_BOTFU	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Cytoplasm

Ligase

Citrulline--aspartate ligase	A0A2H3HU47	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Nonribosomal peptide synthetase cm3A	CM3A_CORMM	<i>Cordyceps militaris</i>	Cytoplasm

Multifunctional enzyme

Fatty acid synthase subunit alpha	P19097	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Carrier domain-containing protein	A0A2H3H0B3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Fatty acid synthase 2	FAS2_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Fatty acid synthase complex
PF 1022-synthetase	PFSYN_ROSSX	<i>Rosellinia sp.</i>	Endoplasmic reticulum
Pentafunctional AROM polypeptide	ARO1_ASPFC	<i>Neosartorya fumigata</i>	Cytoplasm
Malpicyclin synthetase	MPCA_MORAP	<i>Mortierella alpina</i>	Nucleus

Oxidoreductase

Diphthamide biosynthesis protein 3	Q3E840	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
D-2-hydroxyglutarate--pyruvate transhydrogenase DLD2	P46681	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion matrix
Putative aryl-alcohol dehydrogenase AAD3	P25612	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion
PKS_ER domain-containing protein	A0A2H3FV77	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Uncharacterized protein	A0A2H3G615	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
2-Hacid_dh_C domain-containing protein	A0A2H3GFX6	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Sacchrp_dh_NADP domain-containing protein	A0A2H3I789	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cytoplasm
Oxidored_FMN domain-containing protein	A0A2H3HQA2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Mitochondrion
D-lactate dehydrogenase [cytochrome], mitochondrial	DLD1_KLULC	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Mitochondrion
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	G3P_BOLED	<i>Boletus edulis</i>	Cytoplasm

Protein Bindig

Beige protein homolog 1	P25356	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Dimer_Tnp_hAT domain-containing protein	A0A2H3GGH6	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
Autophagy-related protein 11	ATG11_CANAL	<i>Candida albicans</i>	Vacuole membrane
26S proteasome regulatory subunit 8 homolog	PRS8_ENCCU	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Cytoplasm

Transferase

Protein-lysine N-methyltransferase EFM4	P40516	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1	P27810	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Golgi apparatus membrane
Histone acetyltransferase SAS3	SAS3_YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nucleus
Osmosensing histidine protein kinase SLN1	P39928	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cell membrane
Palmitoyltransferase erf2	ERFB_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Endoplasmic reticulum membrane
2-methylcitrate synthase, mitochondrial	PRPC_ASPFC	<i>Neosartorya fumigata</i>	Mitochondrion
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	CHO2_COCP7	<i>Coccidioides posadasii</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Palmitoyltransferase PFA3	PFA3_KLULC	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Vacuole membrane

Transport or Structural Activity

Membrane-anchored lipid-binding protein LAM4	P38800	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Importin beta-like protein KAP120	Q02932	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 1, mitochondrial	P39006	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrion inner membrane
ATP-dependent bile acid permease	P32386	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vacuole membrane
MFS domain-containing protein	A0A2H3GT00	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3HFA6	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
MFS domain-containing protein	A0A2H3FX74	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
MFS domain-containing protein	A0A2H3GQL4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Protein transport protein SEC31	SEC31_PHANO	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Cytoplasmic vesicle
Dynein heavy chain, cytoplasmic	DYHC_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Cytoplasm, cytoskeleton
Ribosome biogenesis protein NSA2	NSA2_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Nucleus

