

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Efeito antifúngico e potencial mecanismo de ação do peptídeo PmUreβ em espécies de  
*Candida*

Tese de doutorado

**Ana Paula Perin**

Porto Alegre, fevereiro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Efeito antifúngico e potencial mecanismo de ação do peptídeo PmUreβ em espécies de  
*Candida*

**Ana Paula Perin**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ligabue-Braun

Colaboradora: Prof. Dra. Célia R. Carlini

Porto Alegre, fevereiro de 2023.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, coordenado pela Professora Lívia Kmetzsch, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este trabalho contou com fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil).

## AGRADECIMENTOS

Provavelmente eu já agradei a todos vocês ao longo do processo inúmeras vezes, no entanto é nesse arquivo que esse agradecimento será eternizado, e por isso é necessário fazê-lo.

Agradeço imensamente aos meus orientadores. Lívia Kmetzsch, por abrir as portas do seu laboratório e me receber tão bem. Agradeço por toda a sua orientação e ensinamentos durante esse período de formação. Ao Rodrigo Ligabue-Braun, te agradeço por todo o seu apoio durante o meu doutorado, seus conselhos foram sempre muito importantes para eu continuar. Obrigada pelos ensinamentos, confiança e dedicação. Sou grata por terem me concedido a oportunidade de aprender e crescer com vocês.

Te agradeço Célia Carlini pela orientação e ensinamentos, era sempre muito bom conversar contigo, você sempre tinha uma solução para um eventual problema na pesquisa.

Obrigada Charley Staats por ter colaborado diretamente com o meu trabalho, realizando análises de dados e com propostas de experimentos.

Obrigada Augusto Schrank e Marilene Vainstein pelas contribuições e ensinamentos.

Fê Lopes, não vou nem dizer o quanto você foi necessária durante o meu doutorado, você esteve comigo todo o tempo, me ajudando e incentivando. Sou imensamente grata por ter tido você na minha vida acadêmica e pessoal.

Aos colegas de laboratório, que acabam se tornando a família acadêmica, e como uma boa família, rimos, brincamos, brigamos juntos. Heryk e Julia, vocês foram essenciais para a minha adaptação, me apresentaram a vida no lab 222, até aprendi a me “engalfinhar” com vocês de forma amigável. Tê-los como colega de lab foi/é “vanderful”. Mayara, Mauren, Duda, Andrea, Gio e Henrique, dentro e fora do laboratório, agradeço a companhia de vocês, no RU, café pós-almoço e lanche da tarde no Chiques, obviamente, todas essas ações foram regadas a muita conversa e atualizações (vulgo fofoca). Jozi, Anne, Virgínia, obrigada pelas conversas de corredores tão importante para um momento de lazer. Agradeço aos demais colegas dos laboratórios 217, 219, 220 e 222, todos direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista.

Silvinha, obrigada por ser a melhor secretária que um PPG pode ter (eu não canso de repetir essa frase), se existe uma pessoa que tem eficiência no trabalho e facilita a vida dos pós-graduandos, essa pessoa é você, obrigada!

Aos membros da banca, obrigada por disponibilizarem o seu tempo e conhecimento para tornar esse trabalho melhor.

Agradeço ao meu ex-colega de lab que se tornou parceiro de vida, Matheus, o mais novo doutor do pedaço, obrigada por compartilhar comigo momentos bons e ruins e estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando. A vida na pesquisa e pós-graduação não é a mais fácil, mas conseguimos isso juntos. Te amo.

Ohana quer dizer família, família quer dizer nunca abandonar ou esquecer. Sim eu tenho uma Ohana, sou muito sortuda por ter vocês na minha vida, pessoas que sempre me apoiaram e incentivaram. Mãe, você é meu exemplo de pessoa, aquela que serve de guia para a construção de um ser humano de “prestança”. Obrigada por ser minha “mamain”. Mauricio, quando éramos crianças, foi você que me ensinou a andar de bicicleta, quem tirou as rodinhas de apoio para que eu, de fato, conseguisse andar sobre duas rodas. Sempre tive muita confiança em você, e isso não mudou, te agradeço por sempre estar comigo e me passar segurança. Aos meus tios e padrinhos, Elair e Osmar, sou afortunada por tê-los em minha vida, vocês são fontes de apoio e amor, sempre que precisamos pudemos contar com vocês de forma integral. Obrigada minha Ohana! Amo todos vocês.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES .....	5
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. INFECÇÕES FÚNGICAS .....	11
1.2. CANDIDAS E CANDIDÍASES .....	13
1.3. <i>Candida albicans</i> .....	16
1.4. RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS .....	18
1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	21
1.5.1. MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS .....	22
1.5.1.1. Inibidores da síntese de 1,3-β-Glicano .....	23
1.5.1.2. Inibidores da biossíntese de quitina da parede celular .....	24
1.5.1.3. Atividade seletiva da membrana.....	25
1.6. UREASES .....	26
1.6.1. UREASE de <i>Proteus mirabilis</i> (PMU) .....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. DISCUSSÃO.....	31
4. CONCLUSÃO.....	34
5. PERSPECTIVAS .....	35
6. REFERÊNCIAS .....	36
Anexo 1 – Manuscrito publicado junto ao periódico Process Biochemistry.....	49
CURRICULUM VITAE .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

- AFP – Peptídeo antifúngico, do inglês *Antifungal Peptide*
- AMP – Peptídeo antimicrobiano, do inglês *Antimicrobial Peptide*
- ATP - Adenosina trifosfato
- Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio
- CNTX - Canatoxina
- DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
- eSBU - Urease embrião-específica, do inglês *embryo-specific soybean urease*
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- FBS - Soro fetal bovino, do inglês *fetal bovine serum*
- GAFFI - *Global Action for Fungal Infection*
- GPI - Glicosilfosfatidilinositol
- GPL – Glicerofosfolídeos
- GTPase – Enzima que hidrolisa a guanosina trifosfato
- H<sup>+</sup> - Íon hidrogênio
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana, do inglês *human immunodeficiency virus*
- Jbtx – Jaburetox
- JBU - Urease do feijão-de-porco, do inglês *Jack bean urease*
- K<sup>+</sup> - Íon potássio
- kDa - Quilodalton (unidade de medida)
- LB - Luria Bertani
- MDR - Multirresistente, do inglês *multidrug-resistant*
- mRNA - RNA mensageiro, do inglês *messenger RNA*
- PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
- pH - Potencial hidrogeniônico
- PMU - Urease de *Proteus mirabilis*
- PmUreβ - Subunidade β da urease de *Proteus mirabilis*
- RNA - Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*
- RNA-Seq - Sequenciamento de RNA, do inglês *RNA sequencing*
- ROS - Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*
- SDS – Dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*
- SNC - Sistema nervoso central

TRIS-HCl - Tris (hidroximetil) aminometano HCl

uSBU - Urease ubíqua de soja

UTI - Unidade de terapia intensiva

WmKT - Toxina de *Williopsis mrakii*

$\mu\text{m}$  - Micrômetro (unidade de medida)

$\mu\text{M}$  - Micromolar (unidade de concentração)



## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Fatores de risco associados às infecções fúngicas invasivas..... 12

**Tabela 2.** Classes de antifúngicos atualmente disponíveis ..... 19

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de formação do biofilme de <i>C. albicans</i> . .....	17
<b>Figura 2.</b> Representantes dos quatro grupos de peptídeos antimicrobianos (AMPs) baseados na estrutura. ....	22
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática dos Peptídeos antifúngicos (AFPs - <i>Antifungal Peptides</i> ) e seus alvos. ....	24
<b>Figura 4.</b> Operon codificador da urease de <i>Proteus mirabilis</i> (PMU). ....	28
<b>Figura 5.</b> Estrutura trimérica da Urease de <i>Proteus mirabilis</i> (PMU). ....	29

## RESUMO

As infecções causadas pelo gênero *Candida* são consideradas emergentes, com aumento substancial de ocorrências e gravidade. Algumas espécies de *Candida* são comensais, porém quando há um desequilíbrio entre os microrganismos e seu hospedeiro, as infecções são favorecidas. Considerando o aumento da mortalidade por infecções fúngicas, assim como a taxa de resistência aos antifúngicos clássicos, o desenvolvimento de novas estratégias de controle se torna necessário. Nesse contexto, peptídeos com potenciais funções terapêuticas representam estratégias promissoras. A urease de *Proteus mirabilis* (PMU) consiste em um trímero de trímeros (ABC)<sub>3</sub>, denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Como visto para outras ureases, a PMU também induz efeitos independentes de sua ação enzimática, como ativação de plaquetas humanas, atividades antifúngicas e entomotóxicas. Além disso, análises com domínios isolados de PMU indicaram que a maior parte dessas atividades é desempenhada pelo domínio  $\beta$  (PmUre $\beta$ ). Considerando a potencial aplicabilidade biotecnológica de PmUre $\beta$  como peptídeo antimicrobiano, o presente trabalho aprofundou os estudos nos efeitos e no mecanismo de ação do peptídeo frente a distintas espécies de *Candida*. Para a expressão heteróloga, a região codificadora do peptídeo foi clonada e expressa em *Escherichia coli*. O peptídeo foi purificado por cromatografia de afinidade de níquel. Ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar os efeitos de PmUre $\beta$  na proliferação de leveduras, micromorfologia, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), integridade de membrana e parede celular, além de toxicidade em células humanas. A concentração inibitória mínima (CIM) de PmUre $\beta$  variou de 4,5 a 9  $\mu$ M. Além disso, há indícios que PmUre $\beta$  alterou a permeabilidade da membrana das leveduras. A produção de EROs pode estar envolvida na perturbação, tendo em vista que a produção de EROs foi elevada na presença do peptídeo, podendo causar peroxidação lipídica, resultando no aumento da permeabilidade. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelaram a presença de potenciais fibras da matriz extracelular envolvendo aglomerados de células e a possível presença de vesículas extracelulares. Além disso, as células de *Candida* tratadas com PmUre $\beta$  apresentaram superfícies celulares deformadas, sugerindo a parede celular como alvo. Numerosas cicatrizes de brotos não polares em células tratadas com o peptídeo foram observadas, o que sugere que o processo normal de divisão da levedura pode ter sido interrompido. Também é importante ressaltar que o peptídeo não

apresentou efeito nocivo em células de mamíferos. Esses resultados sugerem que PmUre $\beta$  pode ter potencial como peptídeo fungitóxico, destacando seu interesse biotecnológico.

## **ABSTRACT**

Infections caused by *Candida* genus are considered emerging, with a substantial increase in occurrences and severity. Some species of *Candida* are commensals, however when there is an imbalance between microorganisms and their host, infections are favored. Considering that mortality from fungal infections has been rising, and that the rate of resistance to classic antifungal drugs increased, the development of new control strategies is highly necessary. In this context, interest in peptides with therapeutic functions has enhanced. *Proteus mirabilis* urease (PMU) consists of a trimer of (ABC)<sub>3</sub> trimers, called  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . As seen for other ureases, PMU also induces effects independent of its enzymatic action, such as activation of human platelets, antifungal and entomotoxic activities. In addition, analyses with isolated domains of PMU indicated that most of these biological activities are performed by the  $\beta$  domain (PmUre $\beta$ ). Considering the potential biotechnological applicability of PmUre $\beta$  as an antimicrobial peptide, the present work has deepened the studies on effects and mechanism of action of the peptide on *Candida* spp. For recombinant peptide production, the gene coding region was cloned and expressed in *E. coli*. The peptide was purified using nickel affinity chromatography. *In vitro* assays were carried out to test PmUre $\beta$  effects on yeast proliferation, yeast micromorphology, the production of reactive oxygen species (ROS), the effect on the cell membrane and wall, and toxicity on human cells. The minimum inhibitory concentration (MIC) of PmUre $\beta$  ranged from 4.5 to 9  $\mu$ M. In addition, we demonstrated that PmUre $\beta$  can alter cell membrane permeability. ROS production may be involved in membrane perturbation, as ROS can cause lipid peroxidation, given that ROS production was increased in the presence of the peptide, which can alter the bilayer structure and increase its permeability. Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed the presence of potential extracellular matrix fibers encompassing cell clusters and the possible presence of extracellular vesicles. Also, *Candida* cells appeared to be damaged by PmUre $\beta$ , as evidenced by the deformed cell surfaces, suggesting cell wall as a target. Numerous non-polar bud scars on cells treated with the peptide were observed which suggest that the normal yeast division process may have been disrupted. Importantly, the peptide did not present a harmful effect

on mammalian cells. These results suggest that PmUreβ may have potential as a fungitoxic peptide, highlighting its biotechnological interest.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. INFECÇÕES FÚNGICAS

Nas últimas três décadas observou-se um aumento na incidência de micoses sistêmicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (SHIKANAI-YASUDA, 2015; VALLABHANENI et al., 2016a). Segundo o GAFFI (*Global Action for Fungal Infection*), mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem anualmente de infecções fúngicas, que têm um impacto substancial na saúde humana (GLOBAL ACTION FOR FUNGAL INFECTION, 2021). Além disso, mesmo com a disponibilidade de antifúngicos, acredita-se que as infecções fúngicas por leveduras e fungos filamentosos excedam um milhão de mortes anuais em todo o mundo, embora os relatórios sejam subestimados devido à disponibilidade inadequada de testes diagnósticos (BONGOMIN et al., 2017; BROWN et al., 2012). As doenças fúngicas causam uma epidemia invisível, que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos susceptíveis. Especialistas acreditam que a taxa global das infecções fúngicas está em uma crescente, isso se deve ao fato que cada vez mais pessoas são submetidas a terapias imunossupressoras, a taxa de pessoas idosas é crescente e mais indivíduos estão sendo submetidos a procedimentos invasivos (FISHER; DENNING, 2023). Além disso, a utilização de antifúngicos de forma indiscriminada e, muitas vezes errônea, contribui para o aumento de microrganismos resistentes (Tabela 1) (CHAPMAN et al., 2017; KULLBERG; ARENDRUP, 2018). Espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* são os principais agentes etiológicos das doenças fúngicas graves (JANBON et al., 2019). Além disso, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, e *Coccidioides* são fungos que podem causar infecção localizada, podendo também evoluir para infecção sistêmica (DAMASCENO-ESCOURA et al., 2020). As infecções fúngicas possuem características singulares que as diferenciam de outras, como a semelhança entre as células hospedeiras e as do patógeno fúngico; a capacidade do patógeno de infectar diferentes células hospedeiras, sendo apto a invadir diferentes tecidos simultaneamente; e a ocorrência de alterações morfológicas durante o período da infecção, impactando diretamente o tratamento, uma vez que

morfotipos podem responder distintamente aos compostos administrados (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020). Estas características tornam o desenvolvimento de fármacos antifúngicos um desafio, e o tratamento com taxas reduzidas de sucesso (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020). Apesar da taxa de mortalidade elevada associada às infecções fúngicas invasivas, o número real de mortes é provavelmente subestimado devido a dados epidemiológicos inadequados e diagnósticos incorretos (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020). Devido ao elevado número de casos, observa-se consequente aumento de prescrição de medicamentos antifúngicos. Este fato impacta diretamente na seleção de cepas resistentes aos fármacos e na eficácia dos fármacos antifúngicos utilizados (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; PRISTOV; GHANNOUM, 2019; REAZIN et al., 2019)

**Tabela 1.** Fatores de risco associados às infecções fúngicas invasivas

<b>Organismos</b>	<b>Fatores de risco</b>
<i>Candida</i>	Pancreatite necrosante aguda; cirurgia abdominal; fuga anastomótica; ou laparotomia de repetição; uso de antibiótico de amplo espectro; cateter venoso central; hemodiálise; imunossupressão, incluindo corticosteroides e quimioterapia; transplante de células tronco medular; ventilação mecânica (mais que 3 dias); neutropenia; infecção local por <i>Candida</i> ; longos períodos em unidade de terapia intensiva; hospitalização prolongada; transplante de órgãos (rim e fígado); alimentação totalmente parenteral.
<i>Aspergillus</i>	Transplante de células tronco medular alogênica; complicações anastomóticas no transplante pulmonar; infecção local por <i>Aspergillus</i> ; citomegalovírus; uso de corticoesteroides; uso de infliximabe; neutropenia; idade avançada; longos períodos em unidade de terapia intensiva; alemtuzumabe (tratamento de leucemia); falha renal (com necessidade de diálises); doença do enxerto contra o hospedeiro; agentes depletors de células T; retransplante.
<i>Mucorales</i>	Citomegalovírus; uso de corticoesteroides; diabetes <i>mellitus</i> ; uso de equinocandinas; excesso de ferro; desnutrição; mielodisplasia;

---

neutropenia; idade avançada; falha renal; doença do enxerto contra o hospedeiro; uso de voriconazol.

---

Adaptado de (SULEYMAN; ALANGADEN, 2021)

Com o surgimento da pandemia de COVID-19, a incidência das infecções fúngicas foi intensificada e muitas espécies de *Candida* não-*albicans* foram descritas como emergentes (OMRANI et al., 2021). Com o aumento exponencial das hospitalizações para o tratamento dos sintomas respiratórios causados pelo vírus SARS-CoV-2, verificou-se um aumento na utilização de cateteres, procedimentos cirúrgicos e ventilação mecânica, os quais já são descritos como meios de entrada para infecções por *Candida* spp. e/ou outros fungos e bactérias (YAMIN; HUSIN; HARUN, 2021). Durante o período mais crítico da pandemia, não houve tratamento medicamentoso eficaz para combater a COVID-19; sendo que alguns fármacos, como os antibióticos e antifúngicos, foram utilizados indiscriminadamente (PAUMGARTTEN; OLIVEIRA, 2020). Em consequência, considerando longos períodos de hospitalização, a probabilidade de contrair uma infecção fúngica de uma espécie multirresistente, aumentou consideravelmente (GARCIA-VIDAL et al., 2021). Durante esse período, houve um aumento dos relatos de casos de *Candida auris* nas unidades de terapia de indivíduos acometidos pela COVID-19. Os pesquisadores supõem que estes surtos podem estar relacionados às alterações nas práticas de rotina de controle de infecções devido à crise sanitária (JANNIGER; KAPILA, 2021). O uso irracional dos medicamentos antimicrobianos durante a pandemia de COVID-19 pode contribuir de forma significativa para a disseminação de microrganismos multirresistentes, o que tornará o tratamento das infecções fúngicas e/ou bacterianas mais desafiador (BROTHERS et al., 2021; GARCIA-VIDAL et al., 2021; PAUMGARTTEN; OLIVEIRA, 2020; POSTERARO et al., 2020)

## 1.2. CANDIDAS E CANDIDÍASES

O gênero *Candida* compreende leveduras polimórficas diploides, células ovoides de paredes finas, com reprodução por brotamento. Preparações frescas geralmente apresentam leveduras brotando, hifas e pseudo-hifas. Esses organismos se desenvolvem adequadamente na maioria dos meios artificiais e geralmente não requerem condições

especiais para cultivo. Em meios artificiais, células de *Candida* são identificáveis como colônias brancas, lisas e cremosas. Geralmente são comensais em humanos, no entanto, quando há um desequilíbrio entre os microrganismos e seu hospedeiro, as infecções são favorecidas (SUDBERY, 2011). Os principais sítios de colonização são a cavidade oral, o trato gastrointestinal, o trato genital (principalmente) feminino ou a pele. Estima-se que 24-70% dos indivíduos saudáveis, acima de um ano de idade, são colonizados por *Candida* (ABU-ELTEEN; HAMAD, 2012). *Candida* é um gênero de fungos que possui dezenas de espécies, no entanto uma pequena fração é capaz de causar micoses em humanos (PFALLER et al., 2004, 2019). As espécies de *Candida* são o segundo agente etiológico mais prevalente de infecções fúngicas, e *Candida albicans* é o patógeno oportunista mais frequente isolado de pacientes que sofrem de formas graves de infecções fúngicas no mundo (BROWN et al., 2012).

Um estudo realizado nos Estados Unidos analisou dados de 203 hospitais em relação às candidíases invasivas entre os anos de 2009 e 2017. Os resultados demonstraram que *C. albicans* (48%), *C. glabrata* (24%), *C. parapsilosis* (11%), e *C. tropicalis* (7%) são os agentes patogênicos do gênero *Candida* mais frequentes (PFALLER et al., 2012; RICOTTA et al., 2021). Em geral, houve um aumento na proporção de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, com destaque à *C. glabrata* (AZIE et al., 2012; DANESHNIA et al., 2023; LAMOTH et al., 2018; PFALLER et al., 2012). Em contraste, um estudo que avaliou a incidência de candidíases em nível global reportou que, na América Latina, a maior incidência de *Candida* não-*albicans* está relacionada às espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER et al., 2010). O mesmo estudo destaca que as espécies de *Candida* com maior probabilidade de resistência ao antifúngico fluconazol são *C. krusei* (78%), *C. glabrata* (16%) e *C. guilliermondii* (11%) (PFALLER et al., 2010). A incidência de *C. parapsilosis* é mais comum na população de neonatos e pacientes transplantados (PFALLER et al., 2012; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008). Dentro do ambiente hospitalar, *C. parapsilosis* é geralmente isolada das mãos dos profissionais de saúde; uma revisão de estudos epidemiológicos moleculares sugeriu que os neonatos são infectados a partir de transmissão horizontal que parte dos profissionais de saúde (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008). Dentre as leveduras patogênicas emergentes, *C. auris* surgiu como um fungo patogênico multirresistente associado a ambientes hospitalares, frequentemente em unidades de terapia intensiva (UTIs), causando infecções em pacientes



em diversos países (JEFFERY-SMITH et al., 2018; SCHELENZ et al., 2016). Esta levedura foi descrita pela primeira vez em 2009 a partir de um único isolado recuperado do canal auditivo de um paciente no Japão (SATO et al., 2009). Desde então, tem sido identificada em todo o mundo como um agente patogênico que causa principalmente infecções na corrente sanguínea, mas também em feridas, trato urinário, e outras infecções (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017). Uma análise recente de várias coleções de culturas internacionais confirmou que o aparecimento da *C. auris* é recente, com apenas uma dupla de isolados identificados antes de 2011 (SPALLONE; SCHWARTZ, 2021). O diagnóstico incorreto de *C. auris* contribui para a baixa notificação de casos e dificuldade no tratamento; muitos casos clínicos *C. auris* foram atribuídos incorretamente à *C. haemulonii* quando eram utilizados os métodos clássicos de diagnóstico (TSAY et al., 2018; VALLABHANENI et al., 2016b).

Dentre as infecções causadas pelo gênero *Candida*, as candidíases vaginais estão entre as mais frequentes nos humanos. Um terço de todos os casos de vulvovaginite em mulheres em idade reprodutiva é causada por *Candida* (AHANGARI et al., 2019; SWIDSINSKI et al., 2019). Aproximadamente 78% das mulheres declaram ter tido candidíase vaginal em algum momento das suas vidas (WILLEMS et al., 2020; YANO et al., 2019), sendo que 8% das mulheres declararam sofrer de candidíase vaginal recorrente (COOKE et al., 2022; DENNING et al., 2018). O patógeno mais comum é *C. albicans* (em cerca de 90% dos casos), seguido por *C. glabrata* (FARHAN et al., 2019).

