



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR (PPGBM)

MARCOS ANTONIO BATISTA DE CARVALHO JÚNIOR

**Identificação proteômica de alterações metabólicas em
Paracoccidioides brasiliensis induzidas por derivado de chalcona**

GOIÂNIA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior

3. Título do trabalho

Identificação proteômica de alterações metabólicas em *Paracoccidioides brasiliensis* induzidas por derivado de chalcona

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Maristela Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 05/11/2021, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS ANTONIO BATISTA DE CARVALHO JUNIOR, Discente**, em 08/11/2021, às 19:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2469485** e o código CRC **6118BC6E**.

Referência: Processo nº 23070.048921/2021-68

SEI nº 2469485

MARCOS ANTONIO BATISTA DE CARVALHO JÚNIOR

**Identificação proteômica de alterações metabólicas em
Paracoccidioides brasiliensis induzidas por derivado de chalcona**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Linha de pesquisa: Genômica funcional, estrutural e proteômica.

Orientadora: Professora Dra. Maristela Pereira

Co-orientadores:

Dra. Livia do Carmo Silva

Dr. Kleber Santiago Freitas e Silva

GOIÂNIA

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Carvalho Júnior, Marcos Antonio Batista de
Identificação proteômica de alterações metabólicas em *Paracoccidioides brasiliensis* induzidas por derivado de chalcona [manuscrito] / Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior. - 2021.
78 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maristela Pereira; co-orientadora Dra. Lívia do Carmo Silva; co-orientador Dr. Kleber Santiago Freitas e Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. chalcona. 2. antifungo. 3. *Paracoccidioides brasiliensis*. 4. proteômica. 5. ancoragem molecular. I. Pereira, Maristela, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **99** da sessão de Defesa de Dissertação de **Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior**, que confere o título de Mestre(a) em **Genética e Biologia Molecular**, na área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**.

Ao/s **trinta dias do mês de setembro de dois mil e vinte e um**, a partir da(s) **14h00**, por videoconferência, seguindo portaria CAPES no. 36 de 16 de março de 2020 e recomendação da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**Identificação proteômica de alterações metabólicas em *Paracoccidioides brasiliensis* induzidas por derivado de chalcona**”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Maristela Pereira (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutor(a) **Juliana Santana de Curcio**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Maristela Pereira**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **trinta dias do mês de setembro de dois mil e vinte e um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Maristela Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 03/10/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior**, em 04/10/2021, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Santana de Curcio, Usuário Externo**, em 04/10/2021, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2386679** e o código CRC **DED7F451**.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Maristela Pereira – Presidente da banca

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Dra. Juliana Santana de Curcio

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

SUPLENTE

Profa. Dra. Mirelle Garcia Silva Bailão

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Raisa Melo Lima

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Jataí

O saber que não vem da
experiência não é realmente
saber.

Lev Vigotski

Às pessoas mais importantes da vida...

...ao meu pai, Marcos, que é um grande exemplo de força e perseverança. O senhor e se mostrou compreensivo e acolhedor nos momentos mais precisos. Obrigado por todos estes anos de confiança e por não medir esforços para garantir o meu crescimento pessoal e profissional.

... à melhor mãe e melhor amiga que alguém poderia ter. Luciene, eu não conseguiria, em poucas palavras, descrever o quão inspiradora a sua existência é pra mim. Obrigado pelo seu amor incondicional e por ser um exemplo tão maravilhoso do que significa ser uma pessoa boa. Se eu escrevo este trabalho hoje é por que você acreditou nas minhas escolhas e as apoiou. Assim, espero conseguir ser digno de todo o seu amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Maristela Pereira. Sou grato pela inestimável oportunidade de aprender com uma profissional tão competente e reconhecida pelo lindo trabalho que desenvolve. Obrigado por me apresentar a um campo de pesquisa tão belo e promissor, com o qual eu até então não havia imaginado trabalhar. Obrigado também por todo o carinho, dedicação e confiança, tendo aceitado me orientar mesmo não nos conhecendo em um primeiro momento. Com toda certeza, a sua passagem pela minha trajetória acadêmica me engrandecerá como profissional. Conte comigo para o que precisar.

Aos meus co-orientadores, Lívia do Carmo e Kleber Santiago. Lívia, eu sou infinitamente agradecido por todos os ensinamentos, oportunidades de colaboração e por me apresentar à molécula que protagoniza este trabalho. Kleber, obrigado por estar tão presente durante a minha formação inicial no mestrado e pelos preciosos ensinamentos de bioinformática. Sem a participação de ambos, com certeza este projeto não teria caminhado por estas formas.

Aos amigos possibilitados pelo mestrado, Olívia, Gabriela e Flávio. Obrigado por tornarem essa caminhada tão mais prazerosa com todas as risadas, pela companhia, pelas frustrações compartilhadas, pelo companheirismo e pelos confortos. Independente do caminho que tracemos para além dos limites da academia, saibam que vocês podem contar comigo para o que precisarem. Um agradecimento especial à Olivia, por toda a parceria que desenvolvemos ao longo dos últimos anos, carinho e aprendizados. Você foi parte imprescindível deste projeto!

A todos os amigos e colegas do grupo da Professora Maristela que de alguma forma atravessaram a minha formação acadêmica. Amanda, muito obrigado pelas gentilezas e esclarecimentos sobre as mais diversas ferramentas de bioinformática. Thaynara, obrigado por compartilhar um pouco das frustrações e por toda a simpatia durante os trabalhos que realizamos juntos.

À Dayane por todo o carinho e pelos preciosos direcionamentos no cultivo de macrófagos.

A todos demais colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular: Célia Maria de Almeida Soares; Mirelle Garcia Silva Bailão; Juliana Alves Parente-Rocha; Alexandre Melo Bailão; e Clayton

Luiz Borges. Por contribuírem para a primorosa organização e estrutura mantida neste espaço mesmo frente a um cenário de desmonte e precarização das ciências. Além disso, agradeço por todas as dúvidas sanadas e cordialidade no dia-à-dia. Sempre terei a todos como grandes exemplos de trabalho em equipe.

Aos membros da banca por dedicarem parte do seu tempo e empenho para ler, avaliar e contribuir com o enriquecimento deste trabalho. Uma menção especial à Dra. Juliana Santana de Curcio que, gentilmente, sempre se dispôs a acompanhar o meu desenvolvimento no curso do mestrado desde a primeira disciplina de Seminários em Genética e Biologia Molecular. Muito obrigado!

À CAPES, pelo importante financiamento concedido ao meu mestrado, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPq), Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Finance Code 001, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Estratégias de Interação Patógeno-Hospedeiro (INCT-IPH). Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPq), Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Finance Code 001, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Estratégias de Interação Patógeno-Hospedeiro (INCT-IPH).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Paracoccidioidomicose	2
1.1.1 Agente etiológico.....	6
1.1.2 Abordagens terapêuticas contra a PCM	9
1.2 Chalconas e seus derivados: moléculas privilegiadas exibindo promissoras ações biológicas.....	12
1.3 Abordagem proteômica na descoberta de alvos biológicos de compostos antimicrobianos	18
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22

CAPÍTULO 2

Artigo submetido na revista future microbiology: Proteomic identification of metabolic changes in Paracoccidioides brasiliensis induced by chalcone derivative	24
---	-----------

CAPÍTULO 3

CONCLUSÃO.....	68
PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS: ARTIGOS EM COLABORAÇÃO	77
Anexo 1: Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going?	77
Anexo 2: <i>In vitro</i> and <i>in silico</i> analysis reveals antifungal activity and potential targets of curcumin on <i>Paracoccidioides</i> spp.....	78

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Rota de infecção da PCM.

Figura 2 – Apresentações clínicas da PCM.

Figura 3 – Fotomicrografias de células de *Paracoccidioides* spp. evidenciando os diferentes estágios morfológicos desse fungo.

Figura 4 – Principais antifúngicos utilizados no tratamento da PCM, suas estruturas e seus alvos moleculares esquematizados.

Figura 5 – Representação esquemática da via de biossíntese de fenilpropanóides e de flavonóides.

Figura 6 – Representações estruturais e numéricas das formas isoméricas *Trans* e *Cis* das chalconas.

Figura 7 – Representação estrutural do composto 3.

CAPÍTULO 2

Figure 1 – Viability of *P. brasiliensis* yeast cells exposed to compound 3 and functional categories of differentially expressed proteins identified by proteomic analysis.

Figure 2 – Glucose and intracellular lipids dosage.

Figure 3 – Mitochondrial mass and activity assessment.

Figure 4 – Evaluation of the production of intracellular reactive oxygen species.

Figure 5 – Representative EPR spectra of spin probe 5-DSA in fungus membranes for the control and treated samples with chalcone for 24 h.

Figure 6 – Molecular docking of compound 3 and inhibitors with dihydropteroate synthase (DHPS).

Figure 7 – Schematic illustration of the metabolic changes induced by compound 3 in *P. brasiliensis* revealed by proteomic analysis.

Supplementary table S1: Molecular docking details.

Supplementary table S2: Proteins with increased expression.