Monopolar spindle protein 2	MPS2_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Microtubule organizing center
Peroxisomal membrane protein PEX17	PEX17_YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Peroxisome membrane
Sorting nexin-41	SNX41_ASHGO	<i>Ashbya gossypii</i>	Endosome membrane
<u>Ubiquitination</u>			
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1	BRE1_CRYNB	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans serotype D</i>	Nucleus
<u>Unknown</u>			
Exocyst complex component EXO84	P38261	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cellular bud neck
AP-3 complex subunit delta	Q08951	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Golgi apparatus
Uncharacterized protein YLR112W	Q12130	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unknown
SNF1 protein kinase subunit beta-3	Q04739	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm
Sister chromatid cohesion protein DCC1	P25559	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chromosome, centromeric region
Uncharacterized protein	A0A2H3G3Y6	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Protein transport protein sec16	A0A2H3HPX9	<i>Fusarium oxysporum</i>	Endoplasmic reticulum membrane
ArAE_2_N domain-containing protein	A0A2H3HTL4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
TRP_N domain-containing protein	A0A2H3GXB3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Membrane
Uncharacterized protein	A0A2H3H6Y6	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nucleus
zf-Mss51 domain-containing protein	A0A2H3H634	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
Uncharacterized protein	A0A2H3HWW7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
DUF2433 domain-containing protein	A0A2H3HL84	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
BTB domain-containing protein	A0A2H3I5D4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Unknown
Required for respiratory growth protein 8, mitochondrial	RRG8_ZYGRO	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Mitochondrion
Putative uncharacterized protein	YU076_USTMA	<i>Ustilago maydis</i>	Unknown
Autophagy-related protein 5	ATG5_GIBZE	<i>Gibberella zeae</i>	Membrane
Autophagy-related protein 2	ATG2_COCIM	<i>Coccidioides immitis</i>	Endoplasmic reticulum membrane
Golgi to ER traffic protein 2	GET2_LODEL	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Endoplasmic reticulum membrane

ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo científico publicado na revista *Microbial Pathogenesis* (Fator de impacto: 3,3).

Disponível em: (<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106108>)

Microbial Pathogenesis 179 (2023) 106108



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath



A historical, economic, and technical-scientific approach to the current crisis in the development of antibacterial drugs: Promising role of antibacterial peptides in this scenario

Yeimer A.S. Guevara^a, Maria H.C. Santos^b, Francisco I.R. Gomes^b, Sheheryar^b, Felipe P. Mesquita^{a,b}, Pedro F.N. Souza^{a,b,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antibacterial resistance
Antibiotic crisis
Multidrug-resistant pathogens
Synthetic antibacterial peptides

ABSTRACT

The emergence of antibiotic resistance (AMR) is a global public health problem. According to estimates, drug-resistant bacteria infect 2 million patients and perish 23,000 annually. To overcome this problem, antimicrobial peptides became a potential solution based on a new mechanism of action against bacteria. This article addresses the phenomenon of antibacterial resistance in most of its nuances, responding to historical, technical-scientific, and economic aspects. Likewise, it explores new therapeutic approaches to combat multi-resistant pathogens, specifically concerning antibacterial peptides, as a potential therapeutic tool to mitigate the current crisis of antibacterial drugs. It is expected that, with technological advances, especially with the advent and adoption of artificial intelligence, there will be an increase in diversified synthetic peptide production, which can face the challenges that we have in terms of antibacterial drugs.

ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo científico publicado na revista *Antibiotics* (Fator de impacto: 4,6).

Disponível em: (<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020378>)



antibiotics



Article

No Chance to Survive: *Mo*-CBP₃-PepII Synthetic Peptide Acts on *Cryptococcus neoformans* by Multiple Mechanisms of Action

Tawanny K. B. Aguiar¹, Felipe P. Mesquita², Nilton A. S. Neto¹, Francisco Í. R. Gomes¹, Cleverton D. T. Freitas¹, Rômulo F. Carneiro³, Celso S. Nagano³, Luciana M. R. Alencar⁴, Ralph Santos-Oliveira^{5,6}, Jose T. A. Oliveira¹ and Pedro F. N. Souza^{1,2,*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60451-970, CE, Brazil

² Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-275, CE, Brazil

³ Department of Fisheries Engineering, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza 60451-970, CE, Brazil

⁴ Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Physics Department, Federal University of Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil

⁵ Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro 21941-906, RJ, Brazil

⁶ Laboratory of Nanoradiopharmacy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro 23070-200, RJ, Brazil

* Correspondence: pedrofilhobio@gmail.com or pedrofilhobio@ufc.br



Citation: Aguiar, T.K.B.; Mesquita, F.P.; Neto, N.A.S.; Gomes, F.I.R.; Freitas, C.D.T.; Carneiro, R.F.; Nagano, C.S.; Alencar, L.M.R.; Santos-Oliveira, R.; Oliveira, J.T.A.; et al. No Chance to Survive: *Mo*-CBP₃-PepII Synthetic Peptide Acts on *Cryptococcus neoformans* by Multiple Mechanisms of Action. *Antibiotics* **2023**, *12*, 378. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020378>