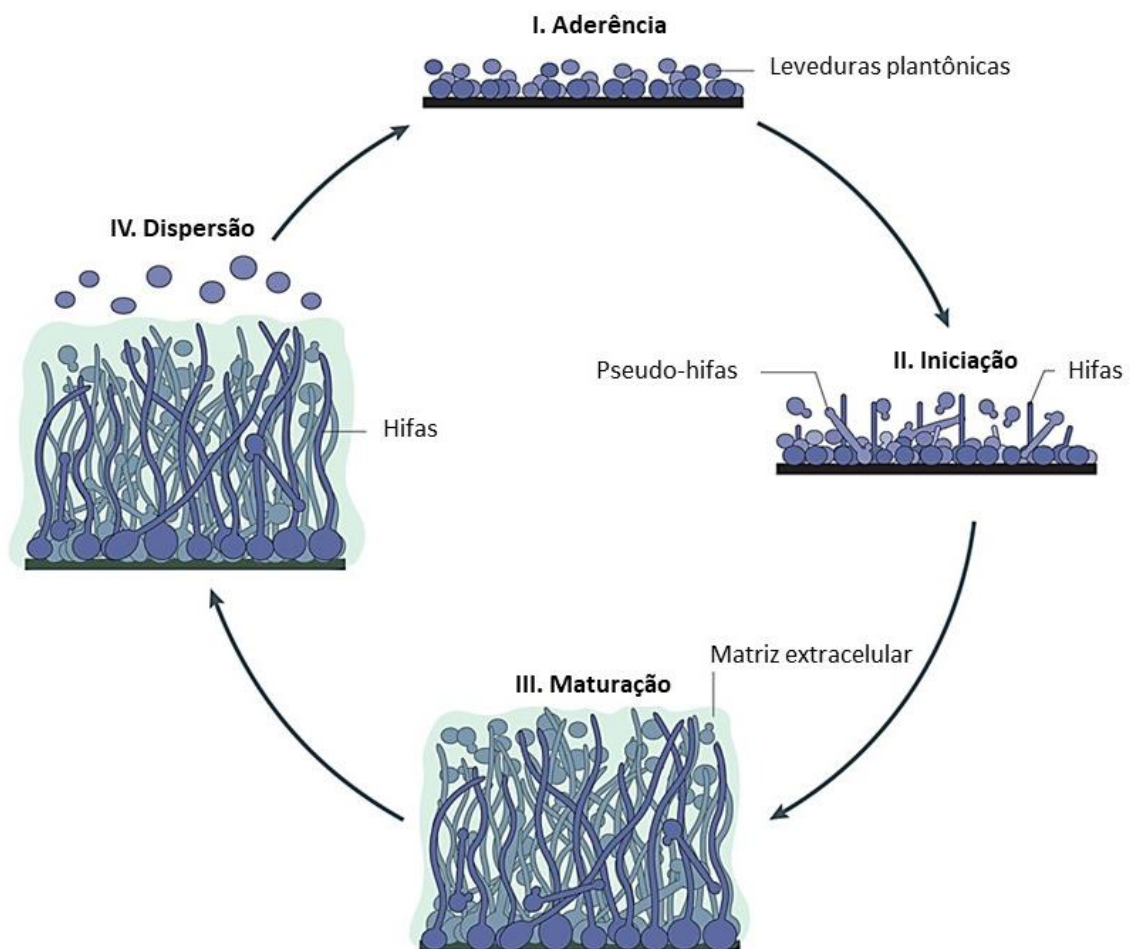
Alguns fatores de virulência, como a capacidade de contornar as defesas do hospedeiro, a adesão e a formação de biofilme e a produção de enzimas hidrolíticas prejudiciais aos tecidos, como hemolisinas, fosfolipases e proteases, são conhecidos por tornar certas espécies de *Candida* organismos patogênicos para os seres humanos (SILVA et al., 2012). Um dos maiores desafios no combate das infecções por *Candida* é a formação de biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres, válvulas cardíacas e próteses dentárias (EGUIA et al., 2020; NOBILE; JOHNSON, 2015; SEDDIKI et al., 2015). Quando as células fúngicas se desprendem dos biofilmes, infecções sistêmicas generalizadas podem ocorrer (RAMAGE et al., 2009). Além disso, estruturas de biofilme são consideradas mais resistentes aos fármacos, dificultando o tratamento (RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

### 1.3. *Candida albicans*

A levedura *C. albicans* é a principal causa de candidíase na maioria das situações clínicas (ARMSTRONG-JAMES et al., 2017). É o terceiro microrganismo mais frequentemente isolado das infecções da corrente sanguínea em doentes hospitalizados (SHIELDS et al., 2019). É um patógeno oportunista que reside na microbiota oral, gastrointestinal e urogenital dos humanos (NAMI et al., 2019). *C. albicans* é um organismo polimórfico que sofre uma transição morfológica entre formas de levedura (blastoconídio), pseudo-hifa e hifa, dependendo do ambiente (ALEXANDER et al., 2013; WISPLINGHOFF et al., 2004).

Uma combinação de fatores de virulência e atributos de aptidão contribuem para a patogenicidade da *C. albicans*. Essa levedura desenvolveu um extenso repertório de mecanismos de virulência que permite a colonização e infecção bem-sucedida do hospedeiro (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Por exemplo, as mudanças de morfogênese da forma leveduriforme para hifa variam conforme o contexto que o fungo se encontra, em termos de desenvolvimento rápido, maior necessidade de nutrientes, disseminação e invasão (GOW; BROWN; ODDS, 2002; SUNDSTRÖM; VASAN, 2006). Dentro desse contexto, se observou que a secreção de aspartil proteinases e fosfolipases é aumentada no período de invasão e de maior fornecimento de nutrientes (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Já para a fixação das leveduras aos tecidos do hospedeiro, uma maior produção de adesinas é necessária (HOYER et al., 2008). Um dos principais atributos de virulência de *C. albicans* é a sua capacidade de formar biofilmes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). A formação de biofilme é um dos gargalos do controle das infecções causadas por *Candida* (e outros organismos formadores) pois essas estruturas são intrinsecamente resistentes à terapêutica antifúngica convencional, ao sistema imunológico do hospedeiro, e a outros fatores ambientais de combate (DAVEY; O'TOOLE, 2000; NOBILE; JOHNSON, 2015). A formação do biofilme possui quatro fases distintas: (I) aderência; (II) iniciação; (III) maturação; e (IV) dispersão (Figura 1). O desenvolvimento se inicia com a aderência das células em uma estrutura sólida (podendo ser os tecidos do hospedeiro ou estruturas como cateteres e sondas). Em seguida se inicia a fase de proliferação celular e a formação de filamentos iniciais. No próximo passo, as estruturas já estabelecidas passam a formar o biofilme maduro (o qual se estabelece dentro de 24 horas), que é composto por

uma rede complexa de várias camadas de células polimórficas, incluindo hifas (cadeias de células cilíndricas), pseudo-hifas (células elipsoidais unidas ponta a ponta), e células leveduriformes, envoltas numa matriz extracelular, dando ao biofilme um aspecto espesso e estruturado, bem como fornecendo proteção contra lesões químicas e físicas. Por fim, ocorre a fase de dispersão, onde algumas células de levedura se dispersam do biofilme para colonizar novos locais (Figura 1) (GULATI; NOBILE, 2016; NETT; ANDES, 2006).



**Figura 1. Ciclo de formação do biofilme de *C. albicans*.** I. Aderência das leveduras plantônicas a uma superfície. II. Início da formação do biofilme, onde as células proliferam para formar uma camada basal de células aderidas. III. Maturação do biofilme, momento em que camadas complexas de células polimórficas se desenvolvem e ficam envoltas por uma matriz extracelular. VI. Dispersão, período que as leveduras deixam o biofilme maduro para colonizar novos locais. Adaptado de (LOHSE et al., 2018).

A fase de dispersão do biofilme é de grande relevância clínica, uma vez que as células recém libertadas do biofilme maduro são capazes não só de iniciar novos ciclos de formação do biofilme, mas também de acessar a corrente sanguínea para estabelecer um foco de infecção. Esta é a razão pela qual a formação do biofilme está intimamente associada à candidemia e à candidíase invasiva clinicamente disseminada (TOURNU; VAN DIJCK, 2012).

Já é bem estabelecido que *C. albicans* causa infecção com elevada mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, aumentando a necessidade de desenvolver medicamentos antifúngicos de amplo espectro. No entanto, o uso prolongado de antifúngicos pelos pacientes resulta na seleção de leveduras resistentes (DAWSON; INTAPA; JABRA-RIZK, 2011). A resistência antifúngica baseia-se em diferentes mecanismos, sendo os principais: (I) redução de acúmulo de fármaco intracelular; (II) diminuição da afinidade do alvo do fármaco e (III) redução do efeito do fármaco. Os mecanismos de resistência serão diferentes dependendo do mecanismo de ação dos compostos antifúngicos.

Ao contrário da grande diversidade de antibióticos, com numerosas classes conhecidas e vários modos de ação contra diferentes alvos bacterianos, os antifúngicos atuais são extremamente limitados (GULATI; NOBILE, 2016). Apenas quatro classes principais de antifúngicos são utilizados para tratar a maioria das infecções fúngicas, sendo eles, os azóis, polienos, equinocandinas e análogos de nucleosídeos (GULATI; NOBILE, 2016; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; WALSH, 2002; WILLIAMS; LEWIS, 2011). No entanto, quando há a formação de biofilme a resistência aos antifúngicos clássicos é multifatorial e mecanicamente complexa, limitando ainda mais o arsenal terapêutico (GULATI; NOBILE, 2016).

#### 1.4. RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS

Ao longo das últimas décadas tem se observado um fenômeno preocupante, em que os principais antimicrobianos de escolha estão se tornando ineficazes no combate às doenças infecciosas (MURRAY et al., 2022; PACE et al., 2023; VITIELLO et al., 2023). Frente a essa problemática, existe uma grande necessidade do desenvolvimento de novas terapias de combate aos microrganismos patogênicos. Além disso, há a necessidade de

prever e prevenir a evolução da resistência considerando o arsenal atual de antimicrobianos. A resistência antimicrobiana é particularmente preocupante no contexto dos agentes patogênicos fúngicos, dada a escassez de classes distintas de antifúngicos para o tratamento de infecções invasivas e o aparecimento e propagação de agentes patogênicos fúngicos multirresistentes (Tabela 2) (PEREIRA et al., 2021).

Em 2019, aproximadamente 7 milhões de pessoas morreram de doenças infecciosas, representando quase 12% de todas as mortes em nível mundial (WANG et al., 2020). Além disso, estima-se que 700 mil mortes ocorrem globalmente devido aos organismos resistentes a medicamentos. No entanto, estimativas apontam que esse número pode aumentar para 10 milhões, com perdas econômicas de 100 trilhões de dólares até 2050, sendo que o maior impacto acontecerá nos países menos desenvolvidos, caso não sejam tomadas medidas preventivas de controle (O'NEILL, 2016).

**Tabela 2.** Classes de antifúngicos atualmente disponíveis e mecanismo de resistência

<b>Antifúngicos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Mecanismos de resistência de <i>C. albicans</i></b>	<b>Referência</b>
<b>Azóis</b>			
Fluconazol, Clotrimazol, Miconazol, Cetoconazol, Itraconazol	Inibição da enzima esteroil 14 $\alpha$ -desmetilase (ERG11; biossíntese de ergosterol)	Regula a expressão do gene ERG	(NAILIS et al., 2010; GULATI; NOBILE, 2016; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013)
<b>Polienos</b>			
Nistatina, Anfotericina B	Se liga ao ergosterol; Forma poros transmembrana, resultando na perda da integridade da membrana e interrupção do gradiente de íons.	Reposição dos esteróis da membrana celular	(GHANNOUM; RICE, 1999; GULATI; NOBILE, 2016; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013)
<b>Equinocandinas</b>			
Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina	Inibe a $\beta$ -1,3-glicano sintase	Regula a expressão dos genes da biossíntese de glicanos; Mutação da enzima que catalisa os	(GULATI; NOBILE, 2016; WALSH, 2002; WILLIAMS;

	análogos de pirimidina, como o <i>FurI</i>	LEWIS, 2011)
--	---	--------------

### Análogos de nucleosídeos

Flucitosina	Inibição da síntese de RNA e DNA da célula fúngica	Aumenta a síntese de nucleotídeos de pirimidina que inibem competitivamente os análogos.	(GULATI; NOBILE, 2016; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013)
-------------	---	--	---

Adaptado de (PEREIRA et al., 2021)

A resistência antimicrobiana é uma crise global de saúde pública que ameaça a capacidade de tratar com sucesso as infecções microbianas (MURRAY et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021) e o uso excessivo de antimicrobianos é um fator importante que contribui para a resistência. Outro ponto importante é a propagação dos microrganismos resistentes e dos seus genes de resistência em nível local e global (HOLMES et al., 2016). As formas de propagação incluem um controle deficiente da infecção, contaminação ambiental, e movimentos geográficos de seres humanos e de outros animais infectados (BUROW; KÄSBOHRER, 2017; MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). A resistência aos agentes antimicrobianos acarreta em aumento do tempo de internação, do custo de hospitalização por paciente, e a taxa de morbimortalidade por patógenos emergentes (TYERS; WRIGHT, 2019).

As espécies emergentes mais notáveis em nível mundial, consideradas como de maior preocupação para a saúde pública, são: *Aspergillus fumigatus* (resistente a triazóis) (ROMERO et al., 2019; YANG et al., 2021), *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* (PFALLER et al., 2019), *C. auris* (*multidrug-resistant* (MDR)) (CHAABANE et al., 2019; CHOWDHARY et al., 2020) e *C. glabrata* (MDR) (DE ZOYSA; GLOSSOP; SAROJINI, 2018; HEALEY; PERLIN, 2018).

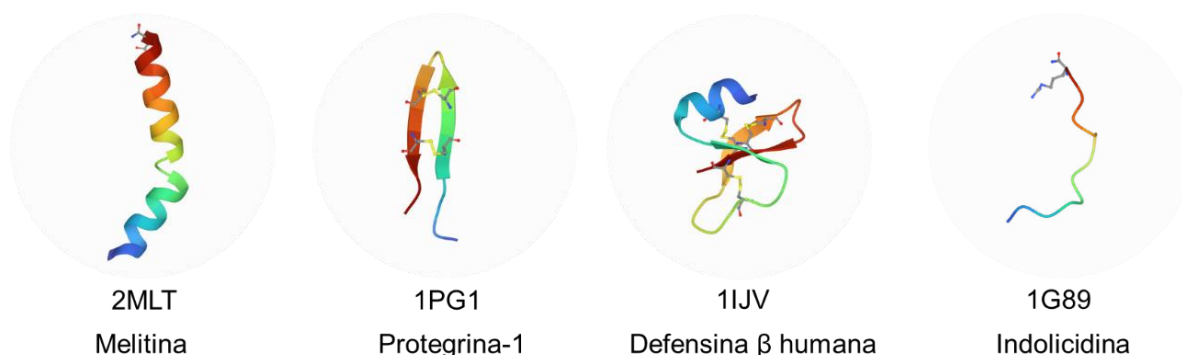
A resistência adquirida a equinocandinas foi descrita ao longo da última década, e mostrou-se particularmente evidente em *C. glabrata*, que acomete pacientes de tratamentos longos (3-4 semanas). No entanto, há relatos de mutantes resistentes, mesmo em terapias de curto prazo, e em pacientes nunca tratados com equinocandinas. Contudo, esses pacientes estavam em ambientes de alta incidência, sugerindo uma possível transmissão entre pacientes hospitalizados (VALLABHANENI et al., 2015).

## 1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Devido ao rápido aumento da resistência aos antibióticos e antifúngicos nas últimas décadas, os antimicrobianos de última linha começaram a falhar, o que representa uma ameaça à saúde pública global (BEN-AMI; KONTOYIANNIS, 2021; ZAMAN et al., 2017). Tendo em vista esse cenário, a investigação de possíveis agentes antimicrobianos não convencionais se intensificou. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs – *Antimicrobial Peptides*) são pequenas moléculas produzidas por uma variedade de organismos, incluindo plantas, animais e bactérias, que têm a capacidade de eliminar ou inibir o desenvolvimento de outros microrganismos. Os AMPs são considerados potenciais candidatos a fármacos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos, que atualmente são resistentes aos fármacos convencionais (MAHLAPUU et al., 2016; UPTON; COTTER; TAGG, 2012). O primeiro AMP, gramicidina, foi descrita em 1939 a partir da bactéria *Bacillus brevis* isolada do solo. Esse peptídeo mostrou atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra muitas bactérias Gram-positivas (DUBOS, 1939a, 1939b). A maioria dos AMPs são oligopeptídeos de 5 a 100 aminoácidos com uma carga líquida positiva (normalmente +2 a +11) e uma proporção significativa (normalmente 50%) de resíduos hidrofóbicos, sendo considerados anfipáticos (CHEN; LU, 2020; PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).

Considerando que a superfície das membranas bacterianas é frequentemente carregada negativamente (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010), os AMPs com carga positiva ligam-se inicialmente à superfície da membrana através de interações eletrostáticas. Uma vez ligadas, as extremidades hidrofóbicas inserem-se na bicamada lipídica causando a desorganização da membrana através da indução de poros que, eventualmente, acarreta a morte celular (BECHINGER, 2005; POUNY et al., 1992; WU et al., 1999). Os peptídeos mais positivos (carga líquida de +30) descritos até o momento são o Oncorhyncin II (FERNANDES, 2004) e o Oabac11 (ANDERSON; YU, 2003), e o de maior carga negativa (carga líquida -12) é a Crombacina de gado (TAYLOR et al., 2008). Os AMP aniônicos possivelmente formam oligômeros na presença de ions  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , permitindo-lhes inserir as suas caudas lipídicas nas membranas (PAULMANN et al., 2012; STEFFEN et al., 2006).

A classificação baseada em estruturas divide os AMP em quatro grupos distintos com base nos tipos de estruturas secundárias presentes, conforme apresentado a seguir: (I)  $\alpha$ -hélice, (II) Folha- $\beta$ , (III)  $\alpha\beta$ , e (IV) intrinsecamente desordenados (não apresenta estruturação  $\alpha$  ou  $\beta$ ) (Figura 2) (WANG, 2015). Peptídeos da família  $\alpha$  contêm  $\alpha$ -hélices como principal componente da sua estrutura secundária. Em contraste, os AMP da família  $\beta$  caracterizam-se por apresentar pelo menos um par de fitas  $\beta$  na estrutura. A família  $\alpha\beta$  contém tanto estruturas  $\alpha$  como  $\beta$ , enquanto a família dos intrinsecamente desordenados não possuem  $\alpha$  ou  $\beta$  na estrutura. A razão entre os aminoácidos lisina/arginina (K/R) são diferentes entre as famílias estruturais. Enquanto as lisinas são dominantes na família  $\alpha$ -hélice, as argininas são preferidas na família  $\beta$ , bem como na família dos intrinsecamente desordenados. Além disso, os AMPs com estruturas  $\alpha\beta$  têm uma razão de K/R moderada de  $\sim 1,2$ . Essas proporções podem se tornar úteis como indicadores para a classificação de um peptídeo recentemente descoberto numa determinada família estrutural (WANG, 2015).



**Figura 2. Representantes dos quatro grupos de peptídeos antimicrobianos (AMPs) baseados na estrutura.** Melitina (PDB: 2MLT) representa os AMPs compostos por  $\alpha$ -hélice; Protegrina (PDB: 1PG1) representa os AMPs compostos por folha- $\beta$ ; Beta-defensina humana (PDB: 1IJV) representa os AMPs compostos por  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ ; Indolicidina (PDB: 1G89) é representante dos AMPs que não apresentam estrutura secundária definida, chamados de intrinsecamente desordenados.

### 1.5.1. MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS

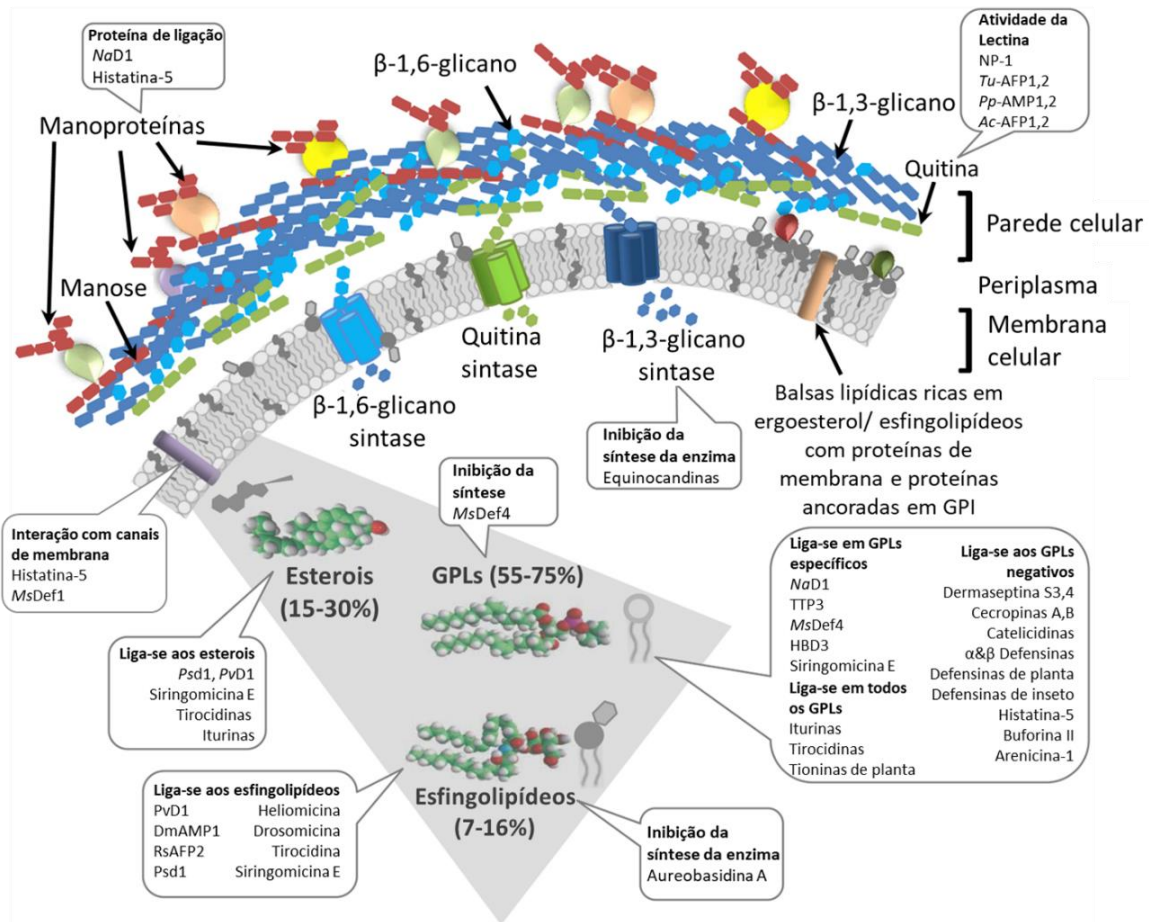
Os Peptídeos Antifúngicos (AFPs - *Antifungal Peptides*) são um sub-grupo dos AMPs, apresentam atividade contra fungos e leveduras. As propriedades antifúngicas dos peptídeos dependem de alguns fatores, tais como a sequência, a carga do peptídeo, e natureza hidrofílica ou hidrofóbica (WANG, 2015). O mecanismo exato de ação dos AFPs



não está totalmente esclarecido, mas a maioria dos peptídeos atua sobre as membranas celulares das células fúngicas (Figura 3) (RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016). Os AFPs interagem inicialmente com a membrana celular devido às interações eletrostáticas (MENZEL et al., 2017). Alguns peptídeos formam oligômeros, acarretando perturbação da membrana por meio da formação de poros que resultam na liberação do conteúdo citoplasmático, culminando na morte celular. Esse tipo de ação é dependente da concentração do peptídeo e do tempo de interação do mesmo com o alvo (GONÇALVES et al., 2017).

#### 1.5.1.1. Inibidores da síntese de 1,3- $\beta$ -Glicano

A enzima  $\beta$ -glicano sintase está envolvida na integridade da parede celular. Lipoproteínas cíclicas podem inibi-la de forma não competitiva, resultando em desestabilização da parede celular, levando a uma susceptibilidade a tensões osmóticas e lise celular. O 1,3- $\beta$ -glicano está envolvido na composição do septo de divisão celular e na formação da parede celular. Em consequência da necessidade desse componente, peptídeos que interfiram nessa via, afetarão essas estruturas. A enzima  $\beta$ -glicano sintase está presente nos fungos dos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, e *Pneumocystis*. No entanto, em fungos filamentosos, encontra-se nas pontas das hifas em crescimento, tornando-os menos sensíveis. A inibição da enzima  $\beta$ -glicano sintase resulta em uma parada do ciclo celular, afetando o crescimento das leveduras. Equinocandinas, pneumocandinas, aculeacinas, mulundocandinas e WmKT (toxina de *Williopsis mrakii*) são representantes dessa classe de inibidores (GUYARD et al., 2002; MATEJUK et al., 2010; VAN DER WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013).



**Figura 3. Representação esquemática dos Peptídeos antifúngicos (AFPs - *Antifungal Peptides*) e seus alvos.** A imagem acima lista os AFPs que possuem como alvo os componentes da parede e membrana celular dos fungos/leveduras. Adaptado de RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016.

#### 1.5.1.2. Inibidores da biossíntese de quitina da parede celular

A quitina é um componente essencial para a manutenção da integridade da parede celular de fungos e leveduras, e desempenha um papel muito importante na formação do septo e do brotamento das células-filhas (MOLANO; BOWERS; CABIB, 1980; SCHMIDT et al., 2003), sendo um componente ausente nos vertebrados. O peptídeo Aureobasidina possui um mecanismo de ação duplo, que perturba tanto a parede celular quanto a membrana, tem efeito negativo sob a actina e quitina, e também interrompe a síntese de esfingolípídeos (ENDO et al., 1997; NAGIEC et al., 1997). Alguns AFPs com atividade sobre a quitina possuem efeitos intracelulares indiretos afetando a actina das células. Como resultado, a desorganização da quitina não só resulta em inadequada formação morfológica (CABIB; ARROYO, 2013), como também na perda de integridade

da membrana celular (ENDO et al., 1997). Os peptídeos que agem sobre a quitina têm demonstrado bom efeito inibitório em leveduras, e com ausência de toxicidade para as células mamíferas (CABIB; ARROYO, 2013).

#### 1.5.1.3. Atividade seletiva da membrana

O alvo de seletividade dos AFPs que agem nas membranas plasmáticas depende basicamente da composição dos lipídeos da membrana, assim como a sua carga (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). A composição dos lipídeos varia entre as espécies de leveduras e fungos (EJSING et al., 2009; SINGH; PRASAD, 2011), assim como há diferenças entre as membranas das leveduras/fungos e das células mamíferas (DODGE; PHILLIPS, 1967; LEIDL et al., 2008). A composição da membrana das leveduras é prevalentemente composta por lipídeos carregados negativamente; já nas células mamíferas existe uma prevalência de lipídeos neutros (DODGE; PHILLIPS, 1967; EJSING et al., 2009; LEIDL et al., 2008; SINGH; PRASAD, 2011). É essa diferença eletrostática entre as membranas de fungos patogênicos e células mamíferas que é explorada pelos AFPs catiônicos. Um exemplo de peptídeo que age sobre a membrana plasmática é o Rs-ARF2, o qual possui como alvo a glicosilceramida, causando permeabilidade de membrana e consequente entrada excessiva de íons  $Ca^{2+}$  e saída de íons  $K^+$ . Esse peptídeo também induz a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular. O peptídeo Rs-ARF2 e seus análogos demonstraram efeito sobre *A. flavus*, *Fusarium solani*, *C. albicans* e *C. krusei*. Por outro lado, *C. glabrata*, que não possui essa glicosil ceramida, não foi afetada pelo peptídeo. Outro ponto positivo desse peptídeo é a ausência de efeito citotóxico em células mamíferas (MATEJUK et al., 2010; SHER KHAN et al., 2019). O peptídeo de origem animal Histatina 5 é composto por uma estrutura de  $\alpha$ -hélice (OPPENHEIM et al., 1988). Diferentemente de outros peptídeos anfipáticos que perturbam a membrana por meio de formação de poros, a Histatina 5 possui um mecanismo distinto (HERTOG et al. 2004). Sua atividade requer ligação às proteínas da parede celular de *Candida*, seguido de translocação para os compartimentos intracelulares (LI et al., 2006). Esse peptídeo se liga na Ssa2p, proteína de parede celular, que é necessária para a internalização na célula (LI et al., 2006). Além disso, os transportadores de poliaminas Dur3 e Dur35 também são necessários para essa internalização. Dentro da célula, a Histatina 5 compromete a membrana celular mitocondrial, gerando uma indução global de

estresse osmótico, liberando íons intracelulares e pequenos nucleotídeos, incluindo ATP (adenosina trifosfato) (KUMAR et al., 2011).