Supplementary table S3: Proteins with decreased expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
5-DSA	5-doxil estearato
AmB	Anfotericina b
ATP	Trifosfato de adenosina
CMI/MIC	Concentração mínima inibitória
CMX	Cotrimoxazol
DCFH	dicloro-fluoresceína diacetato
DCFH-DA	2',7'-diacetato de dicloro-fluoresceína diacetato
DHPS	Diidropteroato sintase
EM	Espectrometria de massas
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FI	Intensidade de fluorescência
HPPD	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ITZ	Itraconazol
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
TSC	Tiossemicarbazida
TSC-C	Tiossemicarbazida-canfeno

RESUMO

A paracoccidioomicose é uma das mais importantes micoses sistêmicas na América latina. Ela ocorre a partir da inalação de propágulos dos fungos do gênero *Paracoccidioides* presentes nos solos, estando geralmente associada à contaminação de trabalhadores rurais, os quais são constantemente expostos a manipulação deste material potencialmente contaminado. Mesmo mais de um século após o seu descobrimento, o tratamento dessa infecção com o arsenal antifúngico atualmente disponível ainda representa um desafio, devido ao longo tempo de tratamento necessário, bem como à alta toxicidade dos medicamentos utilizados. Essas questões evidenciam a necessidade de pesquisas de desenvolvimento e caracterização de novos compostos com potencial para inibir o crescimento desses microrganismos. Nesse sentido, uma classe de moléculas denominadas chalconas, tem apresentado grande versatilidade por demonstrarem amplas propriedades biológicas, incluindo entre elas a atividade antifúngica. Através de uma metodologia de triagem virtual, um derivado chalcona nomeado de **composto 3** foi identificado pelo nosso grupo como uma promissora molécula inibidora de *Paracoccidioides* spp. Dessa forma, com o objetivo de compreender o modo de ação do **composto 3**, utilizamos uma abordagem proteômica afim de identificar as proteínas induzidas e reprimidas de *P. brasiliensis* na presença do **composto 3**. Em adição, foram realizados ensaios de validação dos resultados encontrados. As análises indicaram que o **composto 3** pode provocar um desequilíbrio na homeostase energética do fungo pela redução da atividade da via glicolítica, da beta-oxidação e do ciclo do ácido cítrico. As validações *in vitro* também demonstraram que espécies reativas de oxigênio se acumulam dentro das células durante a exposição ao **composto 3**, o que pode desestabilizar componentes celulares como a membrana plasmática. Em última análise, o ensaio de ancoragem molecular entre o **composto 3** e a enzima diidropteroato sintase, que teve sua expressão induzida após o tratamento, sugere que o **composto 3** possa atuar como um inibidor dessa proteína, prejudicando a síntese de folato que participa como cofator na biossíntese de nucleotídeos e alguns aminoácidos. Portanto, os dados suportam a eficiência do **composto 3** em produzir desequilíbrios em vias chave para a manutenção metabólica do organismo, contribuindo para o seu papel antifúngico.

Palavras-chave: chalcona; antifungo; *Paracoccidioides brasiliensis*; proteômica; ancoragem molecular.

ABSTRACT

Proteomic identification of metabolic changes in *Paracoccidioides brasiliensis* induced by chalcone derivative

Paracoccidioidomycosis is one of the most important systemic mycoses in Latin America. The infection occurs through the inhalation of fungal propagules belonging to *Paracoccidioides* genus that are present in soils, being largely associated with the contamination of rural workers, who are constantly exposed to this potentially contaminated material. Even more than a century after its discovery, the treatment of this infection with the currently available antifungal arsenal still represents a challenge, due to the long treatment time required, as well as the high toxicity of the drugs used. These questions highlight the need for research to develop and characterize new compounds with the potential to inhibit the growth of these microorganisms. In this sense, a class of molecules called chalcones has shown great versatility for demonstrating broad biological properties, including antifungal activity among them. Through a virtual screening methodology, a chalcone derivative named **compound 3** was identified by our group as a promising inhibitor of *Paracoccidioides* spp. Thus, in order to understand the mode of action of **compound 3**, we applied a proteomic approach to identify the induced and repressed proteins of *P. brasiliensis* in the presence of **compound 3**. In addition, validation assays were performed on the results found. The analysis indicated that the compound can cause an imbalance in the fungal energy homeostasis by reducing the activity of the glycolytic pathway, beta-oxidation and citric acid cycle. *In vitro* validations also demonstrated that reactive oxygen species accumulate within the cells during exposure to **compound 3**, which can destabilize cellular components such as the plasma membrane. The molecular docking assay between **compound 3** and the enzyme dihydropteroate synthase, which had its expression induced after the treatment, suggest that **compound 3** may act as an inhibitor of this protein, impairing the folate biosynthesis that participates as a cofactor in synthesis of nucleotides and some amino acids. Therefore, these data support the efficiency of **compound 3** in producing imbalances in key pathways for the *P. brasiliensis*' metabolic maintenance, contributing to its antifungal role.

Key words: chalcone; antifungal; *Paracoccidioides brasiliensis*; proteomic; molecular docking.

A rectangular area at the bottom of the page features a blurred, grayscale microscopic image of cells, likely showing cell walls and internal structures. The text 'Capítulo 1' is overlaid on this image in a large, white, bold font.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose

O termo Paracoccidioidomicose (PCM) é utilizado para designar uma infecção sistêmica granulomatosa, endêmica da América Latina, causada pelos fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (C. P. et al., 2018). A doença, foi primeiramente reportada em 1908 por Adolpho Lutz, e hoje é reconhecida como uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018).

A PCM é encontrada ao longo de toda a América Latina, com casos reportados em uma faixa que se estende do México até a Argentina, demonstrando uma maior prevalência em países da América do Sul, com cerca de 80% dos casos ocorrendo no Brasil (MARTINEZ, 2015; MENDES et al., 2017b). As estimativas de incidência, prevalência e morbidade no Brasil, entretanto, tornam-se difíceis e imprecisas uma vez que a notificação compulsória só foi determinada no início do ano de 2020 (MARIO et al., 2020). Dessa forma, os estudos epidemiológicos desta doença até então costumavam-se amparar em registros médicos e em trabalhos de relatos de caso (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Do total de mortes por micoses sistêmicas no Brasil referentes ao período de 1996 até 2006, a PCM foi reportada como a mais frequente, sendo responsável por uma média anual de 171 óbitos (PRADO et al., 2009). É estimada uma incidência anual de 1 a 3,7 novos casos por 100.000 habitantes, com uma taxa de mortalidade de 1,65 por milhão de habitantes no Brasil (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Adicionalmente, países como Holanda, Alemanha, Áustria e Japão também já reportaram casos importados de PCM em pessoas vindas das áreas de endemismo (CHAVES et al., 2021).

A infecção ocorre inicialmente a partir da inalação, pelos hospedeiros, de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas e conídios) presentes nos solos e que são suspensos no ar durante o desenvolvimento de atividades agrícolas (Figura 1). Essa característica explica a alta prevalência da PCM sobre a população de trabalhadores rurais que entram em contato com *Paracoccidioides* spp. ao durante a realização da sua atividade profissional (MENDES et al., 2017b).

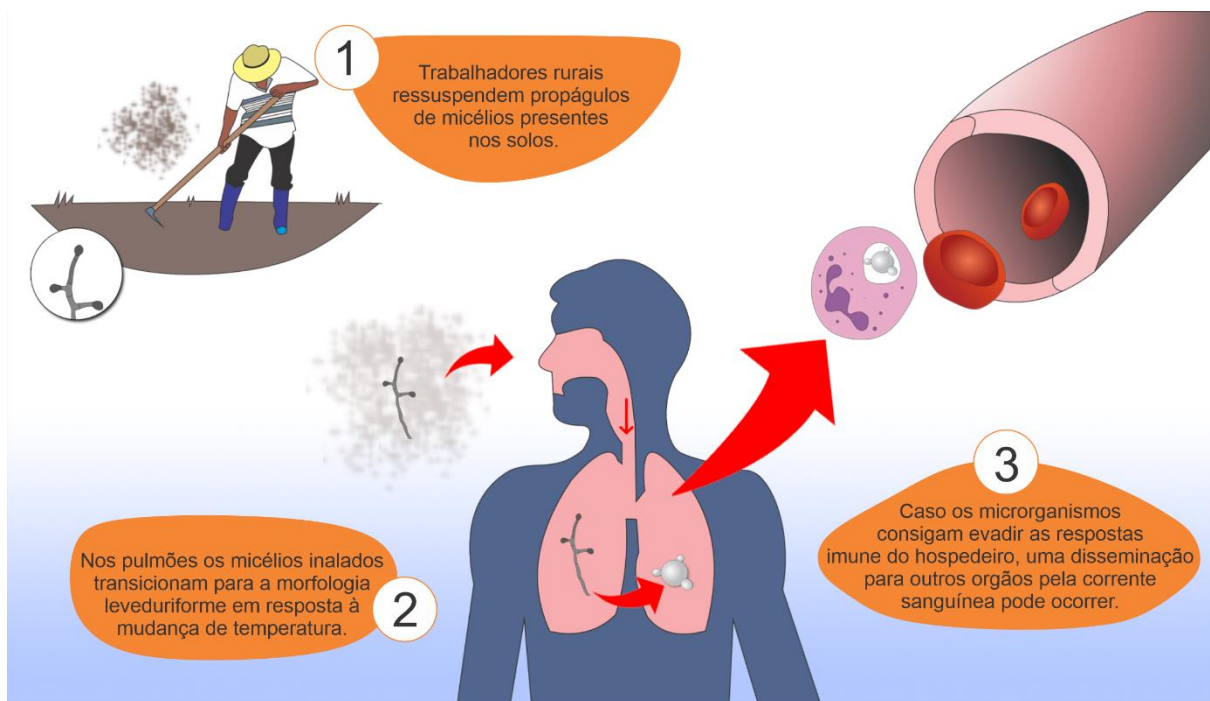


Figura 1. Rota de infecção da PCM. À direita é ilustrada a disseminação sistêmica pela corrente sanguínea de uma célula fúngica que foi capaz de sobreviver dentro de um neutrófilo. Fonte: Autoria própria.