Academic Editors: Manuel Simões and Marc Maresca

Received: 19 January 2023

Abstract: Multidrug-resistant *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast causing a high mortality rate in immunocompromised patients. Recently, the synthetic peptide *Mo*-CBP₃-PepII emerged as a potent anticryptococcal molecule with an MIC₅₀ at low concentration. Here, the mechanisms of action of *Mo*-CBP₃-PepII were deeply analyzed to provide new information about how it led *C. neoformans* cells to death. Light and fluorescence microscopies, analysis of enzymatic activities, and proteomic analysis were employed to understand the effect of *Mo*-CBP₃-PepII on *C. neoformans* cells. Light and fluorescence microscopies revealed *Mo*-CBP₃-PepII induced the accumulation of anion superoxide and hydrogen peroxide in *C. neoformans* cells, in addition to a reduction in the activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and catalase (CAT) in the cells treated with *Mo*-CBP₃-PepII. In the presence of ascorbic acid (AsA), no reactive oxygen species (ROS) were detected, and *Mo*-CBP₃-PepII lost the inhibitory activity against *C. neoformans*. However, *Mo*-CBP₃-PepII inhibited the activity of lactate dehydrogenase (LDH) ergosterol biosynthesis and induced the decoupling of cytochrome *c* (Cyt *c*) from the mitochondrial membrane. Proteomic analysis revealed a reduction in the abundance of proteins related to energetic metabolism, DNA and RNA metabolism, pathogenicity, protein metabolism, cytoskeleton, and cell wall organization and division. Our findings indicated that *Mo*-CBP₃-PepII might have multiple mechanisms of action against *C. neoformans* cells, mitigating the development of resistance and thus being a potent molecule to be employed in the production of new drugs against *C. neoformans* infections.

Keywords: alternative drugs; cryptococcosis; oxidative stress; synthetic peptides

ANEXO E – ARTIGO CIENTÍFICO 3

Artigo científico publicado na revista *Antibiotics* (Fator de impacto: 4,6).

Disponível em: (<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020256>)



antibiotics



Article

Giving a Hand: Synthetic Peptides Boost the Antifungal Activity of Itraconazole against *Cryptococcus neoformans*

Tawanny K. B. Aguiar¹ , Ricardo M. Feitosa¹, Nilton A. S. Neto¹, Ellen A. Malveira¹, Francisco I. R. Gomes¹, Ana C. M. Costa¹, Cleverson D. T. Freitas¹ , Felipe P. Mesquita² and Pedro F. N. Souza^{1,2,*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60451-970, Brazil

² Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-275, Brazil

* Correspondence: pedrofilhobio@gmail.com or pedrofilhobio@ufc.br

Abstract: *Cryptococcus neoformans* is a multidrug-resistant pathogen responsible for infections in immunocompromised patients. Here, itraconazole (ITR), a commercial antifungal drug with low effectiveness against *C. neoformans*, was combined with different synthetic antimicrobial peptides (SAMPs), Mo-CBP3-PepII, RcAlb-PepII, RcAlb-PepIII, PepGAT, and PepKAA. The Mo-CBP3-PepII was designed based on the sequence of MoCBP3, purified from *Moringa oleifera* seeds. RcAlb-PepII and RcAlb-PepIII were designed using Rc-2S-Alb, purified from *Ricinus communis* seed cakes. The putative sequence of a chitinase from *Arabidopsis thaliana* was used to design PepGAT and PepKAA. All SAMPs have a positive liquid charge and a hydrophobic potential ranging from 41–65%. The mechanisms of action responsible for the combined effect were evaluated for the best combinations using fluorescence microscopy (FM). The synthetic peptides enhanced the activity of ITR by 10-fold against *C. neoformans*. Our results demonstrated that the combinations could induce pore formation in the membrane and the overaccumulation of ROS on *C. neoformans* cells. Our findings indicate that our peptides successfully potentialize the activity of ITR against *C. neoformans*. Therefore, synthetic peptides are potential molecules to assist antifungal agents in treating Cryptococcal infections.

Keywords: azole drugs; combined activity; membrane pore formation; synthetic antifungal peptides



Citation: Aguiar, T.K.B.; Feitosa, R.M.; Neto, N.A.S.; Malveira, E.A.; Gomes, F.I.R.; Costa, A.C.M.; Freitas, C.D.T.; Mesquita, F.P.; Souza, P.F.N. Giving a Hand: Synthetic Peptides