## 1.6. UREASES

Ureases (ureia amido-hidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel, que catalisam a reação de hidrólise da ureia resultando em amônia e dióxido de carbono (KRAJEWSKA, 2004; MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Apresentam ampla distribuição em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais. Em bactérias, as ureases participam do metabolismo do nitrogênio, podendo ser constitutivas ou induzidas. A atividade ureolítica tem um papel importante na patogênese de doenças de animais e humanos (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). Em plantas, as ureases são amplamente distribuídas em sementes de leguminosas, e estudos sugerem que essas proteínas estão envolvidas no processo de germinação e de defesa química das sementes (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010; KUMAR; KAYASTHA, 2010). Em plantas e fungos, as ureases são homopolímeros de subunidades contendo cerca de 840 resíduos de aminoácidos, formando hexâmeros ou trímeros (FOLLMER, 2008; SIRKO; BRODZIK, 2000). As ureases bacterianas possuem 2 ou 3 domínios menores, que se alinham na cadeia polipeptídica única das ureases vegetais, com as quais têm 50-60% de identidade de sequência. A maior parte das ureases bacterianas caracterizadas é constituída de um trímero de trímeros (ABC)<sub>3</sub>, como é o caso das enzimas das bactérias patogênicas *Proteus mirabilis* e *Klebsiella aerogenes*. Somente no gênero *Helicobacter* foram descritas ureases com dois domínios, organizados como um hexâmero de dímeros (AB)<sub>6</sub>.

As ureases são caracterizadas como proteínas *moonlighting*, pois apresentam propriedades independentes da sua atividade enzimática (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; LIGABUE-BRAUN; CARLINI, 2017). As ureases são abundantes na semente de *Canavalia ensiformis* (*jack bean*, feijão-de-porco), entre as quais estão a *jack bean* urease (JBU) e a canatoxina (CNTX), isolada em 1981 como uma proteína neurotóxica e depois identificada como uma isoforma da JBU (FOLLMER, 2008). A CNTX é letal para ratos e camundongos, causando convulsões tônicas e morte dos animais (CARLINI et al., 1984; CARLINI; GUIMARÃES, 1981; FOLLMER, 2008). *In vitro*, a CNTX induz agregação plaquetária e exocitose em plaquetas, mastócitos, neutrófilos, macrófagos e sinaptossomas,

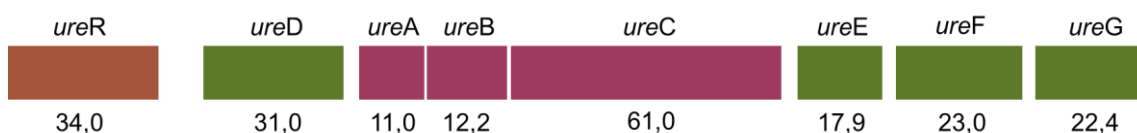
e interfere no transporte de cálcio nas células (BARJA-FIDALGO; GUIMARAES; CARLINI, 1991; CARLINI; GUIMARÃES; RIBEIRO, 1985; RIBEIRO-DASILVA; PRADO, 1993). Muitas das atividades biológicas das ureases de planta são compartilhadas com ureases bacterianas, como por exemplo seus efeitos pró-inflamatórios (UBERTI et al., 2013), indução de agregação plaquetária (OLIVERA-SEVERO; WASSERMANN; CARLINI, 2006; WASSERMANN et al., 2010), assim como atividade entomotóxica e antifúngica (LIGABUE-BRAUN; CARLINI, 2017).

Quando testadas em fungos selecionados, tanto a CNTX como a JBU inibiram a germinação de esporos e o crescimento de hifas de vários fungos filamentosos, incluindo fungos fitopatogênicos (BECKER-RITT et al., 2007; POSTAL et al., 2012). A atividade antifúngica da JBU para leveduras foi também demonstrada, causando inibição da proliferação celular, mudanças no transporte de H<sup>+</sup> e no metabolismo de carboidratos, bem como permeabilização de membranas e deformações na morfologia das leveduras (POSTAL et al., 2012). Da mesma forma que a JBU, a uSBU (urease ubíqua de soja) e a eSBU (urease embrião-específica de soja) também foram testadas contra diferentes espécies de fungos e leveduras promovendo inibição na proliferação celular (MARTINELLI et al., 2017). Além dos efeitos demonstrados pelas ureases, os peptídeos derivados dessas proteínas também foram avaliados. Jaburetox é um peptídeo recombinante (~11 kDa) derivado de uma das isoformas de urease da planta *C. ensiformis* (BECKER-RITT et al., 2007; MULINARI et al., 2007), e o Soyuretox é um peptídeo recombinante derivado da urease ubíqua de soja (KAPPAUN et al., 2019). Ambos os peptídeos demonstraram efeito antifúngico, tanto em fungos filamentosos quanto em leveduras (KAPPAUN et al., 2019; POSTAL et al., 2012).

#### 1.6.1. UREASE de *Proteus mirabilis* (PMU)

A urease é considerada um relevante fator de virulência da bactéria *P. mirabilis*. Pesquisas realizadas demonstram que linhagens urease-negativas desta bactéria são incapazes de estabelecer infecção nos rins de camundongos, evidenciando sua necessidade em uma infecção de sucesso (JOHNSON et al., 1993). A urease de *P. mirabilis* tem sua expressão induzida pela presença de ureia, e o operon codificador compreende oito genes contíguos (Figura 4). O operon da PMU é composto pelos genes estruturais *ureA*, *B* e *C*,

que codificam os domínios  $\gamma$  (UreA),  $\beta$  (UreB) e  $\alpha$  (UreC) da enzima, com 11, 12,2 e 61 kDa, respectivamente. Na forma nativa, a PMU apresenta-se como trímeros  $(\alpha\beta\gamma)_3$ , com massa molecular de aproximadamente 280 kDa (COKER et al., 2000; JONES; MOBLEY, 1987). Os genes acessórios *ureD*, *E*, *F* codificam as proteínas UreD, UreE e UreF, que estão envolvidas na inserção do níquel na apoenzima, dando origem à proteína enzimaticamente ativa (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). O gene *ureG* codifica a proteína UreG, uma GTPase essencial para ativação da enzima. A deleção das sequências gênicas UreE, UreF ou UreG do operon resultou na produção de uma apo-PMU, sem atividade enzimática detectável (SRIWANTHANA; ISLAND; MOBLEY, 1993). O oitavo gene, *ureR*, codifica uma proteína regulatória responsável por ativar a transcrição dos genes estruturais e acessórios, na presença de ureia (DATTELBAUM et al., 2003; POORE; MOBLEY, 2003).

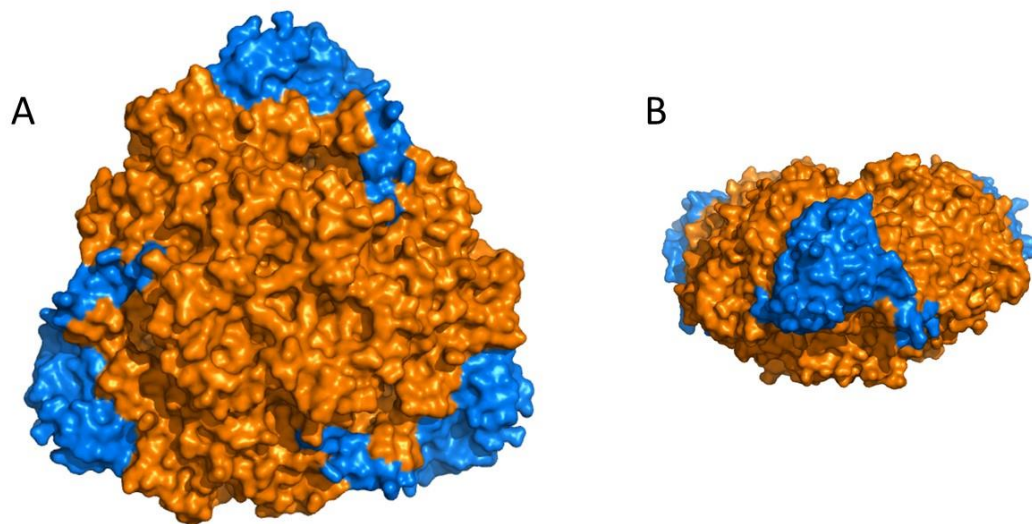


**Figura 4. Operon codificador da urease de *Proteus mirabilis* (PMU).** Representação esquemática da organização genética para o cluster gênico da PMU. Os genes estão mostrados acima dos retângulos; O tamanho molecular previsto do polipeptídeo codificado por cada gene está mostrado abaixo dos retângulos (em kDa). Os retângulos em rosa representam os genes estruturais; os em verde os genes acessórios; o retângulo marrom representa o gene regulatório. Adaptado de (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995).

Assim como visto para outras ureases, Broll (2021) observou que a PMU induz efeitos independentes da ação enzimática, tal como ativação de plaquetas humanas, e atividades antifúngica e entomotóxica (BROLL et al., 2021). No mesmo trabalho, usando s domínios isolados da PMU, mostrou-se que grande parte das atividades biológicas não enzimáticas reveladas para essa proteína são desempenhadas pelo domínio  $\beta$  (BROLL et al., 2021).

A subunidade  $\beta$  da urease de *P. mirabilis* (PmUre $\beta$ ) é um peptídeo de aproximadamente 12 kDa, constituído por 115 aminoácidos. Na sua forma nativa a PmUre $\beta$  está presente nas extremidades da estrutura da PMU (Figura 5). É produzida de forma heteróloga em *Escherichia coli*, possui uma *tag* de seis histidinas (*histag*), que

facilita a purificação (BROLL *et al.*, 2021). Observou-se que PmUre $\beta$  apresenta efeito entomotóxico sobre o inseto-praga *Dysdercus peruvianus*, o qual foi alimentado com o peptídeo. Além disso, dentro dos efeitos entomotóxicos, o peptídeo desencadeou resposta de agregação de hemócitos em *Rhodnius prolixus* (inseto transmissor da doença de Chagas). Demonstrou-se também potencial efeito antifúngico, reduzindo significativamente o desenvolvimento das leveduras *Candida albicans* e *C. parapsilosis*. Células de *C. albicans* expostas ao peptídeo apresentaram agregação, e em imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a presença de material extracelular interligando as células (BROLL *et al.*, 2021). Estes dados evidenciaram inicialmente o potencial antifúngico do domínio  $\beta$  isolado; no entanto não foi realizado um estudo aprofundado dos potenciais mecanismos de ação do peptídeo sobre distintas espécies de *Candida*.



**Figura 5. Estrutura trimérica da Urease de *Proteus mirabilis* (PMU).** Representação da estrutura trimérica da PMU, a PmUre $\beta$  está destacada em azul. A) Visualização frontal. B) Visualização lateral. Adaptado de (BROLL *et al.*, 2021).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica da subunidade  $\beta$  da urease de *Proteus mirabilis* (PmUre $\beta$ ) frente a distintas espécies de *Candida* e caracterizar potenciais mecanismos de ação deste peptídeo.

### 2.2. Objetivos específicos

- 2.1.1. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de PmUre $\beta$  para cada espécie de *Candida* avaliada;
- 2.1.2. Avaliar alterações na estrutura celular de distintas espécies de *Candida* expostas ao peptídeo;
- 2.1.3. Identificar genes de *Candida* diferencialmente expressos pela exposição à PmUre $\beta$ ;
- 2.1.4. Determinar os potenciais alvos de PmUre $\beta$  em células de *Candida* relacionados à propriedade antifúngica deste peptídeo;
- 2.1.5. Avaliar o efeito citotóxico de PmUre $\beta$  em células mamíferas.



### 3. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é uma crise global de saúde pública que ameaça a capacidade de tratar com sucesso as infecções microbianas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A resistência aos agentes antimicrobianos acarreta no aumento do tempo de internação, no custo de hospitalização por paciente, e na taxa de morbimortalidade por patógenos (TYERS; WRIGHT, 2019). As atenções se voltam para a resistência bacteriana pela dificuldade de se introduzir novos agente antimicrobianos na prática clínica, e novas classes de antibacterianos são relativamente raras (MAHONEY et al., 2021). Quando consideramos os fungos multirresistentes a situação é ainda mais grave. As células destes microrganismos são muito semelhantes às células mamíferas, dificultando a especificidade dos antifúngicos (FUENTEFRÍA et al., 2018; RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020; ROUDBARY et al., 2021). A disponibilidade de um número limitado de agentes antifúngicos no mercado torna a tarefa de lidar com infecções fúngicas mais desafiadora. Portanto, há uma necessidade urgente pela descoberta de novas classes de antifúngicos de amplo espectro eficazes, seguros e bem tolerados. Recentemente, os AMPs e AFPs, como uma alternativa aos antimicrobianos convencionais, têm atraído muita atenção dos pesquisadores.

Neste contexto, destacam-se as ureases, enzimas bem conhecidas pela sua atividade enzimática, hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono (MOBLEY; HAUSINGER, 1989) e também pela sua contribuição histórica, sendo a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926). Essas proteínas possuem características que as classificam como proteínas *moonlighting*, capazes de desempenhar funções adicionais não relacionadas ao seu papel metabólico descrito (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; LIGABUE-BRAUN; CARLINI, 2017). Nas últimas quatro décadas as propriedades *moonlighting* de diversas ureases vem sendo estudadas. Já foi caracterizado que algumas dessas proteínas apresentam efeito antifúngico, tanto em leveduras como em fungos filamentosos (BECKER-RITT et al., 2007; MARTINELLI et al., 2017; POSTAL et al., 2012). Além disso, peptídeos derivados dessas enzimas também foram avaliados, sendo eles o Jaburetox e o Soyuretox, os quais também demonstraram potencial antimicrobiano, mais eficiente do que as ureases (KAPPAUN et al., 2019; POSTAL et al., 2012). Vale ressaltar que muitas dessas propriedades compartilhadas entre as ureases e seus peptídeos se devem ao fato de

que essa família de proteínas possui uma grande conservação de sequência, diferenciando apenas nas suas estruturas quaternárias.

No presente estudo, o efeito antifúngico e o mecanismo de ação da subunidade  $\beta$  da urease de *P. mirabilis* foi avaliado. Em um estudo anterior, Broll et al. (2021) demonstraram que a PmUre $\beta$  tem potencial atividade antifúngica, mas o mecanismo de ação subjacente não foi explorado (BROLL et al., 2021). No atual trabalho, procuramos investigar o mecanismo molecular da atividade de PmUre $\beta$  contra *C. albicans* e outras espécies de *Candida* não-*albicans*, considerando o papel dessas leveduras patogênicas em infecções nosocomiais (ZHENG et al., 2021).

Demonstramos que PmUre $\beta$  possui atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*, testadas nas temperaturas de 30 e 37 °C, em concentrações não tóxicas para células humanas. Vale ressaltar que PmUre $\beta$  apresentou atividade antifúngica satisfatória contra *C. auris*, uma vez que esta espécie frequentemente exibe resistência a múltiplas drogas (SPIVAK; HANSON, 2018). Apesar de a maioria das espécies de *Candida* testadas a 37 °C apresentarem aumento de MIC, exigindo maior concentração de PmUre $\beta$ , o peptídeo ainda reduz significativamente o desenvolvimento das leveduras. A exceção foi a *C. parapsilosis*, que a 37 °C mostrou ser mais susceptível ao peptídeo, apresentando redução significativa de desenvolvimento já na menor concentração (2,25  $\mu$ M) e a *C. auris* do que com a concentração de 18  $\mu$ M PmUre $\beta$  a 37 °C apresentou menor formação de colônias do que a 30 °C. Além disso, quase todas as leveduras avaliadas apresentaram redução do desenvolvimento de forma concentração dependente, à exceção de *C. auris* (30 °C), que apresentou um perfil distinto, no entanto já relatado na literatura para outros compostos (LARA-AGUILAR et al., 2021). Em relação à formação de biofilme, PmUre $\beta$  foi capaz de reduzir a formação, entretanto em concentração mais elevada do peptídeo do que nos ensaios de CIM. As imagens de MEV também confirmaram a redução da formação de biofilme; pode-se visualizar a redução das camadas de células, bem como uma diminuição das pseudo-hifas. A capacidade de reduzir a formação é uma característica bastante interessante, pois a formação dos biofilmes dificulta o tratamento e contribui para altas taxas de morbidade e mortalidade, representando assim um dos principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese da candidíase (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PEREIRA et al., 2021).

Após a confirmação da ação antifúngica da PmUreβ nas diferentes espécies de *Candida*, iniciou-se a caracterização do mecanismo de ação do peptídeo nas leveduras, a fim de obter informações mais consistentes sobre a interação dinâmica da PmUreβ com as leveduras. Os resultados obtidos no ensaio de proteção do sorbitol indicaram que o peptídeo possui atuação sobre a parede celular fúngica. Corroborando estes resultados, a parede celular irregular foi facilmente visualizada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Numerosas cicatrizes de brotos não polares observadas sugerem que o processo normal de divisão da levedura pode ter sido afetado, resultando em células únicas com várias tentativas de divisão, mas sem aumentar seu número viável (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013). A parede celular desempenha um papel crucial na interação com as células hospedeiras, mediando processos como adesão ou fagocitose que são essenciais durante a infecção (ARANA et al., 2009). Possivelmente essa alteração na parede celular das células esteja colaborando para a redução da formação do biofilme, pois as células podem apresentar uma maior dificuldade de adesão na superfície da placa. Portanto, alterações na dinâmica da parede celular podem inibir o desenvolvimento do fungo ou impedir interações fungo-hospedeiro essenciais para a patogênese (LIMA; COLOMBO; DE ALMEIDA JUNIOR, 2019). Além disso, a parede celular ser alvo do peptídeo é relevante, pois as células humanas não possuem essa estrutura e, portanto, a toxicidade para o hospedeiro tende a ser menor (MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014). Um ponto interessante e até mesmo contraditório ocorreu no ensaio de marcação com calcofluor. Células de *C. albicans* após 24 h de tratamento com PmUreβ demonstraram um aumento na marcação de calcofluor. Tal fenômeno já foi observado em células de *C. albicans* tratadas com caspofungina (CSF), onde ocorre aumento compensatório nos níveis de quitina da parede celular e resulta em exposição aumentada de quitina e β-1,3-glicana na superfície das leveduras (MORA-MONTES et al., 2011; WALKER et al., 2008; WHEELER et al., 2008). Além disso, o mesmo fenômeno foi observado em um trabalho de reposicionamento de fármacos, onde *C. albicans* expostas à atorvastatina revelaram aumento da fluorescência de calcofluor, e separação celular incompleta (AJDIDI et al., 2019). Os resultados de análise da expressão gênica diferencial por RNAseq confirmaram que a parede celular é alvo potencial do peptídeo, pois os genes envolvidos na formação da parede celular tiveram sua expressão alterada, sendo eles *PGA6*, *ECM33* e *RBR1*.

Além disso, o peptídeo também demonstrou causar desestabilização da estrutura da membrana celular, presumivelmente por causar permeabilidade da membrana, permitindo a passagem de pequenas moléculas, como PI (massa molecular de ~600 g/mol). Além do mais, a análise de RNAseq evidenciou que o gene *ERG6* apresenta expressão reduzida em *C. albicans* tratada com o peptídeo, demonstrando que os componentes da membrana celular também estão comprometidos pela ação do peptídeo. Ademais, o ensaio de quantificação de ERO intracelular demonstrou que o peptídeo é capaz de gerar estresse oxidativo nas células. Esse aumento de ERO poderia gerar danos à membrana celular, aumentando a permeabilidade da estrutura (EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004). Dados espectroscópicos de Dicroísmo Circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) evidenciaram que o Jaburetox interage com membranas lipídicas (BROLL et al., 2017b). Tendo em vista que a PmUreβ e Jaburetox são sequências que compartilham alta similaridade, e apresentam algumas atividades biológicas em comum, é possível que a PmUreβ também interaja com membranas lipídicas assim com o Jaburetox.

Recentemente, um estudo demonstrou a relação entre a coinfeção por *C. albicans* e *P. mirabilis* no trato urinário, evidenciando que a presença desses dois microrganismos simultaneamente aumenta os danos nos tecidos do hospedeiro (NIEMIEC et al., 2022). Como demonstrado por Broll et al., PMU completa não foi capaz de reduzir significativamente o desenvolvimento de *C. albicans* (BROLL et al., 2021). Mesmo que a PmUreβ esteja na superfície da urease, provavelmente seus sítios que interagem com os alvos das leveduras não estão disponíveis. Esse evento reforça que o estudo das subunidades específicas da urease de forma independente garante um perfil mais seguro e sítio-dirigido de ação de um peptídeo derivado de urease como um candidato a antifúngico.

#### 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- PmUreβ apresentou atividade antifúngica *in vitro* para todos os isolados de *Candida* testados, em ambas as temperaturas (30 e 37 °C), e também reduziu a formação de biofilme de *C. albicans*;

- O peptídeo PmUreβ tem como potencial alvo da atividade antifúngica a parede celular, resultando em deformações nas células, bem como alteração na expressão dos genes envolvidos na formação da parede e aumento compensatório da parede celular;
- PmUreβ atua sobre a membrana celular, aumentando a permeabilidade dessa estrutura. Possivelmente as EROs geradas pela presença do peptídeo podem contribuir para a permeabilidade da membrana;
- Os testes de toxicidade em células mamíferas demonstraram que o peptídeo não apresenta efeito citotóxico nestas células.

## **5. PERSPECTIVAS**

Tendo em vista a aplicabilidade do peptídeo como um potencial agente antifúngico, algumas análises adicionais são necessárias. Visando o aumento da produção do peptídeo, ensaios de otimização da expressão serão necessários, bem como a utilização de biorreatores nesse processo. Em relação à atividade do peptídeo nas leveduras, ensaios de combinação de terapia são considerados promissores, no intuito de buscar por resultados mais satisfatórios sem o aumento das concentrações, tanto dos fármacos como do peptídeo. Ensaios com reforço de dose do peptídeo também serão necessários, já que em qualquer tratamento o medicamento é administrado com recorrência. A fim de confirmar que o peptídeo não apresenta efeitos citotóxicos para células e tecidos mamíferos, ensaios com tratamentos crônicos em culturas celulares poderiam contribuir para essa análise, bem como a realização de ensaios com organismos modelos.

## 6. REFERÊNCIAS

ABU-ELTEEN, K. H.; HAMAD, M. A. Changing epidemiology of classical and emerging human fungal infections: a review. **Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS)**, v. 5, n. 4, p. 215–229, 2012.

AHANGARI, F. et al. Comparing the effectiveness of *Salvia officinalis*, clotrimazole and their combination on vulvovaginal candidiasis: A randomized, controlled clinical trial. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 45, n. 4, p. 897–907, 20 abr. 2019.

AJDIDI, A. et al. Assessment of the in vitro and in vivo activity of atorvastatin against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1497–1506, 1 out. 2019.

ALEXANDER, B. D. et al. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates with Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 15 jun. 2013.

ANDERSON, R. C.; YU, P.-L. Isolation and characterization of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1139–1146, dez. 2003.

ARANA, D. M. et al. The role of the cell wall in fungal pathogenesis. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 308–320, maio 2009.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant candida: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 3, p. S445–S451, 2017.

ARMSTRONG-JAMES, D. et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e393–e402, dez. 2017.

AZIE, N. et al. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 293–300, ago. 2012.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 274–283, jul. 2010.

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARAES, J. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin, a Plant Protein, Induces Insulin Release from Isolated Pancreatic Islets\*. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 675–679, fev. 1991.

BECHINGER, B. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: A 31P solid-state NMR spectroscopy study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1712, n. 1, p. 101–108, jun. 2005.

- BECKER-RITT, A. B. et al. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 971–983, dez. 2007.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 279–311, jun. 2021.
- BONGOMIN, F. et al. **Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. Journal of Fungi**, 2017.
- BROLL, V. et al. Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 849–860, 2017a.
- BROLL, V. et al. Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 849–860, nov. 2017b.
- BROLL, V. et al. Non-enzymatic properties of *Proteus mirabilis* urease subunits. **Process Biochemistry**, v. 110, p. 263–274, nov. 2021.
- BROTHERS, E. M. et al. A Child With COVID-19, Type 1 Diabetes, and *Candida glabrata*: A Case Report and Literature Review. **Clinical Pediatrics**, v. 60, n. 14, p. 554–558, 12 dez. 2021.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, 2012.
- BUROW, E.; KÄSBOHRER, A. Risk Factors for Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* in Pigs Receiving Oral Antimicrobial Treatment: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 2, p. 194–205, mar. 2017.
- CABIB, E.; ARROYO, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 648–655, 16 set. 2013.
- CARLINI, C. R. et al. Central Nervous Effects of the Convulsant Protein Canatoxin. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 54, n. 3, p. 161–166, 13 mar. 1984.
- CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667–675, jan. 1981.
- CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 551–560, fev. 1985.
- CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, v. 110, p. 90–109, 2016.