A progressão da infecção para as diferentes formas clínicas da doença depende da resposta imune do hospedeiro, da quantidade do inóculo e da virulência do patógeno. Na forma crônica da micose, o contato inicial com o agente etiológico ocorre comumente nas primeiras duas décadas de vida dos indivíduos, entretanto, nessa fase inicial os fungos raramente conseguem superar as respostas imunes do hospedeiro (FERREIRA, 2009; TIRADO-SÁNCHEZ; GONZÁLEZ; BONIFAZ, 2020). Consequentemente, indivíduos que possuem um padrão de resposta imune do tipo Th-1, através de citocinas específicas elicitam a ativação de macrófagos, células TCD4+ e TCD8+ que promovem o aprisionamento dos patógenos no interior do granuloma, impedindo a sua replicação e mantendo as células fúngicas em um estado de latência (RESTREPO et al., 2008; CASTRO et al., 2013). Também foi verificado que o padrão de expressão de microRNAs de células de mamíferos infectadas por *Paracoccidioides* sp., é alterado em resposta a infecção. Os processos biológicos regulados por estes pequenos RNAs incluem adesão e invasão desses patógenos a células do hospedeiro, além de vias relacionadas à resposta imune, formação do granuloma e indução de apoptose (SINGULANI et al., 2020; TURINI GONZALES MARIOTO et al., 2017).

A forma aguda/subaguda da PCM acomete principalmente crianças e jovens adultos de ambos os sexos e que possuem resposta imune celular predominantemente do tipo Th2, que é considerada imprópria para o combate de patógenos fúngicos (RESTREPO et al., 2008;

FORTES et al., 2011). Nesse tipo de manifestação clínica, que corresponde de 5% a 25% do total de casos, a PCM se desenvolve de forma rápida, sendo diagnosticada dentro de algumas semanas após o início dos sintomas. Nesta forma é característico um forte tropismo dos patógenos pelo sistema fagócito mononuclear do fígado, baço, medula óssea e linfonodos, podendo ocasionar quadros de hepatoesplenomegalia e linfadenomegalias (Figura 2 A-C). Outros sintomas que os pacientes podem desenvolver incluem manifestações no sistema digestivo, sistema osteo-articular; sistema muco-cutâneo, além de febre, perda de peso, anemia leve ou moderada e icterícia obstrutiva (BOCCA et al., 2013; MARQUES, 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Além da atividade profissional constituir-se um fator social que representa risco para a população de trabalhadores rurais; outros aspectos, tais como, demográficos, genéticos, hormonais e referentes aos estilos de vida como tabagismo e alcoolismo também são determinantes para a progressão das diferentes formas clínicas da doença (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013; MARTINEZ, 2015, 2017). De fato, a forma crônica da PCM que compreende de 74% a 96% dos casos, desenvolve-se preferencialmente em homens com mais de 30 anos de idade, gerando uma proporção de 22 homens para 1 mulher afetada (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Essa diferença geralmente é atribuída aos efeitos protetivos do hormônio 17β -estradiol circulante que inibe a transição dimórfica dependente de temperatura dos conídios e micélios (formas infectantes) inalados à forma leveduriforme (patogênica), evento essencial para o desenvolvimento da doença (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; MARTINEZ, 2017). A forma crônica da PCM ainda se distingue pelo seu desenvolvimento lento, podendo ser diagnosticada até um ano após o início dos sintomas. Nela, frequentemente ocorre envolvimento dos pulmões além da possibilidade de extensão a outras regiões, como as mucosas do trato aerodigestivo superior, pele e até mesmo o sistema nervoso central (Figura 2 D-F) (BOCCA et al., 2013).

Uma terceira forma clínica reconhecida é a PCM residual ou sequelar, que ocorre quando são observadas alterações anátomo-funcionais nos órgãos afetados pela doença mesmo após o fim do tratamento (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Nos pulmões, os fungos induzem danos ao parênquima que levam ao desenvolvimento de fibrose e enfisema, processos que podem resultar em severa restrição da capacidade respiratória, impactando muitas vezes na qualidade de vida e na produtividade econômica (TOBÓN et al., 2003; COSTA et al., 2013; GRIFFITHS; COLOMBO; DENNING, 2019). Algumas outras sequelas incluem lesões cicatriciais nas vias

aéreas superiores, podendo causar distúrbios de fala devido ao espessamento das cordas vocais (WEBER et al., 2006; NETO et al., 2011; DA COSTA et al., 2017), dispneia causada por estenose da laringe e/ou traquéia, diminuição da comissura bucal e sinéquia dos glúteos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

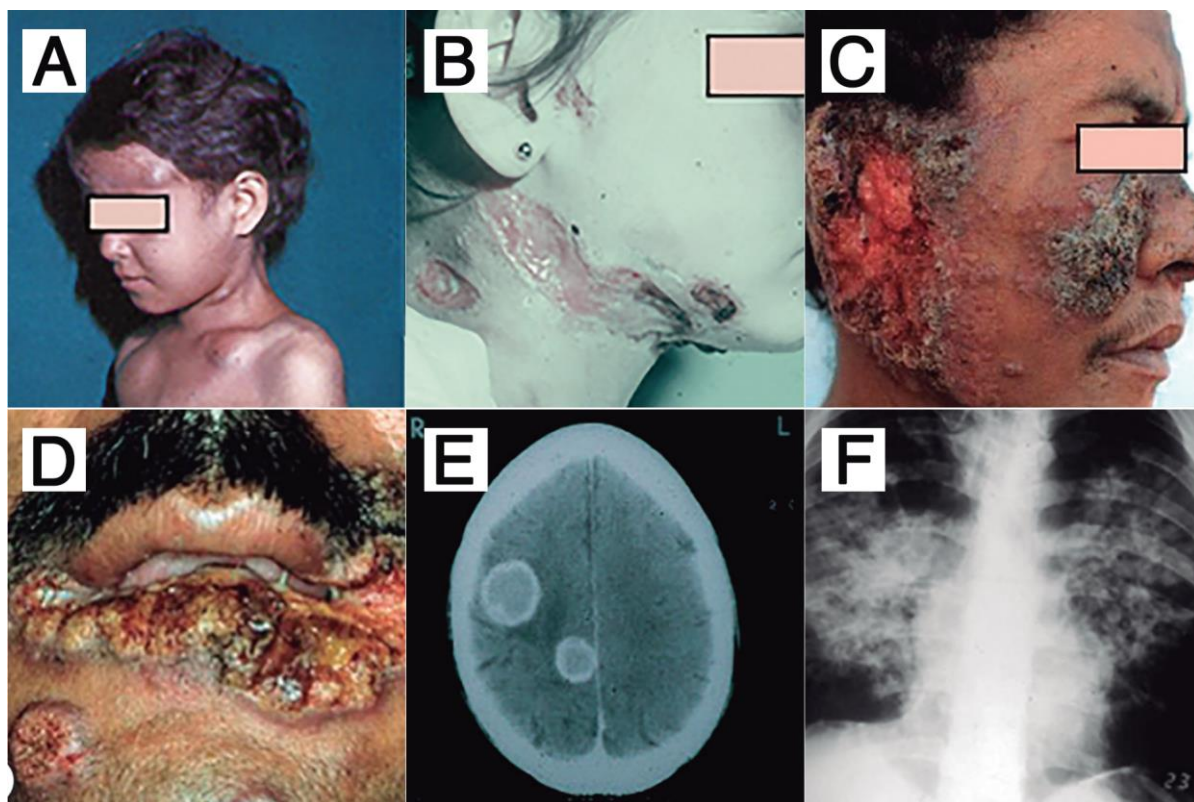


Figura 2. Manifestações clínicas da PCM. As três primeiras imagens se referem à forma aguda/subaguda/jovem e as três últimas à forma crônica/adulta da doença. (A) Envolvimento do osso frontal e da clavícula. (B) Criança apresentando abscesso linfático na região submandibular. (C) Lesões ulcerativas verucosas na face e no pavilhão da orelha. (D) Envolvimento perioral. (E) Comprometimento do sistema nervoso central. (F) Imagem radiológica evidenciando o envolvimento pulmonar. Fonte: Modificado de Shikanai-Yasuda et al. (2017).

O diagnóstico laboratorial convencional da PCM envolve o reconhecimento das células leveduriformes características em espécimes clínicos como escarros, aspirações de nódulos linfáticos, raspados de lesões cutâneas e biópsias (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Apesar deste ser considerado o padrão ouro no diagnóstico da doença, o exame requer experiência, uma vez que amostras com populações de células fúngicas predominantemente jovens nos estudos histopatológicos podem ocorrer, tornando dificultosa a correta identificação do patógeno e, consequentemente, colocando em xeque a sua sensibilidade. Adicionalmente, o diagnóstico clínico diferencial da PCM também se torna dificultoso devido às suas semelhanças com outras moléstias incluindo cânceres, outras doenças pulmonares, distúrbios relacionados ao sistema imune, doenças de pele e outras doenças infecto-parasitárias, especialmente em casos fora das

áreas de endemismo, onde a doença pode ser confundida com afecções regionalmente mais relevantes (TELES; MARTINS, 2011).

Frente a esses desafios no diagnóstico, outras opções de testes diagnósticos têm sido propostas. Testes sorológicos, sobretudo aqueles baseados em métodos de imunoprecipitação semiquantitativa, são amplamente empregados em áreas de endemismo (SALZER et al., 2018; VIDAL et al., 2014). Tais testes, entretanto, não são comumente utilizados no diagnóstico inicial da PCM, uma vez que todos os antígenos utilizados derivam de *P. brasiliensis*, o que pode não representar a diversidade filogenética inata ao gênero, gerando possíveis falsas interpretações dos resultados (SILVA FERREIRA et al., 2016). Apesar disso, essas ferramentas ainda são importantes, sendo empregues no acompanhamento do tratamento dos pacientes (MENDES et al., 2017b). Complementarmente aos imunoenaios, testes moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os genes que codificam a glicoproteína gp43 e a proteína recombinante Pb27 mostraram-se promissoras na detecção da infecção (GAVIRIA et al., 2015; ROCHA-SILVA et al., 2018).