- CHAABANE, F. et al. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 29 nov. 2019.
- CHAPMAN, B. et al. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1103–1108, 2017.
- CHEN, C. H.; LU, T. K. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 24, 13 jan. 2020.
- CHOWDHARY, A. et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients, India, April–July 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 11, p. 2694–2696, nov. 2020.
- CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 18 maio 2017.
- COKER, C. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1497–1505, out. 2000.
- COOKE, G. et al. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2022, n. 1, 2022.
- DAMASCENO-ESCOURA, A. H. et al. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: Epidemiological, Clinical and Necropsy Data from a Brazilian Teaching Hospital. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 339–346, 2020.
- DANESHNIA, F. et al. Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. **The Lancet Microbe**, 2023.
- DATTELBAUM, J. D. et al. UreR, the Transcriptional Activator of the *Proteus mirabilis* Urease Gene Cluster, Is Required for Urease Activity and Virulence in Experimental Urinary Tract Infections. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 1026–1030, fev. 2003.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, dez. 2000.
- DAWSON, C. C.; INTAPA, C.; JABRA-RIZK, M. A. “Persisters”: Survival at the Cellular Level. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002121, 28 jul. 2011.
- DE ZOYSA, G. H.; GLOSSOP, H. D.; SAROJINI, V. Unexplored antifungal activity of linear battacin lipopeptides against planktonic and mature biofilms of *C. albicans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 344–353, 2018.
- DEN HERTOOG, A. L. et al. Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. **Biochemical Journal**, v. 379, n. 3, p. 665–672, 1 maio 2004.
- DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e339–e347, 2018.



DODGE, J. T.; PHILLIPS, G. B. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. **Journal of lipid research**, v. 8, n. 6, p. 667–75, nov. 1967.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 70, n. 1, p. 11–17, 1 jul. 1939.

EGUIA, A. et al. *Candida albicans* biofilms on different materials for manufacturing implant abutments and prostheses. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, 2020.

EJSING, C. S. et al. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 7, p. 2136–2141, 17 fev. 2009.

ENDO, M. et al. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 672–676, mar. 1997.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 1, p. 1–61, set. 2004.

FARHAN, M. A. et al. Types of yeasts that cause vulvovaginal candidiasis in chronic users of corticosteroids. **Medical Mycology**, v. 57, n. 6, p. 681–687, 1 ago. 2019.

FERNANDES, J. Isolation and characterization of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 2, p. 127–138, 1 fev. 2004.

FISHER, M. C.; DENNING, D. W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 211–212, 2023.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 18–28, jan. 2008.

FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, jan. 2018.

GARCIA-VIDAL, C. et al. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 1, p. 83–88, jan. 2021.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–517, out. 1999.

GLOBAL ACTION FOR FUNGAL INFECTION. **Gaffi Annual Report 2021**. Disponível em: <[https://gaffidocuments.s3.eu-west-2.amazonaws.com/GAFFI\\_Annual+report\\_2021\\_final.pdf](https://gaffidocuments.s3.eu-west-2.amazonaws.com/GAFFI_Annual+report_2021_final.pdf)>.

GONÇALVES, S. et al. Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 9 jun. 2017.

GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 366–371, ago. 2002.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310–321, maio 2016.

GUYARD, C. et al. Involvement of  $\beta$ -Glucans in the Wide-Spectrum Antimicrobial Activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 Killer Toxin. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 11, p. 686–694, 1 nov. 2002.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, fev. 2004.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S. Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 105, 1 set. 2018.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, jan. 2016.

HOYER, L. L. et al. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family – a sticky pursuit. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 1–15, jan. 2008.

JANBON, G. et al. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 5–6, p. 237–245, 2019.

JANNIGER, E. J.; KAPILA, R. Public health issues with *Candida auris* in COVID-19 patients. **World Medical & Health Policy**, v. 13, n. 4, p. 766–772, 16 dez. 2021.

JEFFERY-SMITH, A. et al. *Candida auris*: a Review of the Literature. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, jan. 2018.

JOHNSON, D. E. et al. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2748–2754, jul. 1993.

JONES, B. D.; MOBLEY, H. L. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus providencia*, and *morganella* species isolated from urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 2198–2203, set. 1987.

KAPPAUN, K. et al. Soyuretox, an Intrinsically Disordered Polypeptide Derived from Soybean (*Glycine max*) Ubiquitous Urease with Potential Use as a Biopesticide. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5401, 30 out. 2019.

KHAN, M. S.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 54, 2013.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and microbial technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

KULLBER, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1445–1456, 2018.

KUMAR, R. et al. Histatin 5 Uptake by *Candida albicans* Utilizes Polyamine Transporters Dur3 and Dur31 Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 43748–43758, dez. 2011.

KUMAR, S.; KAYASTHA, A. M. Soybean (*Glycine max*) urease: Significance of sulfhydryl groups in urea catalysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 746–750, set. 2010.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl\_1, p. i4–i13, 2018.

LARA-AGUILAR, V. et al. Adaptation of the emerging pathogenic yeast *Candida auris* to high caspofungin concentrations correlates with cell wall changes. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1400–1417, 31 dez. 2021.

LEIDL, K. et al. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 10, p. 655–664, out. 2008.

LI, X. S. et al. *Candida albicans* Cell Wall Ssa Proteins Bind and Facilitate Import of Salivary Histatin 5 Required for Toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22453–22463, ago. 2006.

LIGABUE-BRAUN, R.; CARLINI, C. R. Moonlighting Toxins: Ureases and Beyond. In: Gopalakrishnakone, P., Carlini, C., Ligabue-Braun, R. (eds) **Plant Toxins. Toxinology**. Springer, Dordrecht. p. 199–219. 2015

LIMA, S. L.; COLOMBO, A. L.; DE ALMEIDA JUNIOR, J. N. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 21 nov. 2019.

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 3 jan. 2018.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 27 dez. 2016.

- MAHONEY, A. R. et al. The silent pandemic: Emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. **iScience**, v. 24, n. 4, p. 102304, abr. 2021.
- MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCAZAR, J. L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 36–41, jan. 2014.
- MARTINELLI, A. H. S. et al. Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 245–258, fev. 2017.
- MATEJUK, A. et al. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. **Drugs of the Future**, v. 35, n. 3, p. 197, 2010.
- MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 25 nov. 2013.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 15 fev. 2013.
- MENZEL, L. P. et al. Potent in vitro and in vivo antifungal activity of a small molecule host defense peptide mimic through a membrane-active mechanism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4353, 28 jun. 2017.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, fev. 2011.
- MOBLEY, H. L.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.
- MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 451–480, set. 1995.
- MOLANO, J.; BOWERS, B.; CABIB, E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. **Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 199–212, 1 maio 1980.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254–259, dez. 2014.
- MORA-MONTES, H. M. et al. Recognition and Blocking of Innate Immunity Cells by *Candida albicans* Chitin. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1961–1970, maio 2011.
- MULINARI, F. et al. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.
- MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.
- NAGIEC, M. M. et al. Sphingolipid Synthesis as a Target for Antifungal Drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 9809–9817, abr. 1997.

- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400–428, 15 set. 2003.
- NAILIS, H. et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 114, 16 dez. 2010.
- NAMI, S. et al. Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 333–344, jan. 2019.
- NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340–345, ago. 2006.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011.
- NIEMIEC, M. J. et al. Augmented Enterocyte Damage During *Candida albicans* and *Proteus mirabilis* Coinfection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 16 maio 2022.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, 2015a.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, 15 out. 2015b.
- OLIVERA-SEVERO, D.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 452, n. 2, p. 149–155, ago. 2006.
- OMRANI, A. S. et al. Clinical characteristics and risk factors for COVID-19-associated Candidemia. **Medical Mycology**, v. 59, n. 12, p. 1262–1266, 3 dez. 2021.
- O'NEILL, C. B. J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.
- OPPENHEIM, F. G. et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7472–7477, jun. 1988.
- PACE, M. C. et al. Burden of severe infections due to carbapenem-resistant pathogens in intensive care unit. **World Journal of Clinical Cases**, v. 11, n. 13, p. 2874–2889, 2023.
- PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 143–171, 11 jun. 2012.

- PAULMANN, M. et al. Structure-Activity Analysis of the Dermcidin-derived Peptide DCD-1L, an Anionic Antimicrobial Peptide Present in Human Sweat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 8434–8443, mar. 2012.
- PAUMGARTTEN, F. J. R.; OLIVEIRA, A. C. A. X. DE. Off label, compassionate and irrational use of medicines in Covid-19 pandemic, health consequences and ethical issues. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 9, p. 3413–3419, set. 2020.
- PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11–22, 9 jul. 2021.
- PFALLER, M. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p. 323–331, dez. 2012.
- PFALLER, M. A. et al. Further Standardization of Broth Microdilution Methodology for In Vitro Susceptibility Testing of Caspofungin against *Candida* Species by Use of an International Collection of More than 3,000 Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3117–3119, jul. 2004.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, abr. 2010.
- PFALLER, M. A. et al. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement\_1, p. S79–S94, 15 mar. 2019.
- POORE, C. A.; MOBLEY, H. L. T. Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3383–3394, 1 dez. 2003.
- POSTAL, M. et al. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.
- POSTERARO, B. et al. Pan-Echinocandin-Resistant *Candida glabrata* Bloodstream Infection Complicating COVID-19: A Fatal Case Report. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 163, 6 set. 2020.
- POUNY, Y. et al. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p. 12416–12423, 15 dez. 1992.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.
- RAMAGE, G. et al. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, 2009.

- RAUTENBACH, M.; TROSKIE, A. M.; VOSLOO, J. A. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. **Biochimie**, v. 130, p. 132–145, nov. 2016.
- REAZIN, C. et al. Chestnuts bred for blight resistance depart nursery with distinct fungal rhizobiomes. **Mycorrhiza**, v. 29, n. 4, p. 313–324, 2019.
- RIBEIRO-DASILVA, G.; PRADO, J. F. Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. **Toxicon**, v. 31, n. 9, p. 1131–1136, set. 1993.
- RICOTTA, E. E. et al. Invasive Candidiasis Species Distribution and Trends, United States, 2009–2017. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 7, p. 1295–1302, 8 abr. 2021.
- RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 673–688, 2014.
- RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. e0007964, 20 fev. 2020.
- ROMERO, M. et al. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Aspergillus* spp.: When Local Epidemiology Breaks the Norm. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 41, 21 maio 2019.
- ROUDBARY, M. et al. Overview on the prevalence of fungal infections, immune response, and microbiome role in COVID-19 patients. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 1–28, 2021.
- SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41–44, jan. 2009.
- SCHELENZ, S. et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 5, n. 1, p. 35, 19 dez. 2016.
- SCHMIDT, M. et al. Septins, under Cla4p Regulation, and the Chitin Ring Are Required for Neck Integrity in Budding Yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 5, p. 2128–2141, maio 2003.
- SEDDIKI, S. M. L. et al. Fungal infectivities of implanted catheters due to *Candida* sp. Biofilms formation and resistance. **Journal de Mycologie Medicale / Journal of Medical Mycology**, 2015.
- SHER KHAN, R. et al. Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 192, 29 maio 2019.
- SHIELDS, R. K. et al. Spontaneous Mutational Frequency and FKS Mutation Rates Vary by Echinocandin Agent against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, jan. 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS TREATMENT. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2015.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414–a000414, 1 maio 2010.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SINGH, A.; PRASAD, R. Comparative Lipidomics of Azole Sensitive and Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans* Reveals Unexpected Diversity in Molecular Lipid Imprints. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19266, 29 abr. 2011.

SIRKO, A.; BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. **Acta biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 1189–95, 2000.

SPALLONE, A.; SCHWARTZ, I. S. Emerging Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 261–277, jun. 2021.

SPIVAK, E. S.; HANSON, K. E. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, fev. 2018.

SRIWANTHANA, B.; ISLAND, M. D.; MOBLEY, H. L. T. Sequence of the *Proteus mirabilis* urease accessory gene ureG. **Gene**, v. 129, n. 1, p. 103–106, jul. 1993.

STEFFEN, H. et al. Naturally Processed Dermcidin-Derived Peptides Do Not Permeabilize Bacterial Membranes and Kill Microorganisms Irrespective of Their Charge. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2608–2620, ago. 2006.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, 2011.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 1027–1053, dez. 2021.

SUMNER, J. B. Enzyme Urease. **J. Biol. Chem.**, v. 69, p. 435–441, 1926.

SUNDSTRÖM, J.; VASAN, R. S. Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events. **Current Opinion in Lipidology**, v. 17, n. 1, p. 45–53, fev. 2006.

SWIDSINSKI, A. et al. Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 220, n. 1, p. 91.e1-91.e8, jan. 2019.

TAYLOR, S. W. et al. A Sulfated, Phosphorylated 7 kDa Secreted Peptide Characterized by Direct Analysis of Cell Culture Media. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 2, p. 795–802, 1 fev. 2008.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. *Candida* Biofilms and the Host: Models and New Concepts for Eradication. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–16, 2012.



TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, out. 2008.

TSAY, S. et al. Approach to the Investigation and Management of Patients with *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 2, p. 306–311, 6 jan. 2018.

TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 141–155, 25 mar. 2019.

UBERTI, A. F. et al. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. **Toxicon**, v. 69, p. 240–249, jul. 2013.

UPTON, M.; COTTER, P.; TAGG, J. Antimicrobial Peptides as Therapeutic Agents. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–2, 2012.

VALLABHANENI, S. et al. Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin Nonsusceptible *Candida glabrata* Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008–2014. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2015.

VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2016a.

VALLABHANENI, S. et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus — United States, May 2013–August 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 44, p. 1234–1237, 11 nov. 2016b.

VAN DER WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 19, p. 3545–3570, 5 out. 2013.

VITIELLO, A. et al. Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. **Biomedicines**, v. 11, n. 4, p. 1063, 2023.

WALKER, L. A. et al. Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. e1000040, 4 abr. 2008.

WALSH, T. J. Echinocandins — An Advance in the Primary Treatment of Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2070–2072, 19 dez. 2002.

WANG, G. Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides. **Computational Peptidology**, p. 43–66. 2015

WANG, H. et al. Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1160–1203, out. 2020.

- WASSERMANN, G. E. et al. Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2025–2034, jul. 2010.
- WHEELER, R. T. et al. Dynamic, Morphotype-Specific *Candida albicans*  $\beta$ -Glucan Exposure during Infection and Drug Treatment. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000227, 5 dez. 2008.
- WILLEMS, H. M. E. et al. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 27, 2020.
- WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 5771, 1 jan. 2011.
- WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 1 ago. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance**. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcgclefindmkaj/https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112647/WHO\_HSE\_PED\_AIP\_?sequence=1>. Acesso: 10 de Fevereiro de 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso: 10 de Fevereiro de 2023.
- WU, M. et al. Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7235–7242, 1 jun. 1999.
- YAMIN, D. H.; HUSIN, A.; HARUN, A. Risk Factors of *Candida parapsilosis* Catheter-Related Bloodstream Infection. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 12 ago. 2021.
- YANG, X. et al. A 20-Year Antifungal Susceptibility Surveillance (From 1999 to 2019) for *Aspergillus* spp. and Proposed Epidemiological Cutoff Values for *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*: A Study in a Tertiary Hospital in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 22 jul. 2021.
- YANO, J. et al. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC Women's Health**, v. 19, n. 1, p. 48, 2019.
- ZAMAN, S. BIN et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, 28 jun. 2017.
- ZHENG, Y.-J. et al. Epidemiology, species distribution, and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai: an 11-year retrospective analysis in a tertiary care hospital. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 20, n. 1, p. 34, 13 dez. 2021.

## Anexo 1 – Manuscrito publicado junto ao periódico *Process Biochemistry*

### Non-Enzymatic Properties of *Proteus mirabilis* Urease Subunits

Valquiria Broll<sup>a†</sup>, **Ana Paula A. Perin<sup>a†</sup>**, Fernanda C. Lopes<sup>a</sup>, Anne Helene S. Martinelli<sup>b</sup>, Natalia R. Moyetta<sup>a,c\*</sup>, Leonardo L. Fruttero<sup>a,c,d\*</sup>, Matheus V. C. Grahl<sup>c,d</sup>, Augusto F. Uberti<sup>c,d</sup>, Diogo R. Demartini<sup>a</sup>, Rodrigo Ligabue-Braun<sup>a,‡,#</sup>, Celia R. Carlini<sup>a,c,d,#</sup>.

<sup>a</sup>*Center of Biotechnology, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Biophysics & Department of Molecular Biology and Biotechnology, Biosciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil*

<sup>c</sup>*Brain Institute (BRAINS) – InsCer and School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brazil*

<sup>d</sup>*Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brazil*

† These authors contributed equally to this work.

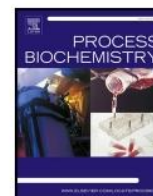
#Corresponding authors:

Rodrigo Ligabue-Braun - E-mail: rodrigo**l**@ufcspa.edu.br

Celia R. Carlini – Lead contact - E-mail: celia.carlini@pucrs.br, Tel: + 55 51 3320-3485

\*Present address: Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina;

‡Present address: Department of Pharmacosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.



## Non-enzymatic properties of *Proteus mirabilis* urease subunits

Valquiria Broll<sup>a,1</sup>, Ana Paula A. Perin<sup>a,1</sup>, Fernanda C. Lopes<sup>a</sup>, Anne Helene S. Martinelli<sup>b</sup>,  
Natalia R. Moyetta<sup>a,c,2</sup>, Leonardo L. Fruttero<sup>a,c,d,2</sup>, Matheus V.C. Grahl<sup>c,d</sup>, Augusto F. Uberti<sup>c,d</sup>,  
Diogo R. Demartini<sup>a</sup>, Rodrigo Ligabue-Braun<sup>a,3,\*</sup>, Celia R. Carlini<sup>a,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Center of Biotechnology, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biophysics & Department of Molecular Biology and Biotechnology, Biosciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

<sup>c</sup> Brain Institute (BRAINS) – InsCer and School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brazil

<sup>d</sup> Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Urease  
*Proteus mirabilis*  
Uropathogen  
PmUre $\beta$   
*Candida albicans*  
Moonlighting proteins

### ABSTRACT

Ureases are moonlighting proteins displaying non-catalytic properties, including platelet activation, antifungal and entomotoxic effects. The structure-activity mapping of these properties is poorly developed. *Proteus mirabilis* urease (PMU) consists of three subunits, PmUre $\alpha$ , PmUre $\beta$  and PmUre $\gamma$ , in an ( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub> organization. In order to study the structure-activity relationships of PMU we obtained the recombinant subunits of this urease and evaluated their biological activities. The holo-urease promoted platelet aggregation, and toxicity in fungal and insect models. Similar to Jaburetox, a plant urease-derived polypeptide, PmUre $\beta$  showed the highest toxicity against yeasts and insects, and activated human platelets. PmUre $\gamma$  and PmUre $\alpha$  presented insecticidal action upon injection. In addition, only PmUre $\gamma$  and PmUre $\beta$  promote hemocytes aggregation. Bioinformatics analyses revealed gene/segment duplication and evolutionary divergence among ureases. Our findings show that PmUre $\beta$  (and probably its counterparts in other ureases) carries most of the non-enzymatic activities of these proteins.

### 1. Introduction

Ureases (EC 3.5.1.5) are nickel-dependent enzymes that catalyze the hydrolysis of urea into ammonia and carbamate, which spontaneously decompose into carbon dioxide and a second molecule of ammonia [1–3]. Ureases are well conserved proteins although differing in their quaternary structures. While plant and fungal ureases are hexamers of a single chain subunit, bacterial ureases can be trimers, hexamers, or dodecamers, whose “monomers” are composed by two or three hetero-subunits that co-align with the single chained ureases [4–7].

In the last two decades, ureases have been characterized as moonlighting proteins that display many other biological properties unrelated to catalysis. The ammonia-independent toxicity of ureases was initially described for Canatoxin, an isoform of the jack bean (*Canavalia ensiformis*)

urease, which causes convulsions preceding death of mice and rats. Canatoxin, and also the classic jack bean urease (JBU), have insecticidal and fungitoxic properties. Most of the non-enzymatic activities of Canatoxin and JBU were also observed for ureases from other plants (soybean, cotton) and for the bacterial enzymes of *Helicobacter pylori* and *Sporosarcina (Bacillus) pasteurii* [1,4].

Structures versus activity studies on the moonlighting properties of ureases are scarce. An internal sequence encompassing 91 amino acids of *C. ensiformis* ureases was found to carry their insecticidal activity. Recombinant polypeptides with equivalent sequences were built and named Jaburetox, with 93 amino acids (~11 kDa), derived from JBURE-II, an isoform of JBU, [8,9], and Soyuretox, homologous to Jaburetox, but derived from the sequence of the ubiquitous isoform of the soybean urease [10]. In addition to entomotoxicity, Jaburetox and Soyuretox are

\* Corresponding authors at: Center of Biotechnology, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil.

E-mail addresses: [rodrigolb@ufcspa.edu.br](mailto:rodrigolb@ufcspa.edu.br) (R. Ligabue-Braun), [celia.carlini@pucrs.br](mailto:celia.carlini@pucrs.br) (C.R. Carlini).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address: Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina;

<sup>3</sup> Present address: Department of Pharmacosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.023>

Received 30 March 2021; Received in revised form 6 August 2021; Accepted 23 August 2021

Available online 25 August 2021

1359-5113/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

also toxic to filamentous fungi and yeasts, but do not activate platelets, nor display lethality towards rodents, also Soyuretox is not toxic to zebrafish embryos [9,10]. Altogether these data pointed to the existence of more than one biologically active domain in ureases [8–11].

*H. pylori* urease (HPU), a crucial virulence factor of this bacterium, which causes gastritis, ulcers and stomach cancer [12] consists of two chains, HpUreA (27 kDa), representing a fusion of the  $\gamma$  and  $\beta$  domain of other bacterial enzymes, and HpUreB (61 kDa), which contains the active site [1]. HpUreB was shown to interact with CD74 on T cells and with Th17 lymphocytes [13]. HpUreA was found in the nucleus of gastric epithelial cells [14]. Although both subunits of HPU were able to bind to platelets, only HpUreB displayed platelet-aggregating properties [15].

*Proteus mirabilis* is a gastrointestinal Gram-negative bacillus and an opportunistic uropathogen, whose infection typically leads to formation of bladder and kidney stones along with catheter-associated urinary infections [16,17]. *Proteus mirabilis* produces a urea-inducible urease (PMU) well recognized as a virulence factor [16,18]. Other virulence factors, such as fimbriae and adhesins, act cooperatively with PMU in the pathogenesis of urinary infection [16,19]. The enzyme activity of PMU enables the pathogen to hydrolyze urea into carbon dioxide and ammonia, thus providing nitrogen for bacterial survival. Subsequently the generated ammonia alkalinizes the urine, resulting in precipitation of urinary salts and formation of urinary stones that are colonized by bacteria [20].

*P. mirabilis* urease has three subunits, PmUreA or PmUrey (11.0 kDa), PmUreB or PmUre $\beta$  (12.2 kDa) and PmUreC or PmUre $\alpha$  (66.0 kDa), organized in an ( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub> oligomer [21,22]. In this work, we have studied PMU and its recombinant subunits separately, aiming to determine if PMU is also a multifunctional protein and to get structural insights of its biological activities.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plasmid construction and bacterial strain

*Escherichia coli* HB101 carrying a pMID 1010 plasmid was a kind gift from Dr. Harry T. Mobley (Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA). This plasmid contains the complete operon for PMU formed by eight genes *in tandem*: three structural genes (*ureA*, *ureB* and *ureC*) and five genes encoding accessory and regulatory proteins (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG* and *ureR*). This plasmid was used as template to clone each of the structural genes *ureA*, *ureB* and *ureC*, which encode the subunits  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$ , respectively.

Primers used to amplify *P. mirabilis ureA* 5-CATATGGAATTAACACC AAGAGAA-3, 3-AGATCTCTACACAATAGGTGAGTGAATTG-5, *P. mirabilis ureB* 5-CATATGTGAATAACATGATCCCGGTG-3, 3-AGATCTTTTT CTCACT CTCCAATTTACCC-5 and *P. mirabilis ureC* 5-CATATGAA AACTATCTCAGTCA AGCTT-3, 3-AGATCTCGCTGGTTAAAATAAGAA ATA GCG-5 were designed based on *P. mirabilis* HI4320 genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=proteus+mirabilis>). Each insert was subcloned into the vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into *E. coli* XL10-Gold ultracompetent cells (Novagen, Madison, WI, USA) to amplify and maintain the plasmid. The Zippy™ Plasmid Miniprep kit (Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA) was used for plasmid purification which was then cleaved by restriction enzymes (Promega, Madison, WI, USA), both steps performed as indicated by the manufacturers. All inserts were cloned into a pET15-b in which a Streptag II sequence was inserted [21]. Finally, *P. mirabilis* pET15b::*ureA* plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA), whereas the plasmid pET15b::*ureB* and pET15b::*ureC* for expression of *P. mirabilis ureB* and *ureC* genes, respectively, was achieved using *E. coli* Arctic Express (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA).

Alternatively, *ureB* gene was also cloned in plasmid pET23a, between *NdeI* and *XhoI* restriction enzymes (produced by GenScript, Piscataway,

NJ, USA). The plasmid pET23a::*ureB* was transformed in *E. coli* (Lemo21) in order to obtain the expression of *ureB* subunit in the soluble fraction, as will be discussed in the manuscript.

### 2.2. Bacterial growth and induction conditions

#### 2.2.1. *Proteus mirabilis urease (PMU)*

*Escherichia coli* HB101 cultures were performed in LB, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1  $\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> under constant agitation (185 rpm) at 37 °C. The induction of urease expression was carried out by addition of 500 mM urea for 3 h, as soon as the culture reached OD<sub>600</sub> of 0.7. Screening of recombinant colonies expressing ureolytic activity was performed by urea segregation agar methodology [23].

#### 2.2.2. PMU structural subunits

All cell cultures were carried out using LB medium with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For pET15b::*ureA* and pET23a::*ureB* plasmid, 36  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added, while for pET15b::*ureB* and pET15b::*ureC*-expressing cultures, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of gentamycin were added. Cultures were performed at 37 °C, under constant agitation (180 rpm). Protein expression was induced by addition of 0.5 mM IPTG when the cellular growth achieved an OD<sub>600</sub> of 0.7. Cell cultures were kept overnight at 27 °C for *ureA* and 18 °C for *ureB* and *ureC* to allow protein synthesis.

### 2.3. Crude extract and purification of PMU

The recombinant holoprotein encoded by the plasmid carrying the whole urease operon was called PMU. The recombinant subunits were designated PmUrey, PmUre $\beta$  and PmUre $\alpha$ , encoded by the plasmids carrying the *ureA*, *ureB* and *ureC* genes, respectively.

After bacterial growth, the culture was centrifuged at 5800  $\times g$  for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended in PEB [20 mM sodium phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] and centrifuged. To remove excess of urea from the pellet, the process was repeated three more times. Cells were suspended in PEB buffer and disrupted using a Unique Ultrasonic Homogenizer (Hielscher Ultrasonics, Teltwon, Germany), 10 pulses of 50 s, in ice bath. After lysis, the material was centrifuged at 23,000  $\times g$  for 60 min at 4 °C and the supernatant was dialyzed exhaustively to remove the urea still present in the solution.

After dialysis, the crude extract was submitted to three sequential chromatographic steps. The extract was applied into a HiTrapQ™ column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), at 60 % of its protein binding capacity. The resin was equilibrated with PEB pH 7.5 and washed with the same buffer to remove unbound proteins. The fraction with ureolytic activity was eluted stepwise in PEB pH 7.5 containing 400 mM KCl. The urease-enriched fractions were pooled and dialyzed against PEB pH 7.5 and then loaded into a Q-Sepharose™ column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) mounted in an ÄKTA chromatography system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), equilibrated in the same buffer. Elution was performed with a linear gradient from 0 to 600 mM KCl in PEB 7.5. The active fractions were pooled, concentrated using an Amicon device with a cut-off of 30 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and then further purified by size exclusion chromatography (Superdex 200™ 26/60-pg), equilibrated in PEB buffer pH 7.0. Before each bioassay, the solution of PMU was sterilized by passing through 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filters.

### 2.4. Crude extract and purification of PMU subunits

After bacterial growth, the culture was centrifuged at 5800  $\times g$  for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in buffer containing 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA. Cells were disrupted by sonication in ice bath, 15 cycles of 1 min at 20 kHz. Cellular debris were pelleted by centrifugation at 14,000  $\times g$  for 30 min. PmUrey was found

in the culture supernatant whereas the other two proteins were expressed as inclusion bodies, using the plasmid pET 15b. To solubilize PmUre $\beta$  and PmUre $\alpha$ , cellular debris were washed three times with Tris–HCl, containing 3 % (v/v) Triton X-100, followed by three washes with Tris–HCl without Triton X-100. After washing and centrifugation, the pellets were suspended in 6 M urea, and kept under agitation, overnight at 4 °C. After solubilizing proteins, urea was removed by dialysis and any precipitated material still present was removed by centrifugation at 14,000  $\times$  g for 20 min. After the protein refolding procedure, crude extracts of PmUre $\beta$  and PmUre $\alpha$  were obtained. The crude extracts were then subjected to an affinity chromatography step using StrepTactin resin (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) equilibrated in 100 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and elution was carried out by addition of 2.5 mM D-desthiobiotin to the eluent. Before each bioassay, a gel filtration step in Superose 6 10/300 column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was conducted to change the solvent to 50 mM Tris–HCl pH 7.5 buffer.

The PmUre $\beta$  cloned in pET23a and expressed in *E. coli* (Lemo21) the culture was centrifuged at 5800  $\times$  g for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 500 mM NaCl and 20 mM imidazol. The cells were disrupted by sonication and cellular debris were pelleted by centrifugation at 14,000  $\times$  g for 30 min. PmUre $\beta$  was found in the culture supernatant. This subunit, containing a His tag in the C-terminal portion of the protein were then subjected to an affinity chromatography using Chelating Sepharose resin (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) equilibrated in 50 mM Tris–HCl pH 7.5 buffer, 500 mM NaCl and 20 mM of imidazole. The column was washed with the same buffer containing 70 mM imidazole and then eluted with 500 mM of imidazole.

Before each bioassay, a dialysis was conducted to change the solvent to 10 mM Tris–HCl pH 7.5 buffer and 1 mM DTT. Solutions of PMU subunits were sterilized by passing through 0.22  $\mu$ m syringe filters.

## 2.5. Protein determination

The protein contents were determined by absorbance at 280 nm or by the Bradford method [24] using bovine serum albumin as standard.

## 2.6. SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed according to [25]. The material was diluted in sample buffer, heated to 95 °C for 5 min and applied in 12 or 15 % polyacrylamide gels. Native-PAGE was performed in 7.5 % polyacrylamide gels, without SDS and reducing agents, and without boiling the samples. The gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue or silver nitrate.

## 2.7. Urease assay and zymography

Urease activity was determined in 96 well plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in 100  $\mu$ L final reaction volume of 20 mM sodium phosphate pH 7.5, 150 mM NaCl containing 100 mM urea and the tested sample. The enzymatic reaction proceeded for 30 min at 37 °C and the color reaction was developed using the phenol-nitroprussiate method [26]. Zymography in native-PAGE gels was carried out by the nitroprusside-thiol reaction according to [27].

## 2.8. Platelet aggregation

Peripheral human blood of healthy volunteers was collected in presence of 0.313 % (w/v) sodium citrate. The blood samples were centrifuged at 400  $\times$  g for 10 min at 25 °C to obtain a platelet-rich plasma (PRP). All procedures regarding blood collection and handling were conducted in strict accordance with Brazilian legislation (Law no. 6.638/1979) and approved by the institutional Ethics Committees (UFRGS 721.217; PUCRS 14/00414).

### 2.8.1. Platelet aggregation assay by microscopy

PMU subunits were incubated with a platelet rich plasma (PRP) for 1 h at room temperature on a rocking platform. After centrifugation, the pelleted cells were fixed with 4 % v/v formaldehyde, and the aggregates were counted in a Neubauer chamber using an optic microscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA). An aggregate was defined as a cluster of five or more platelets grouped together. The methodology was based and adapted from [28].

## 2.9. Yeast proliferation assay

### 2.9.1. PMU and subunits

*Candida albicans* and *C. parapsilosis* (kindly provided by Dr. Valdirene Gomes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil) were grown for 48 h on Sabouraud agar (1 % peptone, 2 % glucose and 1.7 % agar-agar) at 28 °C. After growth, the cells were harvested, transferred to sterile saline (0.9 % NaCl), counted and 10<sup>4</sup> cells were placed on 96 wells plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), containing Sabouraud broth. After addition of tested proteins in concentration of 33 and 65  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> for PMU (molar concentrations of 120 and 140 nM respectively) and 22 and 65  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> for subunits (molar concentrations: PmUre $\gamma$ , 2 and 6  $\mu$ M; PmUre $\beta$ , 1.8, 2.25, 4.5, 5 and 9  $\mu$ M); PmUre $\alpha$ : 0.33 and 1  $\mu$ M, respectively), the yeasts were incubated 24 h at 28 °C. To assess cell viability, colony forming units (CFU) were determined after further incubation at 28 °C for 24 h in Sabouraud agar plates by the drop plate method [9].

## 2.10. Optical microscopy

*Candida albicans* were grown for 24 h on Sabouraud agar (1 % peptone, 2 % glucose and 1.7 % agar-agar) at 28 °C. After growth, the cells were resuspended in Sabouraud broth (1 % peptone, 2 % glucose), counted and 10<sup>4</sup> cells were placed on 96 wells flat bottomed plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and grown during 24 h at 28 °C. Then the cells were incubated with 9  $\mu$ M of PmUre $\beta$  and/or buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.5 buffer and 1 mM DTT) during 3 h at 28 °C. To evaluate yeast morphology and aggregation, 20  $\mu$ L of each sample were dropped on a Neubauer chamber, and examined under an optic microscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA). A yeast aggregate was defined as a cluster of five or more *C. albicans* grouped together.

## 2.11. Scanning electron microscope (SEM)

After the incubation period, the culture medium was centrifuged, washed with buffer, then the cells were fixed with glutaraldehyde (2.0 %) over seven days, after that the samples were washed for 30 min to remove the glutaraldehyde, followed by drying at room temperature. Controls consisted of yeast samples only, with no additions. Specimens were dehydrated in baths with increasing concentrations of acetone (50 %, 70 %, 90 % and 100 %) for 10 min each. Specimens were dried, metallized and stored in desiccator for subsequent observation by MEV (Zeiss Evo MA10 - German) [29].

## 2.12. Bioassays with insects

Fifth-instar nymphs of the kissing bug *R. prolixus* (a Chagas' disease vector) were kindly provided by Dr. Denise Feder (Universidade Federal Fluminense, Niteroi, RJ, Brazil). The insects were kept on a light:dark cycle of 12 h/12 h, temperature of 27  $\pm$  1 °C and 60 % relative humidity. The cotton stainer bug *D. peruvianus* were from a colony established in our laboratory, maintained at 23 °C and 75 % of relative humidity, with light-dark cycle of 16 h:8 h, and fed *ad libitum* on cotton seeds. *N. cinerea* cockroaches were from our own breeding colony, kept at 22–25 °C, with a light:dark cycle of 12 h/12 h, food (Birbo Premium Meat & Vegetables) and water *ad libitum*.

### 2.12.1. Interaction of PMU with *R. prolixus*' central nervous system (CNS)

PMU (63 nM) or bovine serum albumin (BSA, 63 nM) were incubated with Texas Red (0.5 mg/mL) during 1 h, at 4 °C, with continuous stirring [31]. The samples were then exhaustively dialyzed against 20 mM NaPB, pH 7.0 to remove any excess of free dye. Fifth-instar nymphs were anesthetized by cooling at –20 °C for 5 min, immobilized ventral side down and their body cavities were opened. The CNS, composed by brain and ganglia, was dissected. Incubation of the CNS was carried out with 63 nM solutions of Texas Red-labeled PMU or Texas Red-labeled BSA for 1 h at room temperature, followed by three washes with buffer (30 min each) at room temperature. The CNS were then placed in coverslips and visualized under an inverted microscope Eclipse TE2000-S (Nikon, Tokyo, Japan), equipped with an ORCA-ER-1394 Camera (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japan), and with Phylum 4.2.0 (Improvision, Lexington, MA, USA) as image acquisition software. The methodology was adapted from [31].

### 2.12.2. Nitric Oxide Synthase (NOS) assay in *N. cinerea*'s CNS homogenates

For these experiments, the CNS of adult cockroaches was dissected as described above and homogenized in 20 mM Tris–HCl (pH 7.4), 0.32 M sucrose, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 2 mM DTT and 10 % protease inhibitors (Sigma Chem. Co.). The homogenates were centrifuged (10,000 × g, 10 min, 4 °C) and the protein concentration was determined by the Bradford dye method. The homogenates were incubated at 4 °C for 1 h with 63 nM PMU or buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) as control. NOS activity was measured by incubating the samples at 37 °C in a reaction mixture containing 50 mM NaPB (pH 7.0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM L-arginine, 100 μM NADPH, 10 μM DTT, 0.1 μM catalase, 4 μM superoxide dismutase (SOD) and 5 μM oxyhemoglobin, as described in Galvani et al. 2015 [32]. Formation of methemoglobin was monitored at 401 nm. Negative controls were done carrying out the reaction in the presence of the NOS inhibitor, NG-methyl-L-arginine (L-NMMA, 1 mM).

### 2.12.3. In vitro hemocyte aggregation assay

Fifth-instar nymphs of *R. prolixus* were sterilized by immersion in ethanol 70 %, and their hemolymph was then collected from a cut in one leg with a micropipette. A hemolymph pool (7 insects) was mixed in a proportion of 1:1 (v/v) with *Rhodnius* saline as reported by [33]. The diluted hemolymph was incubated with PMU subunits (final concentrations of 2.2 μg mL<sup>-1</sup>) and incubated at room temperature for 1 h on a rocking platform. The aggregates were counted in a Neubauer chamber using an optic microscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA). A hemocyte aggregate was defined as five or more cells clamped together. In order to assess the relevance of divalent cations in the process of hemocyte aggregation, experiments were performed in presence of 100 μM EDTA, following the same protocol. The experiments were performed in quadruplicates.

### 2.12.4. Lethality assay by injection into *D. peruvianus*

*D. peruvianus* fifth-instar nymphs (~30 mg body weight each) were anesthetized by cooling at 4 °C for 5 min, immobilized onto a plate and injected into the hemocoel with 5 μL of solutions (163 μg mL<sup>-1</sup>) of PmUrey, PmUreβ or PmUreα in 50 mM Tris pH 7.5 (~27 ng of protein. mg<sup>-1</sup> insect body weight), with a Microliter 900 series syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). Controls received injections of buffer alone [30]. The experiments were performed in triplicates of groups of 5 insects. Mortality rates were recorded every 24 h for 3 days.

### 2.12.5. Lethality assay by oral administration to *D. peruvianus*

Fifth-instar nymphs of *D. peruvianus* were immobilized on a flat surface and their mouth apparatus were introduced into a glass capillary containing 5 μL of test solution, as described in [30]. The experimental groups were fed with the solutions (163 μg mL<sup>-1</sup>) of PmUrey, PmUreβ or PmUreα dissolved in 50 mM Tris–HCl pH 7.5, to give final doses of ~27 ng of

protein per mg of insect body weight. The controls fed with Tris–HCl buffer alone. The experiments were performed in triplicates using groups of 5 insects. Mortality rates were recorded every 24 h for 3 days.

### 2.13. Protein sequence analyzes

Protein sequences (for bacterial urease subunits, plant urease, and Jaburetox) were collected from NCBI - Protein database [34] and aligned using the Clustal Omega algorithm [35]. Internal amino acid sequence repeats related to genetic duplication were inspected with Swelpe [36]. Ancestral state reconstruction was carried out with MEGA7 [37], (<http://www.megasoftware.net/>) using the previously published urease phylogeny data as reference [38].

### 2.14. Molecular modeling and dynamics

The molecular model for the PmUreβ subunits was built with Modeller 9 [39] (<https://salilab.org/modeller/>) using the *Sporosarcina pasteurii* urease structure (PDB ID 4AC7 [40]) as template. Molecular dynamics simulations were carried out with the Gromacs 4 suite [41], (<http://www.gromacs.org/>) following protocols for native, physiological conditions [38], and for structural stability assessment [42].

## 3. Results

### 3.1. Recombinant PMU and its recombinant isolated subunits

A plasmid carrying the whole operon of PMU, consisting of *ureR*, *ureD*, *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureE*, *ureF* and *ureG* genes [43], was employed to produce the protein in *Escherichia coli*. In the absence of a tag to aid purification, conventional chromatographic steps were performed to obtain the enzymatically active recombinant PMU. The homogeneity of purified PMU was assessed by native-PAGE and zymograms confirming its ureolytic activity (Suppl. Fig. 1).

To obtain PMU's isolated subunits, pET15b plasmids encoding each protein were constructed. Recombinant PmUrey was found in the *E. coli* soluble fraction, while PmUreβ and PmUreα were produced as inclusion bodies. Alternatively, the PmUreβ subunit was cloned in *E. coli* strain Lemo21 (DE3) using pET23a vector, due the low solubility, then the PmUreβ subunit was found in the soluble fraction after cells lysis. No differences in the biological effects were observed between the two versions of PmUreβ. (Suppl. Fig. 2).

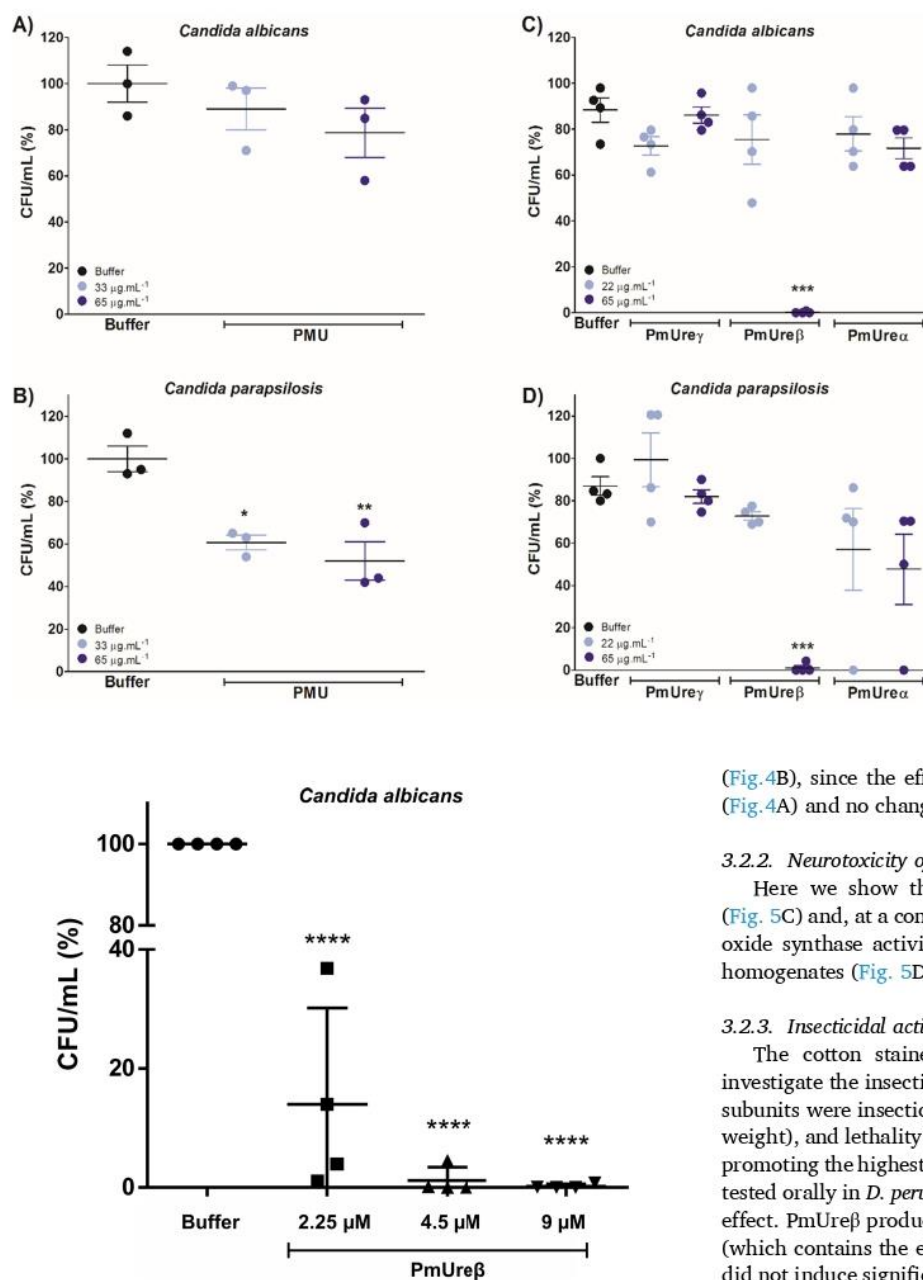
### 3.2. Moonlighting properties of PMU and of its isolated subunits

#### 3.2.1. Toxicity of PMU and isolated subunits against yeasts

The antifungal activity of PMU was tested on two *Candida* species. Incubation for 24 h with PMU at 33 and 65 μg mL<sup>-1</sup> (120 and 240 nM, respectively), led to a dose-dependent decrease of the proliferation rates of *C. parapsilosis* (Fig. 1B), but this inhibition was not observed to *C. albicans* (Fig. 1A). PMU's isolated subunits were tested on *C. albicans* and *C. parapsilosis* (Fig. 1C and D). Proliferation rates of *C. albicans* and *C. parapsilosis* decreased in the presence of 65 μg mL<sup>-1</sup> PmUreβ (corresponding to 5.3 μM), but not with the other subunits in the tested concentrations.

Among the subunits, PmUreβ proved to be more promising regarding antifungal activity. With this evidence, we decided to evaluate other concentrations (2.25 μM, 4.5 μM and 9 μM) of PmUreβ on *C. albicans* (Fig. 2). We decided to use *C. albicans* in this study because it is an attractive yeast model used frequently in antifungal studies [44]. We observed higher susceptibility of *C. albicans*, highlighting the concentrations of 4.5 μM and 9 μM of PmUreβ. The 2.25 μM concentration is less active, but still decreased the viability of *C. albicans*.

In order to understand how PmUreβ acts against *C. albicans*, we performed optical microscopy (magnification 200 X) after 3 h of treatment with the highest dose (9 μM) and observed the formation of yeast



**Fig. 2.** Dose-effect curve of antifungal effect of PmUre $\beta$  on *C. albicans*. Yeasts were incubated with PmUre $\beta$  (2.25, 4.5 and 9  $\mu$ M) for 24 h at 28 °C, then colony-forming units (CFU) were determined by the drop plate method. Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer and 1 mM DTT). Results are represented as the number of CFU.mL $^{-1}$  observed for the negative control (no treatment). Results are means  $\pm$  S.E.M, N = 4, \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.02$ ; \*\*\*  $p \leq 0.01$ .

aggregates in the samples treated with PmUre $\beta$  in comparison with the control (Fig. 3).

The formation of aggregates was confirmed by scanning electron microscopy (SEM) (Magnification 3000 X) (Fig. 4). When we prepared the samples to SEM; however, it was not possible to observe enough cells upon treatment with either 9  $\mu$ M and 4.5  $\mu$ M PmUre $\beta$ , only isolate and highly damaged cells. Then, we performed the treatment with 2.25  $\mu$ M and an altered phenotype of the treated yeasts, a flocculent extracellular material was observed by the electron microscopy, connecting cells. (Fig. 4C). It is important to highlight that the reducing agent (DTT), fundamental to protein stabilization, alone was not toxic to the cells

**Fig. 1.** Antifungal effect of *Proteus mirabilis* urease (PMU) and of its subunits on yeasts. Panels A-B. Recombinant PMU (33 and 65  $\mu$ g.mL $^{-1}$ , 120 and 240 nM respectively) was incubated for 24 h at 28 °C with the yeasts and then colony-forming units (CFU) were determined by the drop plate method. Panels C-D. Yeasts were incubated with PMU's subunits (22 and 65  $\mu$ g.mL $^{-1}$ ) for 24 h at 28 °C and then CFU were determined by the drop plate method. Molar concentrations: PmUre $\gamma$ , 2 and 6  $\mu$ M; PmUre $\beta$ , 1.8 and 5  $\mu$ M; PmUre $\alpha$ : 0.33 and 1  $\mu$ M, respectively. Buffer, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Results are represented as percentage of the number of CFU.mL $^{-1}$  observed for the negative control (no treatment). Results are means  $\pm$  S.E.M, N = 3, \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.02$ ; \*\*\*  $p \leq 0.01$ .

(Fig. 4B), since the effect was compared against yeast grown in saline (Fig. 4A) and no changes in yeast morphology were observed.

### 3.2.2. Neurotoxicity of PMU in insects

Here we show that PMU bound to *R. prolixus* nervous ganglia (Fig. 5C) and, at a concentration of 63 nM, it inhibited  $\sim$ 40 % the nitric oxide synthase activity of *N. cinerea*'s central nervous system (CNS) homogenates (Fig. 5D).