Estando principalmente relacionada à populações pobres com acesso limitado aos serviços sanitários e de saúde, além de causar lesões potencialmente limitantes que comprometem a qualidade de vida e o trabalho dos sujeitos, a PCM se caracteriza como uma doença tropical negligenciada (MOLYNEUX, 2013). Entretanto, apesar de sua grande importância, sendo considerada a principal causa de mortes por infecções fúngicas em pacientes imunocompetentes no Brasil, apenas recentemente ela passou a ser reconhecida no quadro de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018; WHO/DEPARTMENT OF CONTROL OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES, 2020). Juntas, essas informações chamam atenção para uma urgente demanda de esforços tanto do meio acadêmico quanto das autoridades públicas no sentido de promover ações que ajudem a mitigar impactos causados por essa doença nas populações fragilizadas.

1.1.1 Agente etiológico

Na família Ajellomycetaceae (ordem Onygenales), incluem-se vários fungos patogênicos como *Blastomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Histoplasma* spp., *Emergomyces* spp., *Emmonsiiellosis* spp., além dos agentes causadores da PCM representados pelo gênero *Paracoccidioides*. Dentre as sinapomorfias compartilhadas entre estes microrganismos, a mais marcante é a presença de dimorfismo desencadeado por mudanças de temperatura, permitindo

que os microrganismos alcancem uma fase de vida que os habilita a sobreviver como parasitas dentro de tecidos de hospedeiros mamíferos, caracterizando como um fator de virulência (UNTEREINER et al., 2004; JIANG et al., 2018).

O conhecimento das relações filogenéticas bem como sua classificação taxonômica entre os fungos do gênero *Paracoccidioides* se desenvolveu de forma lenta e com muitas contradições. A primeira tentativa de classificação do fungo ocorreu em 1912 quando Splendore incluiu o patógeno ao gênero *Zymonema* e apenas em 1930 Almeida e Lacaz introduziram o novo gênero junto da espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (MENDES et al., 2017b). Por muito tempo, pensou-se que o táxon *P. brasiliensis* fosse formado por uma única espécie clonal. A partir de um estudo filogenético, entretanto, Matute e colaboradores identificaram três espécies crípticas compondo o complexo *P. brasiliensis*, sendo nomeadas de S1 englobando isolados com ampla distribuição pela América Latina; PS2 com representantes no Brasil e na Venezuela; e PS3 com isolados restritamente colombianos (MATUTE et al., 2006). Posteriormente, a partir de uma metodologia de identificação de novas espécies filogenéticas por concordância genealógica, uma nova espécie dentro do gênero foi reconhecida e nomeada como *P. lutzii* (também conhecida por *Pb01-like*), sendo endêmica da região Centro-oeste do Brasil (TEIXEIRA et al., 2009; SALGADO-SALAZAR et al., 2010). Por último, uma quarta espécie críptica (PS4) aparentemente restrita à Venezuela foi incluída ao complexo *P. brasiliensis* (BOCCA et al., 2013).

Atualmente, todas as quatro espécies crípticas que antes compunham o complexo *P. brasiliensis* foram elevadas formalmente ao nível de espécies filogenéticas individuais. Dessa forma, hoje um total de cinco espécies são reconhecidas compondo o gênero, sendo elas: *P. brasiliensis sensu stricto* (para o grupo S1); *P. americana* (para o grupo PS2); *P. restrepiensis* (para o grupo PS3); *P. venezuelensis* (para o grupo PS4); além do já anteriormente descrito *P. lutzii* (TURISSINI et al., 2017). Adicionalmente, duas novas espécies não cultiváveis foram descritas e nomeadas por *P. cetii* e *P. loboii* (VILELA et al., 2021).

Apesar da existência de pequenas diferenças morfológicas entre as espécies, os organismos do gênero *Paracoccidioides* compartilham muitas semelhanças. Em geral, a morfologia miceliana ocorre quando o microrganismo se desenvolve em temperaturas abaixo de 25°C *in vitro* ou no solo. Nessa condição os fungos apresentam crescimento lento, sendo possível observar microscopicamente a presença de hifas septadas com eventual produção de

artroconídios intercalares ou terminais que podem variar em número e/ou forma nas diferentes espécies (Figura 3A). Adicionalmente, o aspecto macroscópico das colônias micelianas é algodonososo, com coloração variando do branco ao bege. Quando cultivados a temperaturas de 37°C ou superiores, ocorre a apresentação leveduriforme (Figura 3B), sendo possível verificar a clássica configuração das células descritas com aparência em “roda de leme” devido à presença de uma grande célula mãe, com paredes celulares grossas e birrefringentes envoltas por múltiplos brotamentos de blastoconídios. Complementarmente, a apresentação macroscópica das colônias de leveduras apresenta um aspecto cerebriforme de coloração bege se desenvolvendo de 5 a 7 dias após o inóculo *in vitro* (QUEIROZ-TELLES, 1994; BOCCA et al., 2013; BOSCO; BAGAGLI, 2018).



Figura 3. Fotomicrografias de células de *Paracoccidioides* spp. evidenciando os diferentes estágios morfológicos desse fungo. (A) Estruturas micelianas observadas após o cultivo *in vitro* a temperatura de 25°C. A região dilatada do micélio, delimitada pelo quadro branco na imagem, corresponde à um artroconídio. (B) Células leveduriformes observadas após o cultivo *in vitro* a 37°C. As setas apontam alguns blastoconídios em brotamentos a partir de uma célula mãe. As imagens foram obtidas em aumento de 400x. Fonte: Gentilmente cedida pela Dr. Livia do Carmo (Laboratório de Biologia Molecular – ICB/UFG).

O termodimorfismo é a característica fundamental que permite *Paracoccidioides* spp. se adaptarem a dois nichos ecológicos distintos (TEIXEIRA et al., 2014). Os fungos sob a forma miceliana estão adaptados ao estilo de vida saprobionte, habitando os solos e obtendo energia a partir da decomposição da matéria orgânica. Uma vez inalados, a mudança da temperatura ambiente para a temperatura corporal dos hospedeiros, ativa um complexo processo de modulação da expressão gênica produzindo mudanças morfológicas e metabólicas que contribuem para a sobrevivência e evasão do mecanismos de resposta imune (TAVARES et al.,

2015). Apesar da PCM raramente aparecer como uma doença zoonótica, o termodimorfismo permite que os patógenos infectem uma variedade de hospedeiros mamíferos como tatús (HRYCYK et al., 2018), golfinhos (UEDA et al., 2017; SACRISTÁN et al., 2018), cães (RICCI et al., 2004; FONTANA et al., 2010), morcegos (PAZ et al., 2018), cavalos (ALBANO et al., 2015), dentre outros animais selvagens (MENDES et al., 2017a).

1.1.2 Abordagens terapêuticas contra a PCM

Os fungos causadores da PCM diferem de muitos outros causadores de micoses sistêmicas por serem susceptíveis a maioria do arsenal antifúngico. Entretanto, a escolha entre esses compostos deve levar em consideração a severidade da doença e os órgãos colonizados pelo patógeno (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, 2017). O processo de acompanhamento periódico dos pacientes ao longo da terapia antifúngica é parte fundamental do tratamento no sentido de avaliar a eficácia do fármaco escolhido e determinar a cura uma vez alcançados os seguintes critérios: I) Cura clínica: representada pelo desaparecimento dos sinais e sintomas além da normalização da taxa de sedimentação dos eritrócitos; II) Cura micológica: caracterizado pela ausência de células fúngicas em espécimes clínicos; III) Cura radiológica: ocorrendo quando os padrões radiológicos tornam-se estáveis com o gradual desaparecimento das lesões cicatriciais nos pulmões; IV) Cura imunológica: constituída principalmente pela estabilização dos níveis séricos de anticorpos anti-*Paracoccidioides* spp. (MENDES et al., 2017b).

Os fármacos de primeira opção incluem o itraconazol (ITZ), o cotrimoxazol (CMX) e a anfotericina B (AmB), sendo que este arsenal compartilha um restrito repertório de alvos moleculares (Figura 4). Fazendo parte da classe dos triazóis de primeira geração, o ITZ é caracterizado por sua estrutura heterocíclica contendo um anel com cinco átomos, sendo dois de carbono e três de nitrogênio. Ele apresenta um amplo espectro de ação fungicida atuando através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase que participa da via de biossíntese de ergosterol, e por consequência, impactando na estabilidade da membrana plasmática dos patógenos (PEYTON; GALLAGHER; HASHEMZADEH, 2015). No contexto do tratamento da PCM, o regime de uso mais amplamente adotado para o ITZ é de 200mg diários, sendo uma das primeiras alternativas de escolha para o tratamento de formas leves e moderadas da doença, podendo ser necessário um período de até doze meses de utilização para alcançar os critérios de cura (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A utilização do ITZ deve ser ponderada

entretanto, ao considerar a sua relativa indisponibilidade no sistema de saúde, além de não ser recomendado para o tratamento de PCM envolvendo o sistema nervoso central devido à sua incapacidade de transpor a barreira hematoencefálica (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

De forma alternativa ao ITZ, a recomendação do CMX é amparada por uma maior disponibilidade no sistema público de saúde do Brasil sendo indicado para o tratamento de neuro-PCM devido aos seus níveis adequados no fluido cefalorraquidiano. A posologia indicada para o CMX é de 480 a 960 mg a cada 12 horas, sendo necessários um período de até 24 meses para a conclusão do tratamento, constituindo esse extenso período, uma das principais desvantagens na utilização desse fármaco (SHIKANAI-YASUDA, 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). O CMX é uma associação sinérgica entre o sulfametoxazol e a trimetoprima que atuam inibindo, respectivamente, as enzimas diidropteroato sintase e diidrofolato redutase que participam da via de biossíntese de folato. Dessa forma, uma vez que o folato é utilizado como cofator enzimático para várias reações pertinentes à produção de nucleotídeos e aminoácidos, a sua inibição provoca prejuízos ao crescimento dos microrganismos (CAPASSO; SUPURAN, 2019).

A AmB, que por sua vez é utilizada nas formas graves e disseminadas da doença, faz parte da classe dos polienos. Sendo caracterizada pela estrutura macrocíclica de caráter anfifílico, essas moléculas possuem grande afinidade pela membrana plasmática e atuam neste local através da formação de complexos com o ergosterol produzindo poros nessa membrana que resultam no extravasamento de conteúdos intracelulares, dano oxidativo e, por consequência, a morte das células fúngicas (CAMPOY; ADRIO, 2017). A posologia varia de acordo com a formulação utilizada, sendo recomendado 0,5 a 0,7mg/kg/dia para a AmB-desoxicolato e 3 a 5mg/kg/dia para as formulações lipídicas até a melhora aparente dos sintomas e posterior manutenção do tratamento com as outras opções de antimicóticos disponíveis (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

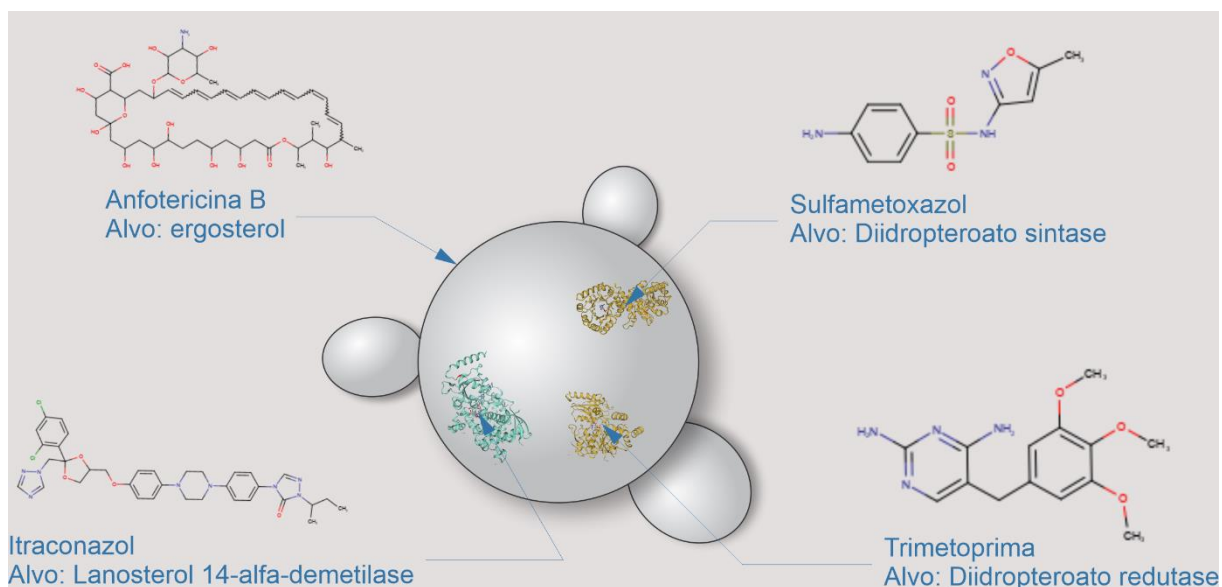


Figura 4. Principais antifúngicos utilizados no tratamento da PCM, suas estruturas e seus alvos moleculares esquematizados. Ambas as proteínas coloridas em amarelo representam os alvos da associação CMX, fazendo parte de uma mesma via de biossíntese de folato. Fonte: Autoria própria.

É necessário avaliar os problemas inerentes ao tratamento da PCM considerando o arsenal disponível. Existe uma grande preocupação de diminuir ao máximo o uso das diferentes formulações de AmB devido ao iminente risco de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, que podem ser atribuídos em grande parte à capacidade dessa molécula de se ligar também ao colesterol das células mamíferas (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Além dos efeitos colaterais e toxicidade dos antifúngicos, outro obstáculo característico do tratamento da PCM refere-se aos longos períodos de tempo exigidos para a conclusão (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Juntas, estas características contribuem para uma alta taxa de interrupção do tratamento pelos pacientes (ANDRADE et al., 2019). Dessa forma, essas questões trazem à tona a grande necessidade pela pesquisa de novas moléculas com potencial terapêutico contra a PCM na expectativa de ampliar o arsenal antifúngico com novas abordagens menos tóxicas mais eficientes a um curto prazo. Nesse sentido, embora muitas moléculas com potencial terapêutico já tenham sido descritas na literatura, incluindo diversos registros de patentes de compostos sugeridos para o tratamento da PCM, nenhum novo fármaco foi inserido no arsenal contra esta doença desde 2005 (DO CARMO SILVA et al., 2020). Uma possibilidade é que este descaso ocorra em função da doença afetar uma população marginalizada o que pode não atrair a atenção das grandes empresas farmacêuticas. Mesmo assim, estes fatos expõem a emergência para o incentivo da caracterização desses candidatos à fármacos para além dos estudos pré-clínicos.

1.2 Chalconas e seus derivados: moléculas privilegiadas exibindo promissoras ações biológicas

A natureza é uma fonte rica de uma diversidade de moléculas com propriedades biológicas, além de fornecer uma gama de modelos químicos que poderão ser utilizados em estratégias de descobrimento de novos compostos bioativos. Dentre estes compostos, os metabólitos secundários distinguem-se como estruturas químicas produzidas por vegetais que não desempenham funções essenciais nestes organismos. Entretanto, podem desempenhar papéis ecológicos como atração de agentes polinizadores, defesa contra herbívoros e fitopatógenos. Desde que o potencial bioativo destes compostos foi descoberto, vários esforços vêm sendo empregados no sentido de extrair, purificar e caracterizar estes fitocomponentes (OZASLAN; OGUZKAN, 2018).

Moléculas chalconas são estruturas químicas de ocorrência natural que são utilizadas como intermediários na via de biossíntese de compostos flavonoides (Figura 5), compreendem uma classe diversa de metabólitos secundários amplamente distribuídos entre os vegetais superiores desempenhando uma variedade de funções biológicas nesses organismos (HAVSTEEN, 2002). Os flavonoides são sintetizados pela via dos fenilpropanoides, transformando a fenilalanina em p-coumaroil-CoA. Em seguida, este último composto entra na via de biossíntese dos flavonoides pela ação da enzima chalcona sintase, produzindo esqueletos de chalconas naringenina que posteriormente podem ser convertidos a outras subclasses de flavonoides (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; DAVIES et al., 2020).