### 3.2.3. Insecticidal activity of PMU's subunits

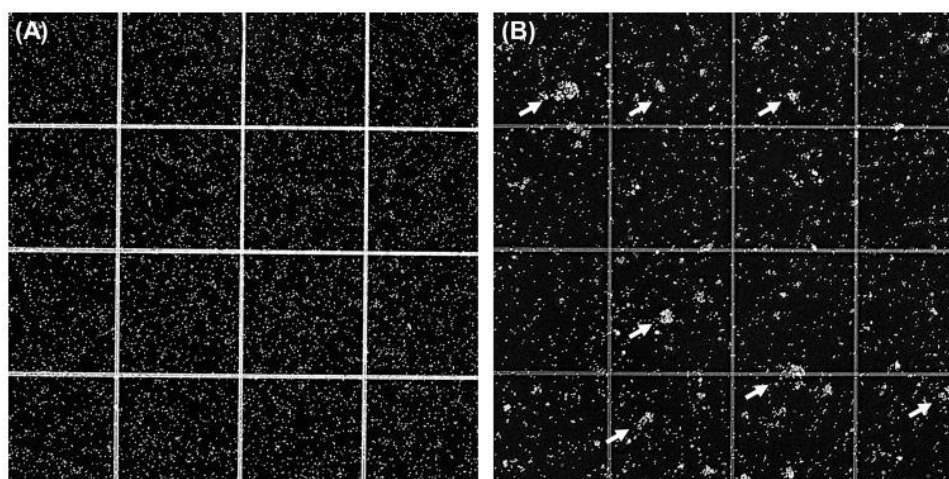
The cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* was employed to investigate the insecticidal effect of PMU's subunits (Fig. 6A-B). PMU's subunits were insecticidal upon injection (ca. 27 ng protein.mg $^{-1}$  body weight), and lethality was seen for PmUre $\alpha$  and PmUre $\gamma$ , with the latter promoting the highest mortality (Fig. 6A). The same dose of the subunits tested orally in *D. peruvianus* induced a dose- and time-dependent lethal effect. PmUre $\beta$  produced the highest lethality (90 %) whereas PmUre $\alpha$  (which contains the enzyme's active site) given orally to *D. peruvianus* did not induce significant mortality after the observed period (Fig. 6B).

JBU and Jaburetox were shown to modulate *R. prolixus* immunity by inducing hemocyte aggregation *in vitro*, through a cation-dependent mechanism [28,45]. In this work, we conducted a similar *in vitro* assay incubating hemocytes of the kissing bug *R. prolixus* with PMU's subunits and analyzing its capacity to induce aggregation, thus indicating the activation of a cell immune response. Fig. 6C shows that, when PMU's subunits were tested at 2.2  $\mu$ g.mL $^{-1}$  concentrations, PmUre $\beta$  (180 nM) and PmUre $\gamma$  (200 nM) induced a significant increment in the number of hemocyte aggregates when compared with the control incubated with vehicle. PmUre $\alpha$  (33 nM) had no effect on the aggregation response of *R. prolixus* hemocytes *in vitro*. In all tested cases, the incubation with the chelating agent EDTA reverted the aggregation process, evidencing that divalent cations are needed for this immune response (Fig. 6C).

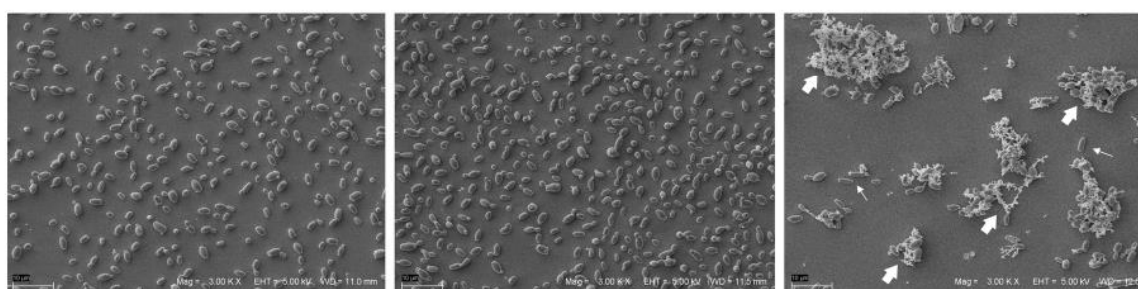
### 3.2.4. Aggregation of human platelets by PMU and its subunits

One of the effects that convey pro-inflammatory properties to ureases is their ability to activate blood platelets, coupled to exocytosis of their dense granules [46–48], and conversion of these cells into a pro-inflammatory phenotype [15]. PMU (17  $\mu$ g.mL $^{-1}$ , 63 nM) was found





**Fig. 3.** Optical microscopy of *C. albicans* after 3 h treatment with PmUre $\beta$ . A) saline; B) 9  $\mu$ M PmUre $\beta$ . Each sample were dropped on a Neubauer chamber, and examined under an optic microscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA). A yeast aggregate was defined as a cluster of five or more *C. albicans* grouped together. In B the *C. albicans* cell aggregation could be observed (arrows). Magnification 400 X.



**Fig. 4.** Scanning Electron Microscopy of *C. albicans* after 24 h assay in A) saline solution (NaCl 0.9 %); B) buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer and 1 mM DTT; C) 2.25  $\mu$ M of PmUre $\beta$  in the same buffer as in panel B. In A and B the *C. albicans* cells display a typical oval shape. In panel C the cells are more elongated (thin arrow) and are involved by a flocculent extracellular material disposed as a network (large arrow). Magnification 3000  $\times$ .

also able to induce aggregation of human platelets [22]. PMU-induced aggregation had a slower rate compared to the platelets' response to the physiological agonist ADP (20  $\mu$ M), and a similar extent of aggregation was eventually reached [22].

Microscopic observation allowed visualization of the small platelet aggregates formed in the presence of PMU's subunits (Fig. 7). PmUre $\beta$  produced significantly more and bigger platelet aggregates than did PmUre $\gamma$  or PmUre $\alpha$  (Fig. 7A and B). In contrast, our previous studies with isolated subunits of *H. pylori*'s urease indicated that only its B subunit, which is equivalent to PmUre $\alpha$ , is able to induce aggregation of platelets [15].

### 3.3. Topology of PmUre $\beta$ in PMU and molecular dynamics

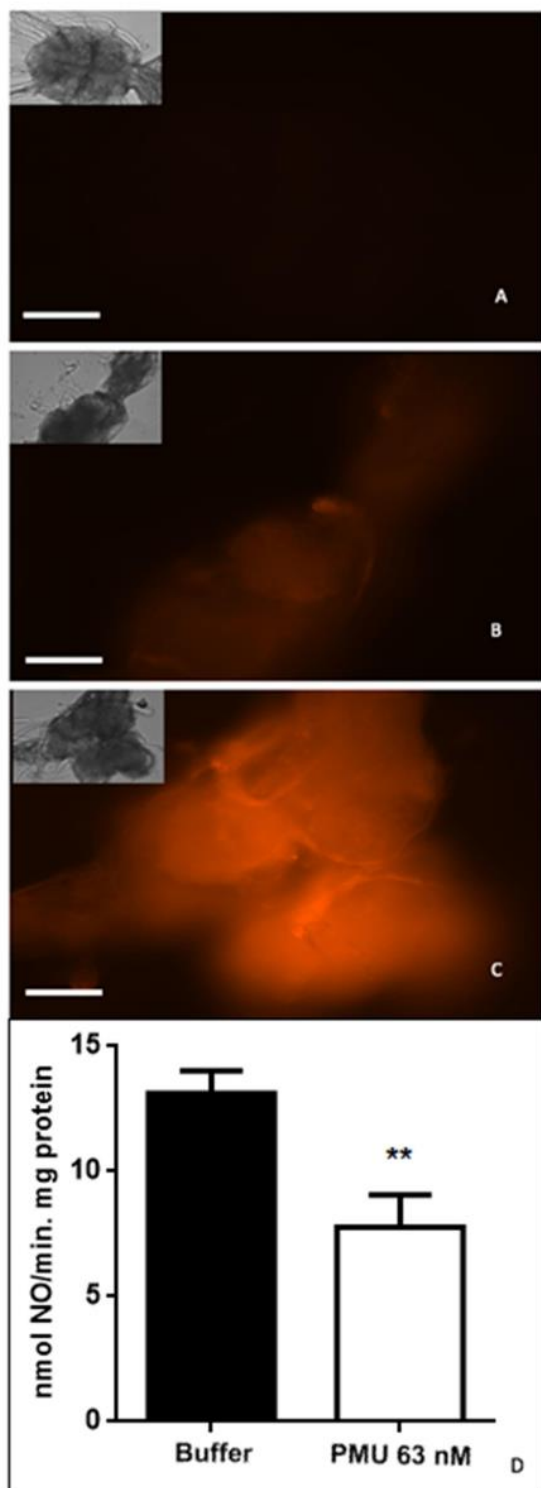
Fig. 8 shows the molecular model constructed for PMU. As depicted for Jaburetox in JBU [49], PmUre $\beta$  is also well exposed at the protein's surface. Molecular dynamics simulations (Fig. 8C to E) were performed to inspect PmUre $\beta$  for possible disordered behavior, as seen for Jaburetox [50] and Soyuretox [10]. Loss of secondary structure was observed after 100 ns under physiological conditions, with  $\sim$ 36 % of secondary structure elements remaining after the simulation (Fig. 8D). At a higher temperature (to evaluate structural stability), a complete loss of secondary structure elements was observed (Fig. 8E), supporting a tendency of structural disorder for PmUre $\beta$ .

### 3.4. Gene or segment duplication in ureases

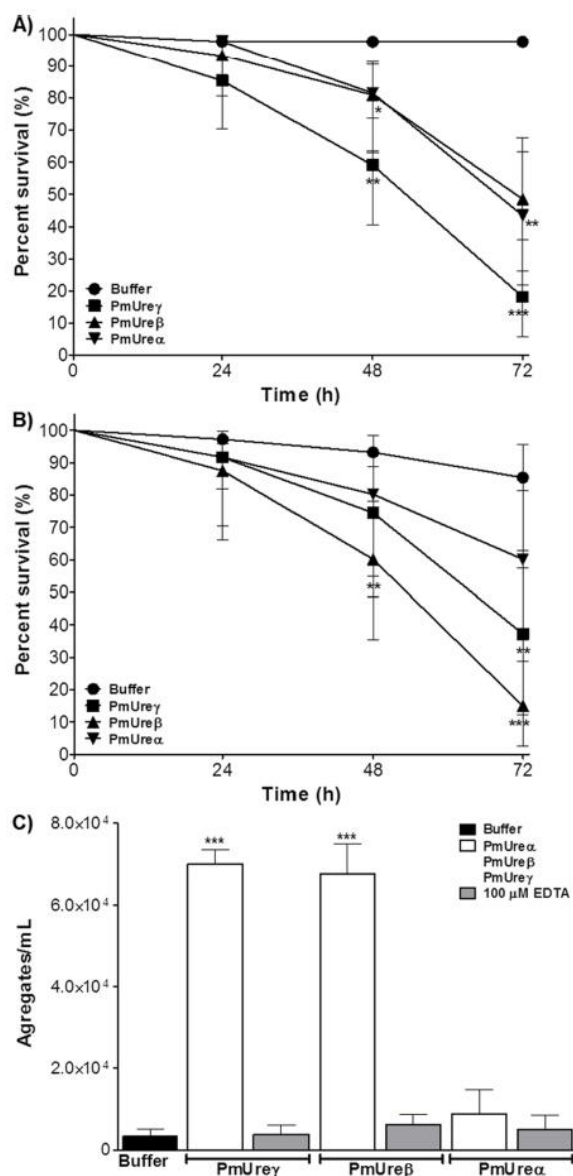
The fact that PmUre $\beta$  displayed all the activities tested here, paralleling the biological properties of Jaburetox, besides also exhibiting a platelet-aggregating effect, was quite unexpected. Jaburetox corresponds to positions 230–321 in the sequence of JBURE-II, the isoform of JBU that served as template to clone the peptide [8]. In an attempt to understand these results, PMU was inspected for internal sequence repeats, to detect possible duplications of functionally relevant regions. The amino acid sequence of PmUre $\gamma$ , PmUre $\beta$  and PmUre $\alpha$  are collinear to segments 1–100, 131–238, and 271–840 of the JBU molecule, respectively (Fig. 9). Two similar segments were identified in the region between PmUre $\beta$  and PmUre $\alpha$ , when comparing PMU and the prototypical JBU as reference (Fig. 9). One similarity pair encompasses a “jaburetox-like” segment in PmUre $\alpha$  (aligning to amino acid positions 268–316 in JBU) and its homologous in PmUre $\beta$  (177–229 in JBU), as shown in Fig. 9A. The second pair encompasses (Fig. 9A) a segment in PmUre $\alpha$  corresponding to 307–331 in JBU and its homologous in PmUre $\beta$  (186–210 in JBU). Alignment of these regions to their putative ancestor sequences revealed their evolutionary conservation (Fig. 9B).

## 4. Discussion

The well recognized role of PMU as a virulence factor of *P. mirabilis* has been so far exclusively attributed to its enzyme activity. Here our

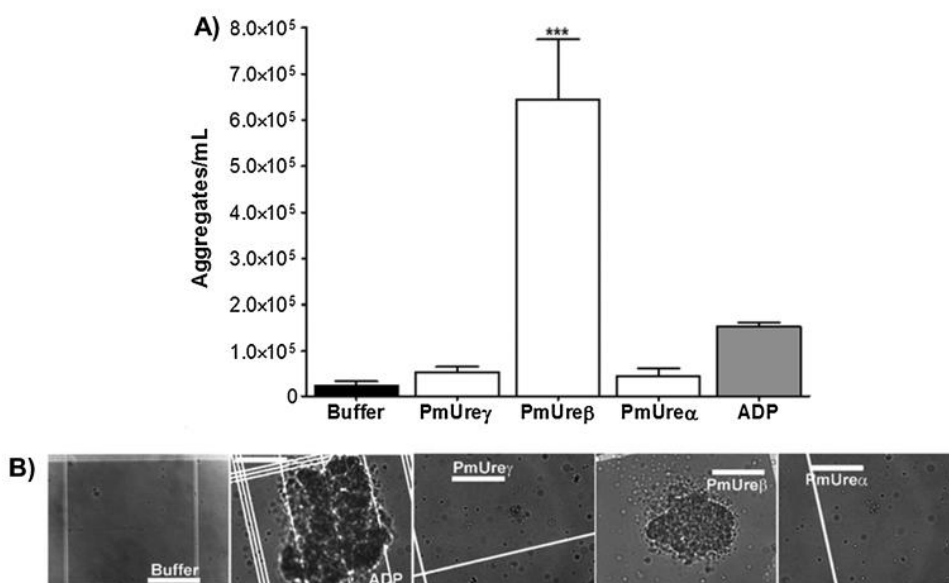


**Fig. 5.** Neurotoxicity of *Proteus mirabilis* urease (PMU) to insects. Panels A, B and C. Binding of PMU to central nervous system (CNS) of *R. prolixus*. Dissected CNS were incubated for 1 h with phosphate buffer saline (PBS) (A), Texas Red-labeled bovine serum albumin (BSA), 63 nM (B) or Texas Red-labeled PMU, 63 nM (C) and analyzed by fluorescence microscopy. Scale-bars: 200 μm. Insets show the same fields under bright field microscopy. The pictures show representative experiments of at least three independent assays. Panel D. Inhibition by PMU of nitric oxide synthase activity of *N. cinerea*'s CNS. Homogenates were incubated with 63 nM PMU or buffer (control) for 1 h, on ice, and then nitric oxide synthase (NOS) activity was determined using L-arginine as substrate. The results are expressed as means ± S.E.M, N = 10, \*\* p < 0.0032.

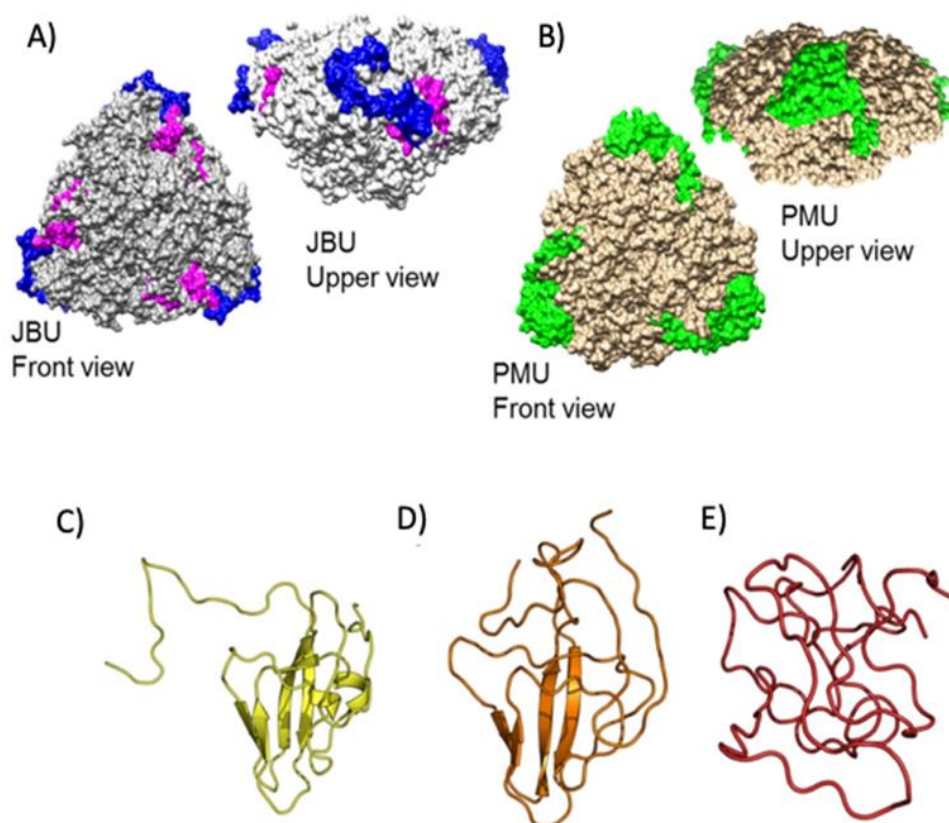


**Fig. 6.** Entomotoxicity of the isolated subunits of *P. mirabilis* urease (PMU). Panel A. Survival rates of *D. peruvianus* after hemocoel injection of 5 μL buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5; negative control) or 5 μL solutions of PMU's subunits, to give doses of 0.27 ng of per mg of insect body weight. Results are means ± S. E.M, N = 3. \*\* p ≤ 0.02; \*\*\* p ≤ 0.01. Panel B. Survival rates of *D. peruvianus* fed on 5 μL buffer or 5 μL solutions of PMU's subunits, to give doses of 0.27 ng of per mg of insect body weight. Results are means ± S.E.M, N = 3. \*\* p ≤ 0.02; \*\*\* p ≤ 0.01. Panel C. *R. prolixus* hemocyte aggregation induced by PMU's subunits. Open bars indicate the number of hemocytes aggregates formed *in vitro* after 1 h incubation of insect hemolymph with PMU's subunits at 2.2 μg. mL<sup>-1</sup> (PmUrey: 200 nM, PmUreyβ: 180 nM, PmUreyα: 33 nM) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Hatched bars show the number of aggregates formed when 100 μM EDTA was added to the solutions of PMU's subunits. Control (black bar) hemocyte aggregation was carried out in buffer alone.

data revealed that PMU is a true moonlighting protein that carries several other biological properties unrelated to ammonia production. Particularly, the exocytosis-inducing effect that underlies the aggregation response of platelets to ureases [4], observed here with nanomolar doses of PMU, and which correlates to the pro-inflammatory activity of these proteins [15,51,52], could be relevant in the context of the diseases caused by *P. mirabilis*.



**Fig. 7.** Aggregation of human platelets induced by *P. mirabilis* urease (PMU) and its isolated subunits. The reaction started by addition of PMU's subunits or ADP to a platelet-rich plasma suspension (PRP) and the aggregation response was monitored. Panel A. PRP aliquots were incubated with PMU's subunits, buffer or ADP for 1 h on a rocking platform, then the samples were centrifuged, the pellets were fixed with formaldehyde and the number of aggregates was counted in a Neubauer chamber. PmUre $\gamma$  (9.8  $\mu$ M), PmUre $\beta$  (8.8  $\mu$ M) and PmUre $\alpha$  (1.6  $\mu$ M). Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Panel B. Microscopic view of aggregates (defined as a cluster of 5 or more cells) as formed in the conditions described in panel B. Bar: 400  $\mu$ m. Results are mean  $\pm$  S.E.M, N=3, \*\*\*  $p \leq 0.01$ .

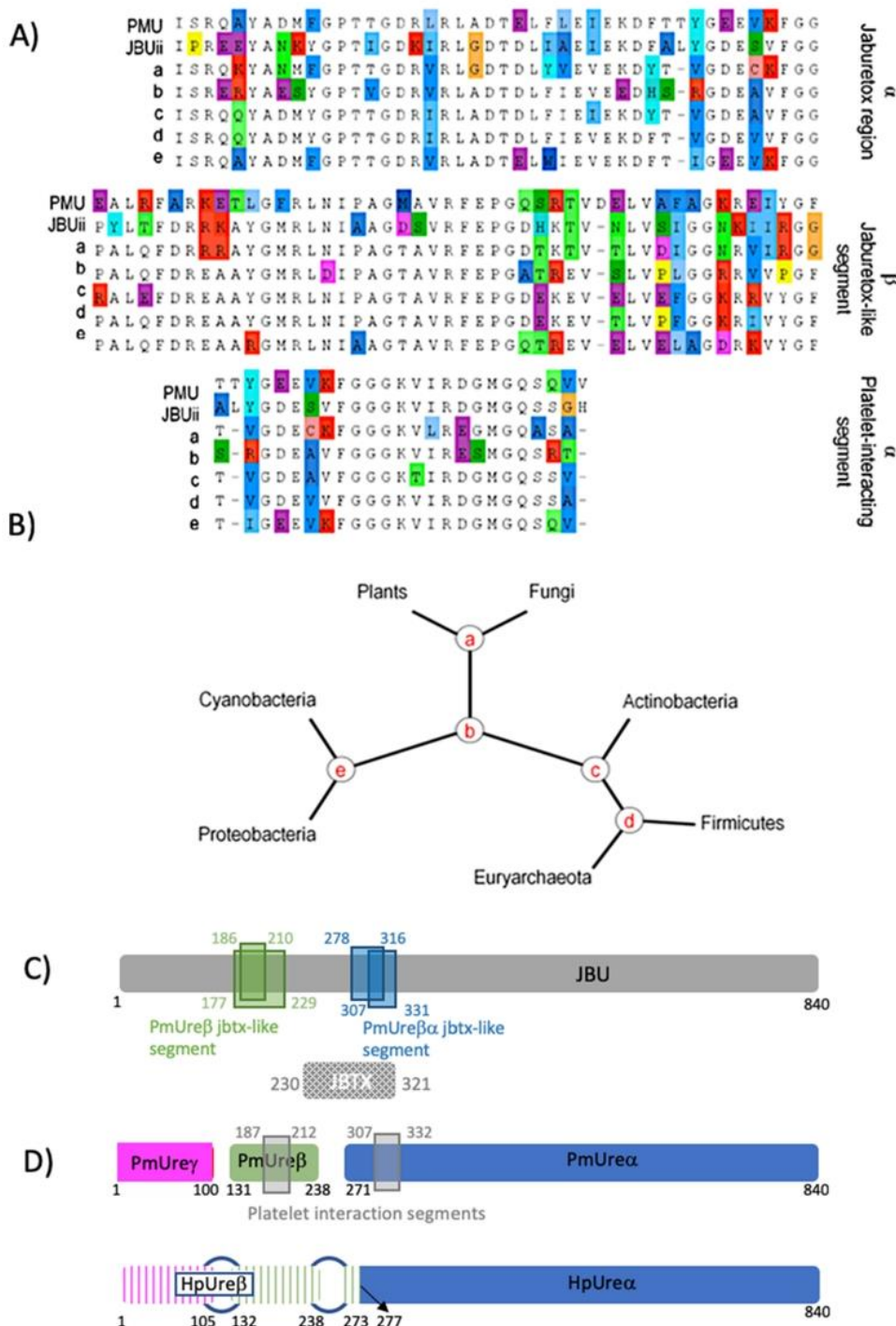


**Fig. 8.** Topology of PmUre $\beta$  in *Proteus mirabilis* urease (PMU) and dynamics. Panels A and B. Trimeric forms of *Canavalia ensiformis* urease (JBU) (PDB 3LA4) and PMU (modeled), in front (left) and side (right) views. In panel A, jaburetox's N-terminal half is colored in blue and its C-terminal half in pink. In panel B, PmUre $\beta$  is depicted in green. Panels C, D and E. Conformations of PmUre $\beta$  and molecular dynamics simulations. In panel C, native PmUre $\beta$  (modeled); panel D, PmUre $\beta$  after 100 ns under normal conditions (310 K); panel E, PmUre $\beta$  after 100 ns under protein-disturbing conditions (498 K).

We first reported the non-enzymatic antifungal activity of ureases studying the effects of Canatoxin on filamentous phytopathogenic fungi [53], later followed by observation of fungitoxic effects of ureases from soybean and cotton seeds, and of *H. pylori*'s urease [54]. Postal and co-authors in 2012 described the fungitoxic effect of JBU and Jaburetox on yeasts [9]. As observed here for PMU, the protein inhibited *C. parapsilosis* proliferation in a similar concentration range as reported for plant ureases [4]. Interestingly, reports have shown that, when in the presence of *P. mirabilis*, there is a marked inhibition

of biofilm formation by *C. albicans* [55] that could be due to PMU production. In our study we did not observe the inhibition of *C. albicans* growth by the holoprotein, in these tested concentrations. Biofilm studies will be conducted by our group with biofilm-producing *C. albicans* in order to confirm this hypothesis.