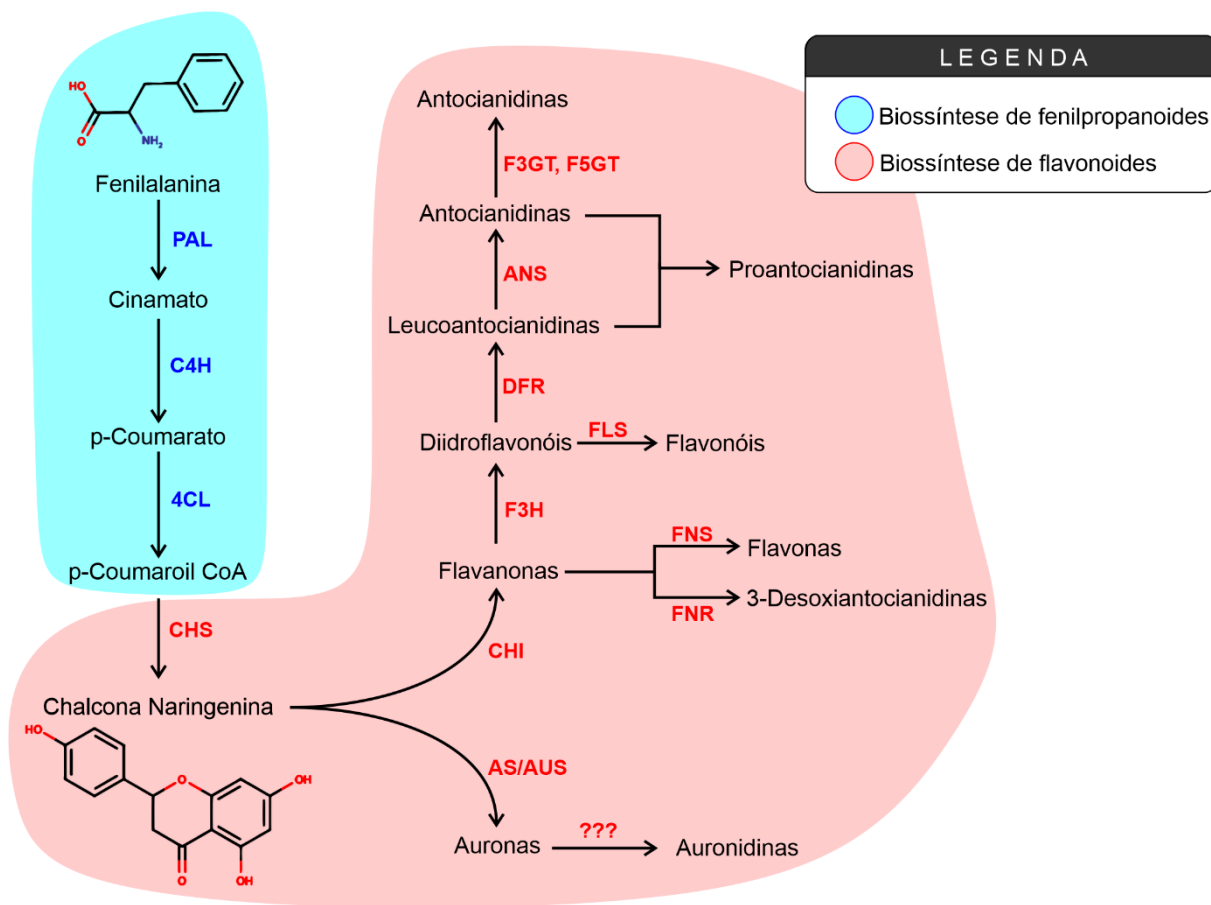


Figura 5. Representação esquemática da via de biossíntese de fenilpropanoides e de flavonoides. As estruturas do precursor fenilalanina e da chalcona naringenina estão representadas acima e abaixo de seus nomes, respectivamente. As enzimas que compõem as vias foram abreviadas: PAL – fenilalanina amônia-liase; C4H – cinamato 4-hidroxilase; 4CL – 4-coumarato:CoA ligase; CHS – chalcona sintase; CHI – chalcona isomerase; F3H – flavanona 3-hidroxilase; DRF – diidroflavonol 4-redutase; FNR – flavanona redutase; ANS – antocianidina sintase; F3GT – flavonoid 3-O-glicosiltransferase; A5GT – antocianidina 5-O-lucosiltransferase; AS/AUS – aurona sintase/areusidina; FNS – flavona sintase; FLS – flavonol sintase. Fonte: Modificado de Davies et al. 2020.

As chalconas têm se tornado uma das classes de flavonoides mais bem explorada no que diz respeito às suas propriedades bioativas. A estrutura básica de cadeia aberta das chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) consiste de dois anéis aromáticos ligados por um sistema carbonílico de três carbonos α,β -insaturados, podendo existir nas formas isoméricas *cis* e *trans* (Figura 6), dos quais o isômero *trans* é considerado o mais termodinamicamente estável (ZHUANG et al., 2017). Do ponto de vista químico, a estrutura dessas moléculas têm atraído a atenção dos pesquisadores devido ao grande número de hidrogênios substituíveis, o que permite a síntese de uma ampla variedade de derivados com promissoras atividades biológicas (GOMES et al., 2017).

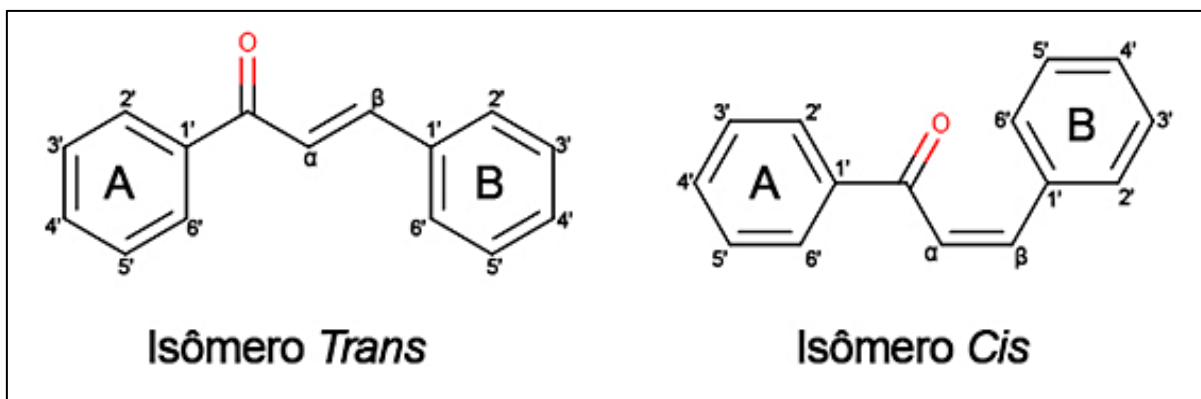


Figura 6. Representações estruturais e numéricas das formas isoméricas *Trans* e *Cis* das chalconas. Fonte: Autoria própria.

Como compostos biologicamente ativos, a metochalcona e a sofalcona são exemplos de derivados de chalconas aprovados, respectivamente, como um fármaco colerético e gastroprotetivo em um contexto de infecção por *Helicobacter pylori* (SAHU et al., 2012). Higgs e colaboradores, por sua vez, reportaram o potencial terapêutico de quatro derivados de chalconas com atividades ansiolítica, antidepressiva e analgésica em um ensaio utilizando camundongos como modelos *in vivo* (HIGGS et al., 2019). Não obstante, as atividades anti-inflamatória e antioxidante também já foram identificadas em derivados de chalcona (LIN et al., 2019b; SASIDHARAN et al., 2019).

Dentre as várias outras atividades terapêuticas que vêm sendo descobertas para as chalconas, é válido salientar os notáveis achados no campo da terapia anticâncer. Nas últimas décadas, várias chalconas foram reportadas desempenhando potencial atividade antitumoral tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*, demonstrando múltiplas funções e tendo alvos uma multiplicidade de processos celulares como o crescimento, proliferação celular, invasão e metástase (ZHANG et al., 2013). Silva e colaboradores encontraram que a forma isomérica *trans* da chalcona foi capaz de inibir o crescimento e induzir apoptose em células de osteosarcoma (U2OS) atuando através da modulação da expressão de diversos pró-oncogenes (SILVA et al., 2016). Algumas heteroaril chalconas também se mostraram eficientes ao desempenhar atividade antiproliferativa contra duas diferentes linhagens de células de câncer de mama humano (MDA-MB468 e MDA-MB231) (SOLOMON; LEE, 2012). Adicionalmente, muitos trabalhos vêm reunindo informações sobre a eficiência de uma diversa gama de derivados de chalconas contra várias linhagens de células cancerígenas. Em particular, as concentrações inibitórias na ordem nanomolar impressionam, além disso, diferente de outros fármacos anticâncer clinicamente úteis, as chalconas não demonstram muitas interações com o

DNA, gerando um baixo risco de mutagenicidade o que as tornam moléculas adequadas para o tratamento dessas patologias (DAS; MANNA, 2016).

A respeito de seu emprego no tratamento de doenças infecciosas, as chalconas também têm sido relatadas como poderosos recursos para o desenvolvimento de um novo arsenal de antivirais, antimaláricos, antifúngicos e antibacterianos. O xanthohumol é um exemplo de chalcona encontrada nas flores de lúpulo o qual já foi reportado como inibidor seletivo para o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em um mecanismo que parece envolver passos subsequentes à transcrição reversa. Este composto também demonstrou eficácia contra outros vírus que impactam a saúde humana com o vírus do herpes simples tipo 1 e 2 (HSV-1 e -2) e o citomegalovírus (CMV) (NOWAKOWSKA, 2007). Derivados de chalconas já foram identificados sendo ativos contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, uma das principais bactérias relacionadas à infecções nosocomiais e de comunidade que pode apresentar resistência a uma ampla variedade de antibióticos (OMOSA et al., 2016).

Outras bactérias clinicamente importantes também já foram reportadas sendo inibidas por compostos derivados das chalconas. Alguns exemplos incluem: *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* que foram sensíveis à compostos com estruturas híbridas entre chalcona e ditiocarbamato (AYMAN et al., 2019); e *Mycobacterium tuberculosis* que teve a sobrevivência reduzida em macrófagos após o tratamento com análogos de chalconas em um provável mecanismo de inibição de enzimas tirosina-fosfatases (MPtpA) que são essenciais para a sobrevivência desse patógeno no contexto da infecção (MASCARELLO et al., 2010). Adicionalmente, alguns trabalhos que discutiram as características estruturais importantes para a atividade antibacteriana das chalconas determinaram a importância da hidroxilação 2' ou 4' e da lipofilicidade do anel A (XIE et al., 2015).

Em um contexto de prospecção de antifúngicos, a licochalcona-A (Lico-A), que ocorre nas raízes de plantas do gênero *Glycyrrhiza* spp., foi reportada impactando na susceptibilidade de cepas de *Candida albicans* em concentrações próximas às encontradas para o antifúngico convencional fluconazol, proporcionando uma significativa redução na formação de biofilme e exibindo mínimos efeitos citotóxicos em um modelo de co-cultura com fibroblastos (SELEEM et al., 2016). Adicionalmente, Lin e colaboradores estudaram a eficiência da loureirina-A (Lou-A) contra a formação de biofilmes em *C. albicans*. Essa molécula é o principal componente da resina extraída da angiosperma *Dracaena cochinchinensis*, a qual é muito apreciada na

medicina tradicional chinesa. No estudo em questão a Lou-A foi eficiente em inibir a formação de biofilmes de maneira dose-dependente, promovendo a modulação da expressão de genes envolvidos na adesão, no desenvolvimento de hifas e da formação do biofilme. O composto foi capaz de prolongar a sobrevivência à candidíase em modelos *in vivo* de infecção em *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* pela inibição do crescimento do patógeno (LIN et al., 2019a).

Muitos trabalhos vêm utilizando as chalconas como base para o desenvolvimento de novas arquiteturas moleculares por meio de estratégias de hibridização molecular. Essa abordagem é baseada na compreensão das propriedades farmacofóricas das moléculas bioativas de interesse e posterior fusão dessas unidades em novos modelos químicos híbridos (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Um derivado sintético com grupamentos hidroxilo 4' e 6' demonstrou efeito fungistático contra as principais espécies envolvidas em candidíase, tendo o ergosterol como um dos possíveis alvos em *C. albicans* e em *C. krusei* (ANDRADE et al., 2018). A ação antifúngica do isômero *Trans* da chalconas também foi avaliada contra *Trichophyton rubrum*, demonstrando valores de concentração mínima inibitória (CMI) de 7,5 e 1,9 µg/mL, respectivamente para uma cepa selvagem e um mutante carregando uma versão defeituosa de um gene responsável por um transportador da família ABC associado a mecanismos de multirresistência. Além disso, os mecanismos subjacentes à essa inibição parecem envolver a inibição simultânea da síntese de ergosterol e ácidos graxos (BITENCOURT et al., 2013). Um estudo envolvendo a síntese de uma série de moléculas fluoradas com estruturas híbridas entre chalcona e 1,2,3-triazóis demonstrou tanto atividades antibacteriana quanto antifúngica contra *C. albicans* e *Aspergillus niger* (YADAV et al., 2018). Kant e colaboradores também reportaram quatro moléculas de 1,2,3-triazóis ligados a chalconas com ações antifúngicas fracas e moderadas comparadas ao fluconazol em um rastreio contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *A. niger* e *A. fumigatus* (KANT et al., 2016). Estruturas híbridas entre chalconas e imidazo[2,1-*b*]-1,3,4-thiazol também se mostraram eficientes principalmente contra uma cepas de *C. neoformans* (ALWAN et al., 2015). Juntos estes dados evidenciam a hibridação molecular como uma ferramenta favorável para o avanço na exploração do potencial antimicrobiano das chalconas.

Poucos trabalhos, entretanto, foram desenvolvidos utilizando os patógenos da família Ajellomycetaceae como alvos na avaliação da ação antifúngica das chalconas quando comparados aos números de trabalhos já publicados com *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Cryptococcus spp.* Derivados de chalconas hidrossolúveis foram utilizadas como moléculas fotosensibilizadoras em uma proposta de terapia antimicrobiana fotodinâmica para inativar *Histoplasma capsulatum*. Como resultado, os autores observaram que mesmo em baixas concentrações, as chalconas hidrossolúveis puderam promover total inibição do fungo após 15 minutos de incubação a baixas doses de radiação luminosa; além de promover mínimos danos às células hospedeiras (MELO et al., 2017).

Em um estudo onde uma série de quinolinil N-óxido chalconas foram sintetizadas, *P. brasiliensis* mostrou-se como o patógeno fúngico mais afetado por estas estruturas, apresentando-se mais sensível a estes compostos quando comparados ao tratamento *in vitro* com o antifúngico comercial cotrimoxazol (TAVARES et al., 2011). Estudos posteriores, buscando compreender os mecanismos envolvidos na atividade de algumas dessas quinolinil N-óxido chalconas, indicaram que os compostos nomeados **4c** e **4e** promoveram desordens na membrana plasmática, no citoplasma e na morfologia das células; além de demonstrar que o composto **4c** possui maior eficiência no controle da infecção comparado ao itraconazol em um modelo *in vivo* (DE SÁ et al., 2015). Mais recentemente, duas outras quinolinil-chalconas (batizadas pelos pesquisadores com **3b** e **3e**) também foram verificadas quanto aos mecanismos envolvidos na inibição de *P. brasiliensis*. Nesta ocasião, os autores mais uma vez confirmaram a membrana plasmática como um possível alvo desses compostos, mas de uma maneira independente do ergosterol (DE SÁ et al., 2017).

Recentemente, nosso grupo empregou uma metodologia de triagem virtual com o propósito de identificar, em uma biblioteca de compostos, um subconjunto de moléculas com as propriedades de interesse presentes nas quinolinil N-óxido chalconas reportadas com atividade anti-*Paracoccidioides* spp. Como resultado, oito 5-nitroheteroaril chalconas, encontradas pela metodologia, se destacaram como moléculas promissoras contra os isolados *Pb01*, *Pb03*, *Pb18* e *EPM83* a baixas concentrações além de não promover citotoxicidade contra células mamíferas. Em última análise, a molécula (2E)-1-(2-methylphenyl)-3-(5-nitrofuranyl)prop-2-en-1-one nomeada como **composto 3** (Figura 7) também demonstrou efeitos aditivos com os antifúngicos comerciais cotrimoxazol e anfotericina B, sendo apontado

pelos autores como um novo composto promissor para o tratamento da PCM (SILVA et al., 2018).

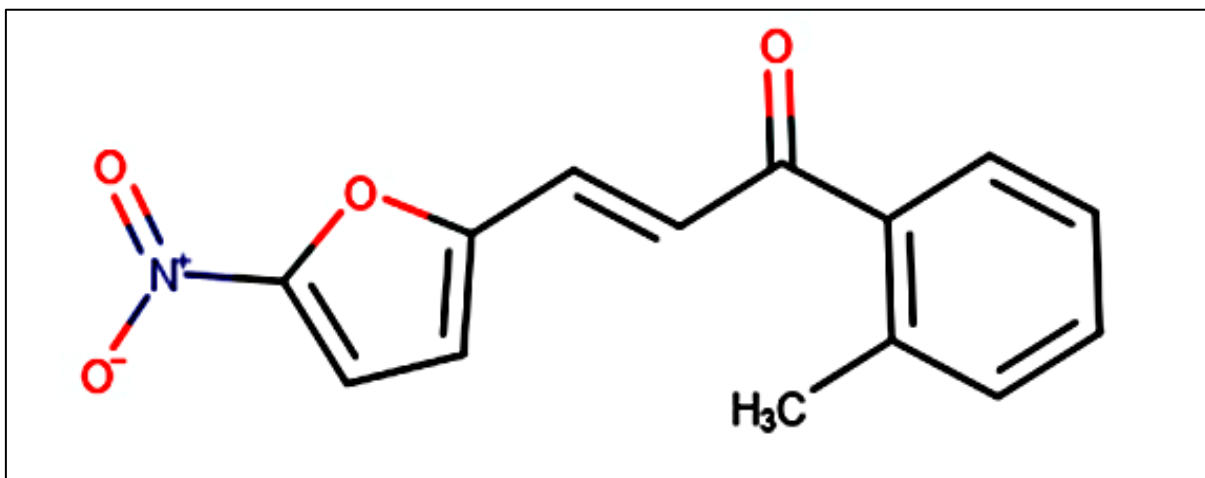


Figura 7. Representação estrutural do Composto 3. Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de ação dessa nova molécula, empregaremos neste trabalho uma metodologia de proteômica comparativa afim de compreender as mudanças metabólicas induzidas em *P. brasiliensis* na resposta a este composto.

1.3 Abordagem proteômica na descoberta de alvos biológicos de compostos antimicrobianos

Essencialmente, as proteínas são moléculas fundamentais para uma ampla gama de processos biológicos. Elas atuam em uma célula de maneira conjunta e coordenada formando uma intrincada rede. Esta complexa organização molecular, por sua vez, se adapta a estímulos endógenos e/ou exógenos ao longo do tempo através da expressão gênica, conferindo assim as diferenças funcionais pertinentes para que as células consigam lidar com as alterações ambientais. A este conjunto completo de proteínas expressas na célula, em um determinado momento é dado o nome proteoma (AEBERSOLD; MANN, 2016).

Por sua vez, o conjunto de técnicas utilizadas para determinar as variações e caracterizar esses conjuntos proteicos, se consolidam como um campo de pesquisa com amplas aplicações, sendo denominado de proteômica (ASLAM et al., 2017). Dessa forma, com a proteômica é possível adquirir um melhor entendimento acerca dos processos biológicos ocorrendo em células ou órgãos completos; identificar novos alvos de drogas e investigar seus mecanismos de ação; além de oferecer novas alternativas de diagnósticos de doenças e abordagens

terapêuticas a partir da compreensão da expressão proteica (GILLET; LEITNER; AEBERSOLD, 2016).

Dentre as técnicas que vêm ganhando relevância na literatura, destacam-se as análises proteômicas baseadas em espectrometria de massas (EM). As estratégias em EM dependem fundamentalmente da identificação da razão massa-carga (m/z) de íons em fase gasosa. Para alcançar este objetivo, os componentes dos espectrômetros de massas primeiramente convertem as moléculas de analitos em íons de fase gasosa através de uma fonte de ionização; posteriormente, esses íons são separados por um analisador de massas na base m/z ; e então finalmente um detector registra os valores m/z das moléculas (HAN; ASLANIAN; YATES, 2008).

Essencialmente, duas estratégias distintas denominadas de abordagem *top-down* e abordagem *bottom-up* são empregadas nas análises de EM. A primeira baseia-se na ionização de um pequeno número de proteínas intactas, fornecendo uma extensiva caracterização quanto as suas isoformas, modificações pós traducionais, estruturas secundárias e terciárias, além da identificação de padrões e interfaces de interação em complexos proteicos. Alternativamente, as abordagens *bottom-up* se utilizam da detecção de fragmentos proteicos (peptídeos) gerados a partir de uma digestão prévia de uma amostra proteica complexa para inferir quais proteínas estão presentes (GILLET; LEITNER; AEBERSOLD, 2016; HAN; ASLANIAN; YATES, 2008).

Dentre as diversas aplicações das análises proteômicas para as ciências, o seu papel na indústria farmacêutica vem ganhando destaque, podendo ser empregada em praticamente todas as etapas do desenvolvimento e pesquisa de novos fármacos (FRANTZI; LATOSINSKA; MISCHAK, 2019). Neste contexto farmacológico, a EM viabiliza duas principais abordagens experimentais distintas, porém complementares:

- (I) As primeiras, são as abordagens diretas, comumente referidas como químioproteômica. Nelas são utilizadas técnicas que promovem o reporte sobre a afinidade entre as espécies químicas de interesse com as proteínas-alvo. Além disso também é possível avaliar as possíveis modificações estruturais e na estabilidade dos polipeptídios induzidas pelos compostos (DREWES; KNAPP, 2018).