Concerning the subunits, PmUre $\beta$  inhibited proliferation of the yeasts, thus proving that PMU's fungitoxic effect does not require ureolysis. Since a region equivalent to Jaburetox is absent in bacterial ureases, our data confirmed the existence of more than one fungitoxic domain in



**Fig. 9.** Comparison of duplicated segments among ureases and their putative ancestors. Panel A. Alignments of “jaburetox-like” sequences in *C. ensiformis* JBURE-II urease (JBUii), PMU (*Proteus mirabilis* urease), and the most likely ancestor sequences, indicated as “a” to “e”, for the nodes in the simplified phylogenetic tree shown in panel B (JBUii: ACL14297.1; PMU: WP\_124740772.1, WP\_109880188.1, WP\_020945159.1; a-e: inferred in this study). Colors highlight differences from major consensus rule. Panels C and D. Schematic representation of *C. ensiformis* major urease (JBU), *P. mirabilis* (PMU) and *Helicobacter pylori* (HPU) ureases. In C) JBU single subunit (840 amino acids) is represented as a gray bar and jaburetox appears below in hatched gray. Duplications of jaburetox-like sequence in JBU and PMU (alignments shown in A) are represented as green and blue boxes, with numbers indicating amino acid positions. In D) PMU and its three subunits: PmUreγ (red), PmUreβ (green) and PmUreα (blue). Gray boxes in PMU identify its putative platelet-interacting segments (alignments shown in A). The numbers refer to the amino acid positions in JBU sequence. Below, HPU is shown with its UreA chain (HpUreβ) (striped red or green bars) and its UreB chain (HpUreα) (blue). Alignments of all sequences are presented in Suppl. Fig. 3.

ureases, as previously suggested by our group [4,9]. Unlike the effects observed to Jaburetox and Soyuretox, which induce the pseudohyphae growth [4,10], PmUreβ induced aggregation in *C. albicans* (Fig. 3B). In addition, the flocculent extracellular materials that were observed in the SEM (Fig. 4C), was already demonstrated in *C. parapsilosis* treated with baicalein in combination with fluconazole [56]. Regarding inhibitory concentration on *C. albicans*, PmUreβ proved to be effective at 2.25 μM (Fig. 2), comparable to the doses of Jaburetox and Soyuretox, 9 μM and 5 μM, respectively, needed to inhibit the growth of *C. albicans* [11]. Aggregation in *C. albicans* is an indicative of cell membrane or cell wall damage [57] providing an explanation of PmUreβ antifungal effect. The ability of Jaburetox to interact with fungal external cell membrane

and/or cell wall was previously demonstrated [31]. Besides this, an initial study showed that Soyuretox was able to induce reactive oxygen species in *C. albicans* [10] although more studies are necessary to confirm it. Additional studies are under way aiming to understand the PmUreβ’s mode of action against yeasts.

Our previous work on the entomotoxic properties of ureases focused mostly the single-chained plant proteins and the insecticidal effect was ascribed mainly to their “Jaburetox” moiety. However, tri-chained bacterial ureases, which lack a “jaburetox-like” sequence, can also be insecticidal, as reported for entomopathogenic *Photographus* spp. [58] and *Yersinia pseudotuberculosis* [59] enzymes, implying that ureases contain more than one insecticidal domain.

Here, the neurotoxic effect of PMU in insects was established by its binding to *R. prolixus*' CNS tissues and by the pronounced inhibition of nitric oxide synthase activity of *N. cinerea*'s brain homogenates (Fig. 5). Similar bioassays have previously demonstrated the neurotoxic effects of Jaburetox in triatomine insects [32,60], and in *N. cinerea* cockroaches [31]. Furthermore, it has been shown that JBU affects insect behavior, heart frequency and muscle contraction [61], and interferes on the release of neurotransmitters by modulating insect calcium channels [62]. The evolutionary conservation of the nervous systems of invertebrates and vertebrates is reflected in the fact that many neurotoxins, ureases included, are active on both animal groups [63,64]. Mechanisms similar to those triggered by ureases in the nervous system of insects probably underlie the neurotoxicity and convulsant effect of Canatoxin [47,65] or that of *H. pylori* urease in rodents [66]. Thus, a potential contribution of PMU to neurological conditions such as neonatal meningitis [67] or adult meningitis following neurosurgery [68,69] deserves investigation. We have shown that ureases are neurotoxic to insects and impair their immune system, and similar effects were also observed for the urease-derived peptides Jaburetox and Soyuretox [1,4]. JBU and Jaburetox were found to bind to nervous tissues of the kissing bugs *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* [32] and of the cockroach *Nauphoeta cinerea* [31], accompanied by a pronounced inhibition of nitric oxide synthase activity in brain homogenates of these insects [32,60].

Studies on the structure versus entomotoxic activity were performed by testing PMU's subunits on *D. peruvianus*, a hemipteran susceptible to both, JBU and Jaburetox. All subunits were lethal to the insects, either injected or given orally, confirming the ureolysis-independent entomotoxicity of PMU (Fig. 5). PmUrey was more toxic when injected, whereas PmUre $\beta$  administered orally promoted the highest toxicity. Besides neurotoxicity, JBU and Jaburetox also interfere on the immune response of *R. prolixus* and induce aggregation of the insect's hemocytes [1,4]. Hemocytes are granulocytes that combine biological properties of several types of mammalian leukocytes as well as of platelets [70]. Here, PmUrey and PmUre $\beta$ , but not PmUre $\alpha$ , induced a cation-dependent aggregation of *R. prolixus* hemocytes thus ascribing an immunomodulatory component to PMU's entomotoxicity.

Plant and bacterial ureases, regardless of their enzymatic activity, promote platelet activation in the nanomolar range, by triggering an eicosanoid signaling cascade [4]. A platelet-activating effect was reported for liposaccharides extracted from *P. mirabilis* [71]. As the purity of the liposaccharide preparations was not described, it is not possible to exclude the presence of low amounts of PMU in that samples. Our group demonstrated that the recombinant PMU induced aggregation of human platelets in nanomolar concentrations, following a slower rate when compared to that prompted by the platelet agonist ADP (at a 317-fold greater dose) [22]. We described earlier that aggregation induced by HPU in rabbit [46] or human platelets [15] also develops at a slower rate, suggesting that this may be a trend of platelets' response to microbial ureases, contrasting to the much faster rate of Canatoxin- or JBU-induced effects [48]. Testing the subunits demonstrated that only PmUre $\beta$  induced aggregation of human platelets (Fig. 7B and C). PmUrey did not interact at all with platelets. The maximal molar concentration of PmUre $\alpha$  that could be tested was 5.5-fold lower than that of PmUre $\beta$ , what may explain the lack of platelet aggregating effect. These results contrast to the fact that both subunits of HPU interacted with human platelets [12], but only HpUre $\alpha$  (or B subunit), which is collinear to PmUre $\alpha$ , showed platelet-aggregating activity [12]. The sequence in HPU that corresponds to PmUre $\beta$  is part of its A subunit, where it appears fused to the sequence corresponding the PmUrey (Fig. 9). A plausible explanation for this observation is that the region corresponding to PmUrey poses some sort of steric hindrance that blocks a productive interaction of  $\beta$  domain in HPU's A subunit with platelets, thus abrogating an aggregation response. Nevertheless, HPU's A subunit produced other effects on platelets [15]. Altogether, these findings indicate that PMU is able

to activate platelets (as do all other ureases we have tested so far) and this effect involves PmUre $\beta$ . Finally, the ability of ureases to insert themselves into lipid membranes, leading to formation of ion channels and to alterations of the membrane's permeability [49], could be what underlies their effects on different cell types.

The fact that PmUre $\beta$  displayed all the biological activities tested here was somewhat surprising. Apart from the catalytic region in the  $\alpha$  subunit, no functions are yet clearly ascribed to the other bacterial enzyme's subunits. The urease's  $\beta$  domain has so far only been proposed to take part in the enzyme's activation process [72,73]. Since the biological effects of PmUre $\beta$  seen here overlapped the toxicity reported for Jaburetox, similarities between them were examined. Both, PmUre $\beta$  (this work) and Jaburetox [49] are located at the surface of the protein (Fig. 8), and therefore they could putatively "drive" many of the urease's interactions with other molecules and cells. Jaburetox is an intrinsically disordered peptide, a feature that may be at the basis of its toxicity [30, 31,50]. Here, simulations of PmUre $\beta$  indicated loss of secondary structure that, accelerated under fold-disturbing conditions, yielded an unstructured molecule (Fig. 8). Thus, PmUre $\beta$  displays a Jaburetox-like behavior both in terms of biological activities and of physicochemical behavior. Although no obvious homology could be found by direct comparison of the amino acid sequences, a tool able to detect intragenic duplications on three levels revealed, in PmUre $\beta$ , a homologue of Jaburetox's sequence (Fig. 9A and C). Considering that, in contrast to Jaburetox, PmUre $\beta$  also activated platelets, additional regions of duplication between the  $\beta$  and  $\alpha$  domains of JBU were inspected, revealing a second similarity site (Fig. 9A and C).

## 5. Conclusion

Considering the moonlighting profile of ureases' biological properties, here demonstrated also for PMU, we believe that the relevance of this protein as a virulence factor has been so far underappreciated. Its non-enzymatic properties suggest that PMU could probably be involved in many more features of *P. mirabilis* pathogenesis than merely providing nitrogen and shelter (by forming urinary stones) for the bacteria.

Ureases are unnecessarily large for the enzyme function they perform [38]. The need for the additional subunits (considering the ancestral dihydroorotase) is unknown, and acquisition of toxicity has been proposed as a trend [74]. Evidence of duplication within ureases genes have not been reported so far. Our current observation of duplications of "toxic" elements across urease subunits gives support to this proposition. Considering the evolutionary age of ureases and observing the conservation of a Jaburetox-like region in the  $\beta$  domain of the proteins may even point to its origin there, and the Jaburetox moiety in single-chained ureases could be labeled as a copy of an "original" toxic segment in the  $\beta$  subunit of tri-chained bacterial ureases (Fig. 6B). Confirmation that these enzymes may be accumulating various types of toxicities to become multifunctional toxins raises the question: was urease originally a toxin, then later co-opted for enzymatic activity [4]? While this question remains unanswered, PMU is clearly pointing towards toxicity as a driving force in the evolution of these enzymes.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

The authors thank Daniel Sulis for technical assistance and Dr. Barbara Zambelli (University of Bologna, Italy) for helping with plasmid construction of the *P. mirabilis* structural subunits. VB thanks Professor Stefano Ciurli for hosting her at the University of Bologna, Italy, and for the productive scientific support. This project was financed by the

Brazilian agencies CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance code 001; Science Without Borders Program for Visiting Researcher – PVE 054/2012, and Edital Toxinologia – grant 63/2010); CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Edital Universal, grants 44.6052/2014-1 and 47.5908/2012-0), and FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), Ed. PPSUS, grant 17/2551-0001451-0. VB received a split PhD fellowship (PVE 054/2012) from CAPES, for studies at the University of Bologna, Italy. LLF had a post-doctoral fellowship from the Young Talent Science Without Borders Program, CNPq grant 40.0189/2014-3. VB, FCL, MVCG, AHSM, AFU, RL-B were recipients of CAPES postgraduate fellowships.

## Appendix A. Supplementary data

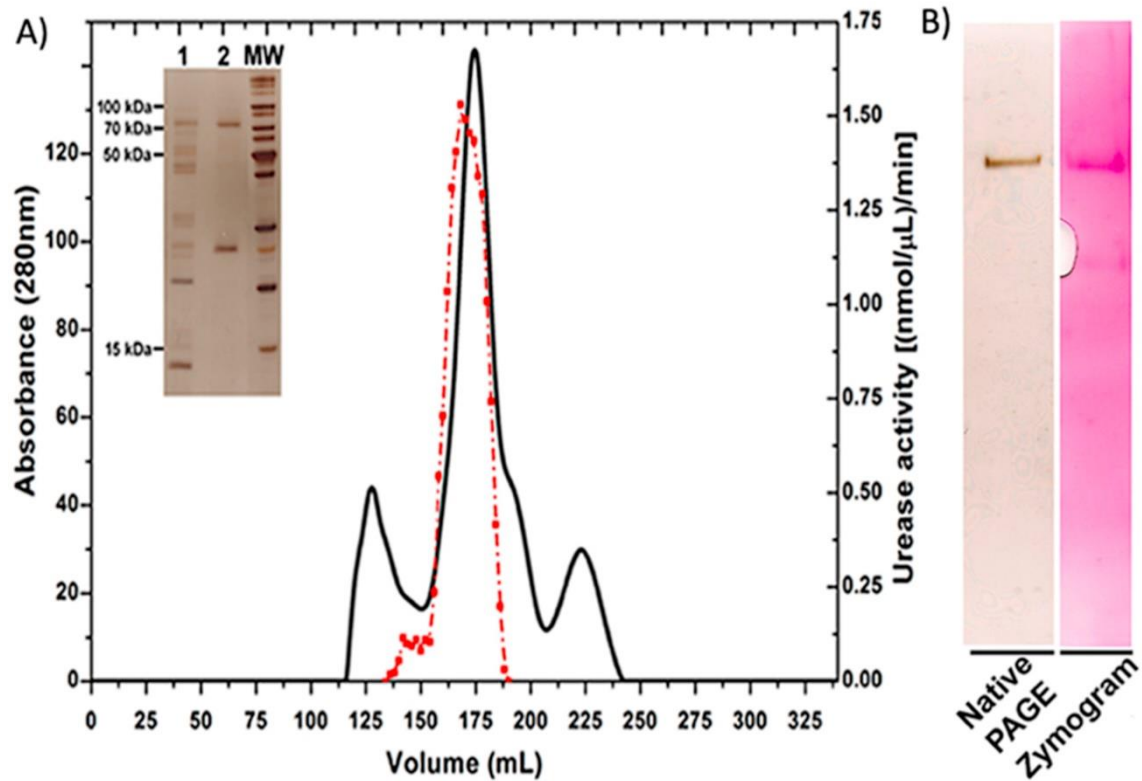
Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.023>.

## References

- [1] K. Kappaun, A.R. Piovesan, C.R. Carlini, R. Ligabue-Braun, Ureasases: historical aspects, catalytic and non-catalytic properties—a review, *J. Adv. Res.* (2018) 3–17.
- [2] M.J. Maroney, S. Ciurli, Nonredox nickel enzymes, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4206–4228.
- [3] H.L. Mobley, R.P. Hausinger, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol. Rev.* 53 (1989) 85–108.
- [4] C.R. Carlini, R. Ligabue-Braun, Ureasases as multifunctional toxic proteins: a review, *Toxicol.* 110 (2016) 90–109, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2015.11.020>.
- [5] B. Krajewska, I. Ureasases, Functional, catalytic and kinetic properties: a review, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59 (2009) 9–21, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>.
- [6] P.A. Karplus, M.A. Pearson, R.P. Hausinger, 70 years of crystalline urease: what have we learned? *Acc. Chem. Res.* 30 (1997) 330–337.
- [7] B. Zambelli, F. Musiani, S. Benini, S. Ciurli, Chemistry of Ni<sup>2+</sup> in urease: sensing, trafficking, and catalysis, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 520–530.
- [8] F. Mulinari, F. Staniscuaski, L.R. Bertholdo-Vargas, M. Postal, O.B. Oliveira-Neto, D.J. Rigden, M.F. Grossi-de-Sá, C.R. Carlini, Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*, *Peptides* 28 (2007) 2042–2050, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.009>.
- [9] M. Postal, A.H.S. Martinelli, A.B. Becker-Ritt, R. Ligabue-Braun, D.R. Demartini, S.F.F. Ribeiro, G. Pasquali, V.M. Gomes, C.R. Carlini, Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides, *Peptides* 38 (2012) 22–32, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>.
- [10] K. Kappaun, A.H.S. Martinelli, V. Broll, B. Zambelli, F.C. Lopes, R. Ligabue-Braun, L.L. Fruttero, N.R. Moyetta, C.D. Bonan, C.R. Carlini, S. Ciurli, Soyuretox, an intrinsically disordered polypeptide derived from soybean (*Glycine max*) ubiquitous urease with potential use as a biopesticide, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–20, <https://doi.org/10.3390/ijms20215401>.
- [11] M.V.C. Grahl, F.C. Lopes, A.H.S. Martinelli, C.R. Carlini, L.L. Fruttero, Structure-function insights of Jaburetox and soyuretox: novel intrinsically disordered polypeptides derived from plant ureases, *Molecules* 25 (2020) 1–24, 5338.
- [12] A.C. Costa, C. Figueiredo, E. Touati, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 14 (2009) 15–20.
- [13] J.-Y. Zhang, T. Liu, H. Guo, X.-F. Liu, Y. Zhuang, S. Yu, L. Chen, C. Wu, Z. Zhao, B. Tang, et al., Induction of a Th17 cell response by *Helicobacter pylori* Urease subunit B, *Immunobiology* 216 (2011) 803–810.
- [14] J.H. Lee, S.H. Jun, J.-M. Kim, S.C. Baik, J.C. Lee, Morphological changes in human gastric epithelial cells induced by nuclear targeting of *Helicobacter pylori* urease subunit A, *J. Microbiol.* 53 (2015) 406–414.
- [15] A. Scopel-Guerra, D. Olivera-Severo, F. Staniscuaski, A.F. Uberti, N. Callai-Silva, N. Jaeger, B.N. Porto, C.R. Carlini, The impact of *Helicobacter pylori* urease upon platelets and consequent contributions to inflammation, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–13, 2447.
- [16] C.E. Armbruster, H.L.T. Mobley, M.M. Pearson, Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection, *EcoSal Plus* 8 (2018) 1–123.
- [17] H.L.T. Mobley, *Proteus mirabilis* overview. *Proteus Mirabilis*, Springer, 2019, pp. 1–4.
- [18] B.D. Jones, C.V. Lockatell, D.E. Johnson, J.W. Warren, H.L. Mobley, Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection, *Infect. Immun.* 58 (1990) 1120–1123.
- [19] J.N. Schaffer, A.N. Norsworthy, T.-T. Sun, M.M. Pearson, *Proteus mirabilis* fimbriae and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 4494–4499.
- [20] T. Alelign, B. Petros, Kidney stone disease: an update on current concepts, *Adv. Urol.* (2018) (2018) 1–12.
- [21] M. Miraula, S. Ciurli, B. Zambelli, Intrinsic disorder and metal binding in UreG proteins from *Archae* hyperthermophiles: GTPase enzymes involved in the activation of Ni (II) dependent urease, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 20 (2015) 739–755.
- [22] M.V.C. Grahl, A.F. Uberti, V. Broll, P. Baccaico-Caruso, E.F. Meirelles, C.R. Carlini, *Proteus mirabilis* urease: unsuspected non-enzymatic properties relevant to pathogenicity, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–17, 7205.
- [23] L.T. Hu, P.A. Foxall, R. Russell, H.L. Mobley, Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB, *Infect. Immun.* 60 (1992) 2657–2666.
- [24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [25] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [26] M.W. Weatherburn, Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem.* 39 (1967) 971–974.
- [27] V. Sharma, R. Chaudhary, J.M. Khurana, K. Muralidhar, In-gel detection of urease activity by nitroprusside–thiol reaction, *Phytochem. Anal. An Int. J. Plant Chem. Biochem. Tech.* 19 (2008) 99–103.
- [28] L.L. Fruttero, N.R. Moyetta, A.F. Uberti, M.V.C. Grahl, F.C. Lopes, V. Broll, D. Feder, C.R. Carlini, Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*, *Parasit. Vectors* 9 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1710-3>.
- [29] S. Trentin, R. Brandt, K. Rigon, A. Gomes, M. Vanusa, M. Tereza, I. Jacob, R. Baumvol, A. José, Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 327–335, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>.
- [30] A.H.S. Martinelli, K. Kappaun, R. Ligabue-Braun, M.S. Defferrari, A.R. Piovesan, F. Staniscuaski, D.R. Demartini, C.A. Dal Belo, C.G.M. Almeida, C. Follmer, H. Verli, C.R. Carlini, G. Pasquali, Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840 (2014) 935–944, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.010>.
- [31] V. Broll, A.H.S. Martinelli, F.C. Lopes, L.L. Fruttero, B. Zambelli, E. Salladini, O. Dobrovolska, S. Ciurli, C.R. Carlini, Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 159 (2017) 849–860, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.053>.
- [32] G.L. Galvani, L.L. Fruttero, M.F. Coronel, S. Nowicki, D.R. Demartini, M. S. Defferrari, M. Postal, L.E. Canavoso, C.R. Carlini, B.P. Settembrini, Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: heteroptera), *BBA - Gen. Subj.* 1850 (2015) 255–262, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.008>.
- [33] N.J. Lane, R.A. Leslie, L.S. Swales, Insect peripheral nerves: accessibility of neurohaemal regions to lanthanum, *J. Cell. Sci.* 18 (1975) 179–197.
- [34] E.W. Sayers, J. Beck, J.R. Brister, E.E. Bolton, K. Canese, D.C. Comeau, K. Funk, A. Ketter, S. Kim, A. Kimchi, et al., Database resources of the national center for biotechnology information, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) D9.
- [35] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, et al., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539.
- [36] A.-L. Abraham, E.P.C. Rocha, J. Pothier, Swelpe: a detector of internal repeats in sequences and structures, *Bioinformatics* 24 (2008) 1536–1537.
- [37] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Nuyk, K. Tamura, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.* 35 (2018) 1547–1549.
- [38] R. Ligabue-Braun, F.C. Andreis, H. Verli, C.R. Carlini, 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases, *Naturwissenschaften* 100 (2013) 459–467, <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1045-2>.
- [39] N. Eswar, B. Webb, M.A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali, Comparative protein structure modeling using Modeller, *Curr. Protoc. Bioinforma.* (2006) 5–6.
- [40] S. Benini, P. Kosikowska, M. Cianci, L. Mazzei, A.G. Vara, E. Berlicki, S. Ciurli, The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 18 (2013) 391–399.
- [41] B. Hess, C. Kutzner, D. Van Der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435–447.
- [42] G. Settanni, A.R. Fersht, High temperature unfolding simulations of the TRPZ1 peptide, *Biophys. J.* 94 (2008) 4444–4453.
- [43] M.D. Island, H.L. Mobley, *Proteus mirabilis* urease: operon fusion and linker insertion analysis of ure gene organization, regulation, and function, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 5653–5660.
- [44] M.A. Kabir, M.A. Hussain, Z. Ahmad, *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens, *Int. Sch. Res. Not.* 2012 (2012) 1–15.
- [45] M.S. Defferrari, D.H. Lee, C.L. Fernandes, I. Orchard, C.R. Carlini, A phospholipase A2 gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840 (2014) 396–405, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.016>.
- [46] G.E. Wassermann, D. Olivera-Severo, A.F. Uberti, C.R. Carlini, *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoygenase-mediated pathway, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 2025–2034, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00901.x>.
- [47] C.R. Carlini, J.A. Guimarães, J.M. Ribeiro, Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoygenase pathway, *Br. J. Pharmacol.* 84 (1985) 551–560.

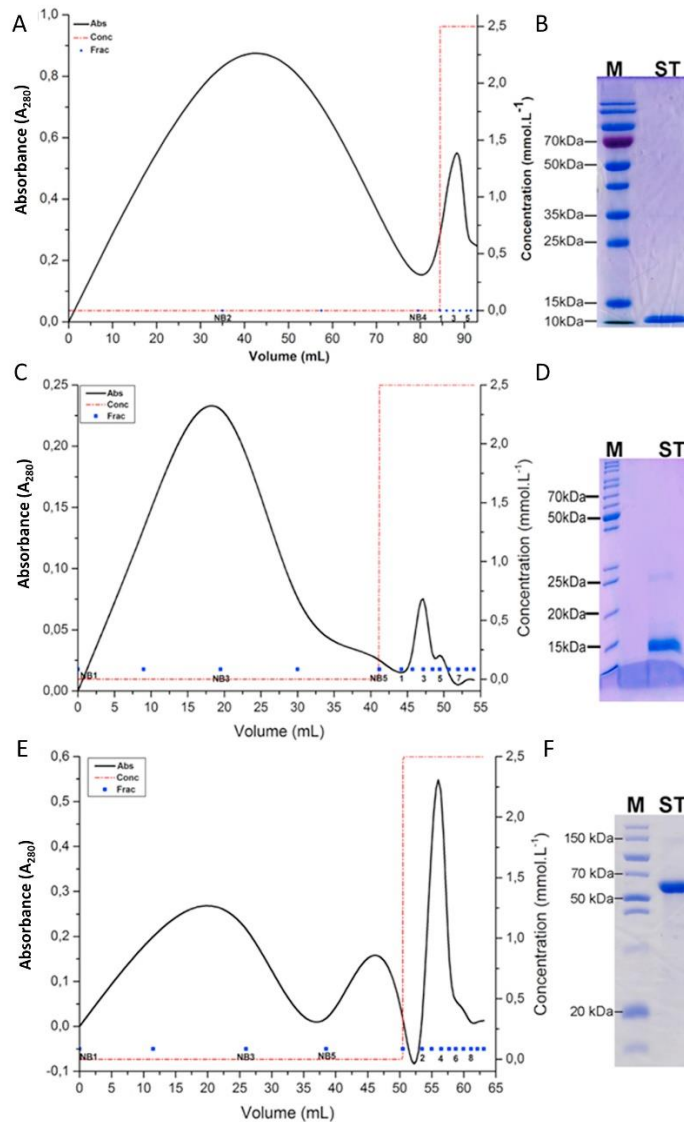
- [48] C. Follmer, F.V. Pereira, N.P. Da Silveira, C.R. Carlini, Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering, *Biophys. Chem.* 111 (2004) 79–87, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.03.009>.
- [49] A.R. Piovesan, A.H.S. Martinelli, R. Ligabue-braun, J. Schwartz, C.R. Carlini, *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers, *Arch. Biochem. Biophys.* 547 (2014) 6–17, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.006>.
- [50] F.C. Lopes, O. Dobrovolska, R.R. Guerra, V. Broll, B. Zambelli, F. Musiani, V. N. Uversky, C.R. Carlini, S. Ciurli, Pliable natural biocide: jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease, *FEBS J.* (2015) 1043–1064, <https://doi.org/10.1111/febs.13201>.
- [51] C.F. Benjamin, C.R. Carlini, C. Barja-Fidalgo, Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, *Toxicol.* 30 (1992) 879–885, [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90386-J](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90386-J).
- [52] A.F. Uberti, D. Olivera-Severo, G.E. Wassermann, A. Scopel-Guerra, J.A. Moraes, P. Barcellos-de-Souza, C. Barja-Fidalgo, C.R. Carlini, Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease, *Toxicol.* 69 (2013) 240–249, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.02.009>.
- [53] A.E.A. Oliveira, V.M. Gomes, M.P. Sales, K.V.S. Fernandes, C.R. Carlini, J. Xavier-Filho, The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi, *Rev. Bras. Biol.* 59 (1999) 59–62, <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000100008>.
- [54] A.B. Becker-Ritt, A.H.S. Martinelli, S. Mitidieri, V. Feder, G.E. Wassermann, L. Santi, M.H. Vainstein, J.T. a Oliveira, L.M. Fiuza, G. Pasquali, C.R. Carlini, Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicol.* 50 (2007) 971–983, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2007.07.008>.
- [55] K.-H. Lee, S.J. Park, S.J. Choi, J.Y. Park, *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* decrease *Candida albicans* biofilm formation by suppressing morphological transition to its hyphal form, *Yonsei Med. J.* 58 (2017) 1135–1143.
- [56] M.C. Furlaneto, C.G.T. de Jesus Andrade, L. Furlaneto-Maia, E.J.G. de França, A.T. P. Moralez, Pathogenic attributes of non-*Candida albicans* *Candida* species revealed by SEM. *Scan. Electron Microsc.*, IntechOpen, 2012, pp. 295–310.
- [57] H.-S. Lee, Y. Kim, *Aucklandia lappa* causes cell wall damage in *Candida albicans* by reducing chitin and (1, 3)- $\beta$ -D-glucan, *J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2020) 967–973.
- [58] J.D.M. Salvadori, M.S. Defferrari, R. Ligabue-Braun, E. Yamazaki Lau, J. R. Salvadori, C.R. Carlini, Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect, *Biol. Control* 63 (2012) 253–263, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.002>.
- [59] I. Chouikha, B.J. Hinnebusch, Silencing urease : A key evolutionary step that facilitated the adaptation of *Yersinia pestis* to the flea-borne transmission route, *Proc. Natl. Acad. U. S. A* 111 (2014) 18709–18714, <https://doi.org/10.1073/pnas.1413209111>.
- [60] L.L. Fruttero, N.R. Moyetta, M.S. Krug, V. Broll, M.V.C. Grahl, R. Real-Guerra, F. Stanisquaski, C.R. Carlini, Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector, *Acta Trop.* 168 (2017) 54–63.
- [61] T. Carrazoni, M. de Avila Heberle, A.P.A. Perin, A.P. Zanatta, P.V. Rodrigues, F.D. M. dos Santos, C.G.M. de Almeida, R.V. Breda, D.S. dos Santos, P.M. Pinto, J. C. Costa, C.R. Carlini, C.A. Dal Belo, Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches, *Toxicology.* 368 (2016) 162–171.
- [62] T. Carrazoni, C. Nguyen, L.F. Maciel, A. Delgado-Cañedo, B.A. Stewart, A.B. Lange, C.A. Dal Belo, C.R. Carlini, I. Orchard, Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions, *Pestic. Biochem. Physiol.* 146 (2018) 63–70.
- [63] D. Arendt, K. Nubler-Jung, Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates, *Development* 126 (1999) 2309–2325.
- [64] W. Blenau, A. Baumann, Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*, *Arch. Insect Biochem. Physiol. Publ. Collab. with Entomol. Soc. Am.* 48 (2001) 13–38.
- [65] C. Barja-Fidalgo, J.A. Guimarães, C.R. Carlini, Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds, *Toxicol* 29 (1991) 453–459, [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90019-N](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90019-N).
- [66] S. Baik, H. Kang, J. Seo, E. Park, K. Rhee, M. Cho, *Helicobacter pylori* urease induces mouse death, *J. Bacteriol. Virol.* 35 (2005) 175–181.
- [67] H. Phan, D. Lehman, Cerebral abscess complicating *Proteus mirabilis* meningitis in a newborn infant, *J. Child Neurol.* 27 (2012) 405–407.
- [68] I.S. Kourbeti, A.F. Vakis, P. Ziakas, D. Karabetsos, E. Potolidis, S. Christou, G. Samonis, Infections in patients undergoing craniotomy: risk factors associated with post-craniotomy meningitis, *J. Neurosurg.* 122 (2015) 1113–1119.
- [69] C.-H. Lu, W.-N. Chang, C.-C. Lui, P.-Y. Lee, H.-W. Chang, Adult spinal epidural abscess: clinical features and prognostic factors, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 104 (2002) 306–310.
- [70] N. Browne, M. Heelan, K. Kavanagh, An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes, *Virulence* 4 (2013) 597–603.
- [71] T. Zielinski, B. Wachowicz, J. Saluk-Juszczak, W. Kaca, Polysaccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen, *Platelets* 13 (2002) 419–424.
- [72] F. Musiani, D. Gioia, M. Masetti, F. Falchi, A. Cavalli, M. Recanatini, S. Ciurli, Protein tunnels: the case of urease accessory proteins, *J. Chem. Theory Comput.* 13 (2017) 2322–2331.
- [73] S. Quiroz-Valenzuela, S.C.K. Sukuru, R.P. Hausinger, L.A. Kuhn, W.T. Heller, The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis, mutagenesis, and small-angle X-ray scattering, *Arch. Biochem. Biophys.* 480 (2008) 51–57.
- [74] R. Ligabue-Braun, C.R. Carlini, Moonlighting toxins: ureases and beyond. *Plant Toxins*, Springer, 2015, pp. 1–21.

SUPPLEMENTARY INFORMATION (SI)

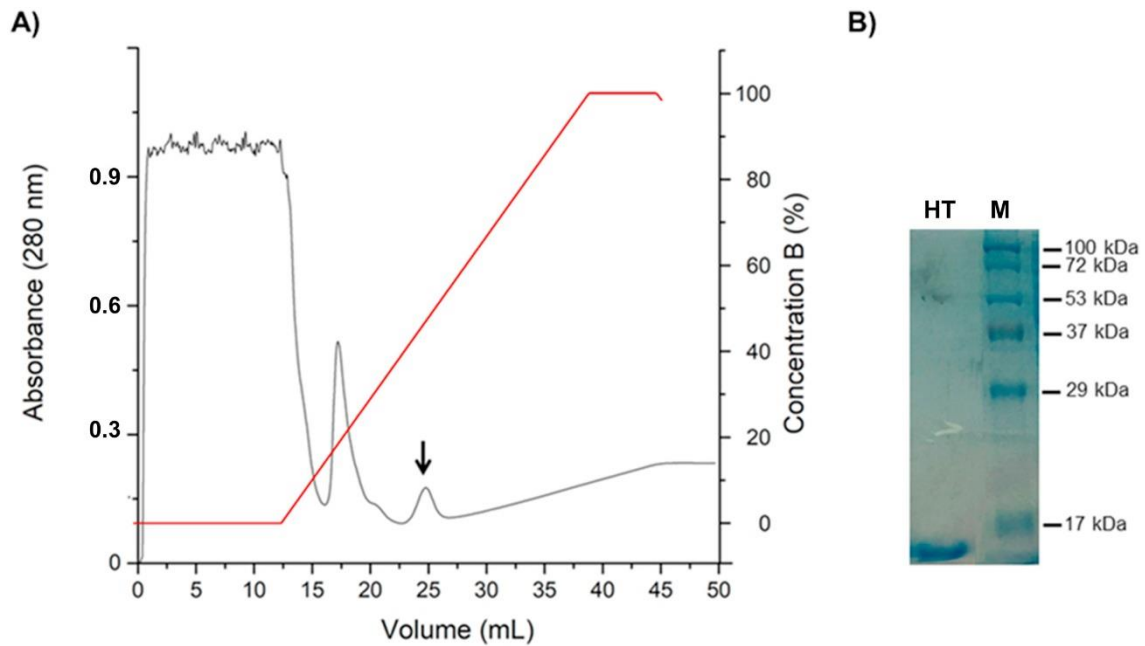


**Suppl. Figure 1. Purification of *Proteus mirabilis* urease (PMU).** Panel A. Gel filtration in a Superdex 200 column in the last purification step; absorbance at 280 nm (black line), ureolytic activity (red dotted line). Inset: SDS -12% PAGE (1) sample applied to the Superdex 200 column; (2) pooled (red) active fractions designated as purified PMU; MW, molecular mass markers. Panel B. Native 7.5 % PAGE of purified PMU stained with silver nitrate (left lane) and zymogram indicating the ureolytic activity of PMU (right lane).





**Suppl. Figure 2. Purification of *Proteus mirabilis* isolated subunits.** Panels A, C and E show the profiles of the affinity chromatography on StrepTag columns of PmUrey (PmUreA), PmUre $\beta$  (PmUreB) and PmUre $\alpha$  (PmUreC), respectively. The black lines show protein content of the column's effluent (absorbance at 280 nm), the red dotted lines indicate is the elution with D-desthiobiotin. Blue dots indicate fractions collected for analysis. Panels B, D and F. show SDS – 12% PAGE of purified PmUrey, PmUre $\beta$  and PmUre $\alpha$ , respectively. (M) molecular mass markers; (ST) purified PMU's subunits (pooled fractions after the StrepTag columns).



**Suppl. Figure 3. Purification of PmUre $\beta$  subunit.** Panel A shows the profiles of the affinity chromatography on Chelating Sepharose column of PmUre $\beta$  (PmUreB). The black line show protein content of the column's effluent (absorbance at 280 nm), the arrow indicates the PmUre $\beta$  elution with Imidazole. The red line indicates the increase concentration of Imidazole, represented in the graphic by concentration B (%). Panel B shows SDS – 12% PAGE of purified PmUre $\beta$  (M) molecular mass markers; (ST) purified PmUre $\beta$  subunit (pooled fractions after the HisTag column).

(contd.)

JBU	AISSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRMLQSTDYLPNFGFTGKGSSSKPDDEL	478
JbtX	-----	100
PmUrea	GLVSGVTTFIGGGTGPVAGTNATTVTPGIWNMYRMLEAVDELPINVGLFGKGCVSQPEAI	205
HpUrea	AFASGVTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRLKMWLRAAEEYSMNLGFLAKGNTSNDASI	205
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238
JBU	HEIIKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKG	538
JbtX	-----	100
PmUrea	REQITAGAIGLKIHEDWGATPMAIHNCLNVADEMVDQVAIHSDTLNEGGFYEE TVKAIAG	265
HpUrea	ADQIEAGAI GFKIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAIAG	265
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238
JBU	RTIHTYHSEGAGGGHAPDIIKVCGIKNVLPSSNTPRPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLDRE	598
JbtX	-----	100
PmUrea	RVIHVFHTEGAGGGHAPDVIKSVGEPNIPASTNPTMPYTIINTVDEHLDMLMVCHHLDPS	325
HpUrea	RTMHTFHTEGAGGGHAPDIIKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTEAEHMDMLMVCHHLDKS	325
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUrea	-----	238
JBU	IPEDLAFAHSRIRKKTIAAEDVLNDIGAISIISSDSQAMGRVGEVIRTWQTADPMKAQT	658
JbtX	-----	100
PmUrea	IPEDVAFAESRIRRETIAAEDI LHDMGAI SVMS SDSQAMGRVGEVILRTWQCAHKMKLQR	385
HpUrea	IKEDVQFADSRI RPQTIAAEDTLHDMGIFSI TSSDSQAMGRVGEVITRTWQTADKNKKEF	385
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238
JBU	GPLKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKGLADLVMWKPSFFGTKPE	718
JbtX	-----	100
PmUrea	GTLAGDSADNDNNRIKRYIAKYTINPALAHGIAHTVGSIEKGKLADIVLWDPAFFGVKPA	445
HpUrea	GRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSVEVGKVADLVLS PAFFGVKPM	445
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238
JBU	MVIKGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLY	778
JbtX	-----	100
PmUrea	LI IKGMVAYAPMGDINA IPTPQPVHYRPMYACLGKAKYQTSMI FMSKAGIBAGVPEKL	505
HpUrea	MI IKGGFIALSQMGDANAS IPTPQPVYYREMFHHGKAKYDANITFVSQAAYDKGIKEEL	505
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238
JBU	GLNKRVEAVSNVRKLTKLDMKLNDA LPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRNYF	838
JbtX	-----	100
PmUrea	GLKSLIGRVEGCRHITKASMIHNNYVPHIELDPQTYIVKADGVPLVCEPATEL PMAQRVYF	565
HpUrea	GLERQVLPVKNCRNITKKDMQFNDTTAHIEVNPETYHVFDGKEVTSKPATKVSLAQLFS	565
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238

JBU	MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQLMCL	60
Jbtx	-----	0
PmUrea	-----	0
HpUrea	-----	0
PmUreβ	-----	0
PmUrey	MELTPREKDKLLLF <sup>T</sup> AGLVAERRLAKGLKLNYPEAVALISCAIMEGAREGK-TVAQLMSE	59
HpUreβ	MKLTPEL <sup>D</sup> KLMLHYAGELARKRKEKGIKLNYPEAVALISAHIMEEARAGKKTA <sup>E</sup> ELMQE	60
JBU	GQHLLGRRQVLPVAPHLLNAVQVEATFPDGTKLVTVHDPISRENGELQEALFGSLLPVPS	120
Jbtx	-----	0
PmUrea	-----	0
HpUrea	-----	0
PmUreβ	-----	0
PmUrey	GRTVLTAEQVMEGVPEMIKDVQVECTFPDGTKLVSIHSPIV	100
HpUreβ	GRTLLKPD <sup>D</sup> MDGVA <sup>S</sup> MIHEVGI <sup>E</sup> AMFPDGTKLVTVHTPIEANGK	105
JBU	LDKFAETKEDNRIPGEILCE--DECLTLNIGRKAVILKVTSKGRPIQVGS <sup>H</sup> YHFIEVNP	178
Jbtx	-----	0
PmUrea	-----	0
HpUrea	-----	0
PmUreβ	-----MI <sup>P</sup> GEIRVNAALGDIELNAGRET <sup>K</sup> TIQVANHGDRPVQVGS <sup>H</sup> YHFYEVNE	49
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----LVPGE <sup>L</sup> FLK--NEDITINEGKKA <sup>V</sup> SVKVKNVGDRPVQIGSHF <sup>H</sup> FFEVNR	152
JBU	YLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLVSI <sup>E</sup> GNKVIRGGNAIADGPVNETNLE	238
Jbtx	-----MGPVNEANCK	10
PmUrea	-----	0
HpUrea	-----	0
PmUreβ	ALRFAREETLGFRLNI <sup>P</sup> AGMAVR <sup>F</sup> EPGQSR <sup>T</sup> VELVAFAGKREIYGFHGKVMGKLESEKK	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	YLD <sup>F</sup> DREKTFGKRLDIASGTAVRFEPGEEKSVELIDIGGNRRIFGFNALVDRQADNESKK	212
JBU	AAMHAVRSKGF <sup>G</sup> HEEEKDASEGFTKEDPNC <sup>F</sup> NTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGD <sup>T</sup> NL	298
Jbtx	AAMEIVCRREFGHKEEDASEGVTTGDPDC <sup>P</sup> FTKAI <sup>P</sup> REEYANKYGPTIGDKIRLGD <sup>T</sup> DL	70
PmUrea	-----MKTISRQAYADMFGPTTGDR <sup>L</sup> RLADTEL	28
HpUrea	-----MISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGD <sup>T</sup> DL	26
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	I <sup>A</sup> LHRAKERGFHGAKSDDNY--VKT <sup>I</sup> KE	238
JBU	LAEIEKDIALY <sup>G</sup> DECVF <sup>G</sup> GGKVIR <sup>D</sup> GMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIIDYTGIIKADIG	358
Jbtx	IAEIEKDFALY <sup>G</sup> DESVF <sup>G</sup> GGKVI <sup>S</sup> HHHHHH	100
PmUrea	FLEIEKDLTTYGEEV <sup>K</sup> FGGGKVIR <sup>D</sup> GMGQSQ--V <sup>V</sup> SAECVDLITNAIILDYWGIVKADIG	87
HpUrea	IAEVEHDYTIYGEELK <sup>F</sup> GGGKTLREGMSQSN--N <sup>P</sup> SKEELDLIITNALIVDYTGIIKADIG	85
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238
JBU	IKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYE	418
Jbtx	-----	100
PmUrea	IKDGRIVGIGKAGNPDVQPNV--DI <sup>V</sup> IGPGTEVVAGEGKIVTAGGIDTHIHFICPQQQAQE	145
HpUrea	IKDGKIAGIGKGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPQQIPT	145
PmUreβ	-----	108
PmUrey	-----	100
HpUreβ	-----	238

(contd.)

JBU	LF	840
Jbtx	--	100
PmUre $\alpha$	LF	567
HpUre $\alpha$	IF	567
PmUre $\beta$	--	108
PmUre $\gamma$	--	100
HpUre $\beta$	--	238

**Suppl. Figure 4: Alignment of amino acid sequences of *Proteus mirabilis* and other ureases.** Jack bean urease (JBU - GenBank: AAA83831.1) was used as the amino acid sequence reference. Light blue: jaburetox, *Proteus mirabilis* urease (PMU): PmUre $\gamma$  in yellow (GenBank: KXC01632.1), PmUre $\beta$  in green (GenBank: KXC01631.1) and PmUre $\alpha$  in blue (GenBank: KGA91697.1). *Helicobacter pylori* urease (HPU): HpUre $\beta$  in dark green (GenBank: WP\_058905136.1) and HpUre $\alpha$  in dark blue (GenBank: AAU21200.1).

## **CURRICULUM VITAE**

Resumido

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Centro de Biotecnologia  
Av. Bento Gonçalves 9500  
Setor 4, Prédio 43.421 - Sala 222  
Agronomia - Porto Alegre  
91501970, RS – Brasil  
  
anaperin.app@gmail.com

**PERIN, A.P.A; PERIN, A.P**

Ana Paula Perin

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

**2018 – Presente**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Doutoranda em Biologia Celular e Molecular

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

Porto Alegre, RS, Brasil

**2016 – 2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Mestre em Biologia Celular e Molecular

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq

Porto Alegre, RS, Brasil

**2014 – 2015**

UNIVERSITY OF IDAHO

Estudante convidada

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

Moscow, ID, Estados Unidos

**2010 – 2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Bacharel em Biotecnologia

São Gabriel, RS, Brasil

### **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

**2016 – 2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Curso em Laboratory in Invertebrate Neurophysiology (Carga horária: 24h).

São Gabriel, RS, Brasil.

### **ESTÁGIOS**

**2016 – 2016**

Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

**2015 – 2015**

Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

**2013 - 2014**

Iniciação Científica, PIBIC - CNPq, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

**2013 - 2013**

Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.

**2012 - 2012**

Iniciação Científica, PBDA Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.

**2011 - 2012**

Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.

**PARTICIPAÇÃO EM BANCA****2022**

BANCA DE DIEIVISSON SANTOS

Graduação em Biomedicina

“Atividade antifúngica da decreína contra *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*”

Centro Universitário Ritter dos Reis

Porto Alegre, RS, Brasil.

**2019**

BANCA DE ISABELA CHITOLINA

“Produção de hidrogéis contendo antifúngicos: a busca por um curativo bioativo”

Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS, Brasil



## ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Sbaraini, Nicolau ; Phan, Chin-Soon ; Silva E Souza, Eden ; **Perin, Ana Paula A.**; Rezaee, Hamideh ; Geremia, Felipe ; Da Silva Camargo, Matheus ; Barbosa, Euzébio Guimarães ; Schrank, Augusto ; Chooi, Yit-Heng ; Staats, Charley Christian . Intra-hemocoel injection of pseurotin A from *Metarhizium anisopliae*, induces dose-dependent reversible paralysis in the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*). **Fungal Genetics and Biology**, v. 159, p. 103675, 2022.

Grahl, Matheus V.C.; Alcará, Allan M.; **Perin, Ana Paula A.**; Moro, Carlo F.; Pinto, Éderson S.M.; Feltes, Bruno C.; Ghilardi, Isadora M.; Rodrigues, Felipe V.F.; Dorn, Marcio ; Da Costa, Jaderson C.; Norberto De Souza, Osmar ; Ligabue-Braun, Rodrigo . Evaluation of drug repositioning by molecular docking of pharmaceutical resources available in the Brazilian healthcare system against SARS-CoV-2. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 23, p. 100539, 2021.

Broll, Valquiria\*; **Perin, Ana Paula A.\***; Lopes, Fernanda C.; Martinelli, Anne Helene S.; Moyetta, Natalia R.; Fruttero, Leonardo L.; Grahl, Matheus V.C.; Uberti, Augusto F.; Demartini, Diogo R.; Ligabue-Braun, Rodrigo ; Carlini, Celia R. Non-enzymatic properties of *Proteus mirabilis* urease subunits. **Process Biochemistry**, v. 110, p. 263-274, 2021.

**Perin, Ana P. A.**; Noronha, Mila S.; Moyetta, Natalia R.; Coste Grahl, Matheus V.; Fruttero, Leonardo L.; Staniscuaski, Fernanda. Jaburetox, a urease-derived peptide: Effects on enzymatic pathways of the cockroach. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 1-15, 2020.

Coste Grahl, Matheus V.; **Perin, Ana Paula A.**; Lopes, Fernanda C.; Porto, Bárbara N.; Uberti, Augusto F.; Canavoso, Lilian E.; Stanisçuaski, Fernanda; Fruttero, Leonardo L. The role of extracellular nucleic acids in the immune system modulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 167, p. 104591, 2020.

Leal, A. P.; Oliveira, R. S.; **Perin, A. P. A.**; Borges, B. T.; De Brum Vieira, P.; Dos Santos, T. G.; Vinadé, L.; Valsecchi, C.; Dal Belo, C. A. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.1, p.1 - , 2018.

Moyetta, N. R.; Broll, V.; **Perin, A. P. A.**; Uberti, A. F.; Coste Grahl, M. V.; Stanisçuaski, F.; Carlini, C. R.; Fruttero, L. L. Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 200, p. 17–26, 2017.

Carrazoni, T.; De Avila Heberle, M.; **Perin, A. P. A.**; Zanatta, A. P.; Rodrigues, P. V.; Dos Santos, F. D. M.; De Almeida, C. G. M.; Vaz Breda, R.; Dos Santos, D. S.; Pinto, P. M.; Da Costa, J. C.; Carlini, C. R.; Dal Belo, C. A. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology**, v. 368–369, p. 162–171, 2016.

\* Primeira autoria compartilhada.

## CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

Lopes, Fernanda C.; Martinelli, Anne Helene S.; **Perin, Ana Paula A.** Enzimas: produção e aplicação industrial. In: Fernando Santos, Ana Lúcia Kern, Jane Marlei Boeira, Odir Dellagostin (org). (Org.). Bioprocessos & Biotecnologia. 1ed.Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2022, v. 1, p. 145-172.

## RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. **Perin, A. P. A.**; Noronha, M. S.; Moyetta, Natalia R.; Broll, Valquiria; Coste Grahl, Matheus V.; Carlini, Celia R.; Fruttero, Leonardo L. Neurotoxicity of Jaburetox, a Urease-Derived Peptide: Effects on Enzymes Activities in Tissues of Two Insect Species. In: 46a.

Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq, 2017, Águas de Lindóia. 46a. Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq, 2017.

2. Zanatta, A. P.; **Perin, A. P.**; Heberle, M.; Freitas, T. C.; Santos, D. S.; Pinto, P. M.; Carlini, C. R. V.; Dal Belo, C. A. Modulation of the grooming behavior induced by the urease of *Canavalia ensiformis* (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroach. In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.

3. Santos, D. S.; Zanatta, A. P.; Almeida, C. G.; **Perin, A. P.**; Freitas, T. C.; Heberle, M.; Vinade, L. H. C.; Pinto, P. M.; Carlini, C. R. V.; Dal Belo, C. A. Neuromuscular blockade induced by Jack Bean Urease in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.

4. **Perin, A. P.**; Hoyos, E. M.; Emerich, D. W.; Song, Q.; Polacco, J. Toxicity of Jaburetox, a urease sub-peptide, in fruit fly (*Drosophila melanogaster*) development. In: Undergraduate Research & Creative Achievements Forum, 2015, Columbia. Undergraduate Research & Creative Achievements Forum, 2015.

5. Heberle, M.; Rodrigues, P. V.; Santos, F. D.; **Perin, A. P.**; Dal Belo, C. A.; Carlini, C. R. V. Evaluation of Activity Induced by Jack Bean Urease (JBU) in Nervous System of the Cockroach Kind *Nauphoeta cinerea*. In: 1st Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2014, Porto Alegre - RS. TOXI-LATIN. Porto Alegre: Abstract Book, 2014. v. 1. p. 1-1.

6. **Perin, A. P.**; Lucho, A. P. B.; Rocha, L.; Cogo, J. C.; Vinade, L. H. C.; Dal Belo, C. A. Neuroproteção Induzida pelo Extrato Padronizado de *Hypericum brasiliense* (Choisy) sobre a Neurotoxicidade Central do Veneno de Cascavel Brasileira em Camundongos: Comparação com o flavonóide Quercetina e o anticonvulsivante Riluzole. In: IV Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, Bagé. IV Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012. v. 4.