- (II) Por sua vez, as abordagens indiretas, ou proteômica global, propõem-se a avaliar o perfil proteico completo expresso por uma célula no contexto da presença de um fármaco ou candidato. Essa estratégia permite assim, acessar as respostas adaptativas dos organismos fornecendo informações sobre mecanismos de ação e vias-alvo (WECKE; MASCHER, 2011; WENZEL; BANDOW, 2011).

No que concerne à pesquisa de compostos anti-PCM, as abordagens proteômicas baseadas em EM vêm sendo utilizadas desde 2015, quando a adaptação metabólica global de *P. brasiliensis* foi verificada durante a resposta do patógeno à presença do composto natural argenilactona. Nesta ocasião o estudo mostrou uma adaptação metabólica global do fungo, reprimindo a expressão de enzimas relacionadas à glicólise, ciclo do glioxilato e ciclo do ácido cítrico provocando um desvio em direção ao ciclo do metilcitrato e a beta-oxidação (PRADO et al., 2015). Em adição, a EM também foi utilizada na pesquisa da ação fungicida de derivados tiossemicarbazida (TSC). Em um primeiro momento, utilizando de uma abordagem direta de quimioproteômica, Borba e colaboradores verificaram que os derivados TSC foram capazes de inibir a enzima formamidase, demonstrando a potencial ação sob um iminente fator de virulência em *P. brasiliensis* (BORBA et al., 2018). Complementarmente, os compostos TSC também foram encontrados modulando a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, defesa celular, virulência, destinos proteicos, ciclo celular e processamento de DNA (E SILVA et al., 2018). Dessa forma, estes trabalhos retratam a robustez da análise proteômica na investigação de processos-alvo que são modificados pela exposição a moléculas antimicrobianas de interesse.

2. JUSTIFICATIVA

Dentre os problemas citados na literatura médica em relação à terapia anti-PCM, alguns dos mais frequentemente referidos dizem respeito ao longo período de utilização, a elevada toxicidade e efeitos colaterais inerentes aos agentes quimioterápicos disponíveis para o manejo dessa infecção. Tais problemas persistem mesmo um século após a descoberta do agente etiológico, o que evidencia a necessidade em fomentar pesquisas que se comprometam a descobrir e caracterizar novas moléculas com potencial antifúngico contra os *Paracoccidioides* spp.

Na perspectiva de validação de compostos naturais e seus derivados apresentando atividade antimicrobiana, a classe das chalconas vem sendo extensivamente assinalada com potencial terapêutico contra diversos patógenos incluindo bactérias e fungos. Nesse contexto, justifica-se o interesse desse trabalho em minuciar os efeitos do derivado chalcona denominado **composto 3**, previamente identificado por triagem virtual, sob a atividade metabólicas de *P. brasiliensis*.

Desde sua introdução na pesquisa de agentes antimicóticos contra os fungos *Paracoccidioides* spp., as abordagens baseadas em proteômica têm desempenhado importante papel em esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na inibição do crescimento desses microrganismos por diversas moléculas. Dessa forma, o emprego de uma metodologia de proteômica global poderá ser útil para elucidar, pela primeira vez, as mudanças metabólicas provocadas por este derivado chalcona em *P. brasiliensis* e assim, contribuir para a caracterização da atividade antifúngica desse composto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar as mudanças metabólicas causadas pelo **composto 3** em *P. brasiliensis* por abordagem proteômica.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar as proteínas diferencialmente expressas por *P. brasiliensis* por uma abordagem proteômica;
2. Avaliar a afinidade do **composto 3** pela enzima diidropteroato sintase por uma estratégia *in silico* de ancoragem molecular;
3. Descrever o efeito do **composto 3** sobre o consumo de glicose pelo fungo;
4. Analisar o efeito do **composto 3** sobre o conteúdo lipídico do fungo;
5. Determinar o efeito do **composto 3** sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular no fungo;
6. Avaliar o efeito do **composto 3** sobre a atividade mitocondrial do fungo;
7. Propor um modelo para as mudanças metabólicas induzidas pelo **composto 3 da chalcona**;
8. Analisar o efeito do **composto 3** na fluidez da membrana plasmática.

A rectangular area at the bottom of the page features a blurred, grayscale microscopic image of cells. The cells are roughly spherical and arranged in a cluster, with some showing internal structures. The text 'Capítulo 2' is overlaid on this image in a large, white, sans-serif font.

Capítulo 2

Artigo submetido na revista Future Microbiology

PROTEOMIC IDENTIFICATION OF METABOLIC CHANGES IN *Paracoccidioides brasiliensis* INDUCED BY CHALCONE DERIVATIVE

Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior¹, Livia do Carmo Silva¹, Olívia Basso Rocha¹, Amanda Alves de Oliveira¹, Igor Godinho Portis¹, Antonio Alonso², Lais Alonso², Kleber Santiago Freitas e Silva¹, Marcelo do Nascimento Gomes^{3,4}, Célia Maria de Almeida Soares¹, Maristela Pereira^{1*}

¹Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

²Institute of Physics, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

³InSiChen:Drug Discovery, Goiás State University, Anápolis, Goiás, Brazil.

⁴Faculdade Metropolitana de Anápolis, Anápolis, Goiás, Brazil.

Correspondence: Maristela Pereira, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Goiás, Avenida Esperança, s/n, ICB2, Sala 206, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil; Telephone: +556235211110; E-mail: maristelaufg@gmail.com.

ABSTRACT

Aim: To access the metabolic changes caused by a chalcone derivative (**compound 3**) through a proteomic approach. **Methods:** Proteomic analysis was performed after nine hours of *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts (*Pb18*) cells incubation with the **compound 3** at minimal inhibitory concentration. The proteomic findings were validated through *in vitro* and *in silico* assays. **Results:** Exposure to the compound led to the downregulation of proteins associated with glycolysis and gluconeogenesis, beta-oxidation, citrate cycle and the electron transport chain. **Conclusion:** Compound 3 caused an energetic imbalance in the fungus metabolism and deep oxidative stress. Additionally, the *in silico* molecular docking approach pointed to this molecule as a putative competitive inhibitor of dihydropteroate synthase.

Keywords: chalcone; antifungal; *Paracoccidioides brasiliensis*; proteomic; molecular docking.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an important endemic mycosis in Latin America [1]. The infection occurs upon inhalation of *Paracoccidioides* spp. fungi propagules present in the soil or in the air [2]. PCM is recognized as a neglected tropical disease by the World Health Organization due to its high impact on the affected population, such as rural work [3,4]. Despite the severity of the disease, no successful therapeutic alternatives have been developed to substitute classic treatments with itraconazole, cotrimoxazole and amphotericin B. These drugs normally present high toxicity and undesirable drug interactions, requiring a long exposure period that may hinder treatment adherence by the patients [5,6]. Additionally, the appearance of sequelae after the treatment may limit the quality of life and economic productivity of these patients [4]. This highlights the importance of research on the development and characterization of molecules with antifungal potential against PCM.

Chalcone molecules (1,3-diaryl-prop-2-en-1-ones) and their derivatives have gained great attention due to their broad therapeutic properties, that have been reported everywhere [7]. Such compounds are produced by the flavonoid biosynthesis pathway and are described as

core components of plants that support their interaction with the environment acting from pigments that attract pollinators to molecules that provide protection against herbivores [8,9]. From a chemical perspective, the basic scaffold of chalcones consists of two aryl rings connected by an α,β -unsaturated carbonyl system. Thus, a great variety of derivative molecules can be synthesized due to a large number of replaceable hydrogens and simple synthetic methods [7,10].

The effectiveness of natural and synthetic chalcones have been tested against several fungal species including *Trichophyton rubrum* [11], *Candida albicans* [12,13], *Cryptococcus neoformans* [14], *Histoplasma capsulatum* [15] and *P. brasiliensis*, which was the fungal pathogen most widely affected by quinolinyl chalcones [16]. Moreover, de Sá *et al.* characterized quinolinyl-related compounds that cause disorders in the plasma membrane of microorganisms [17,18].

Based on the dataset of quinolinyl chalcones [16], our research group employed a shape-based virtual screening methodology to select a subset of novel anti-PCM compounds. As result, three 5-nitroheteroaryl chalcones showed to be potent against the *Pb01*, *Pb03*, *Pb18*, and *EPM83* species at low concentrations. In this way, the **compound 3** was highlighted as a promising new prototype against *Paracoccidioides* spp. due to its structural dissimilarities to the standard anti-PCM drugs and because of its additive effects with the conventional antifungal drugs cotrimoxazole and amphotericin B [19].

Therefore, to understand the mechanistic bases of the antifungal activity of **compound 3**, we assessed the metabolic changes induced in *P. brasiliensis* after exposure to this molecule through a proteomics approach. Subsequently, we experimentally validated the proteomic findings and the results showed that chalcone derivative impaired the fungus' ability to use glucose and lipids as energy sources. Additionally, the compound impaired the electron transport chain (ETC), increasing the production of intracellular reactive oxygen species (ROS). Finally, *in silico* molecular docking approaches showed a possible mechanism of action similar to sulfa drugs. Taken together, this evidence further supports chalcone as a promising alternative to the classical treatment of PCM.

MATERIALS AND METHODS

MICROORGANISMS AND CULTURE MEDIUM

The yeast phase cells of *P. brasiliensis* (*Pb18*) (ATCC32069) were maintained in solid Fava-Netto medium (0.3% (w/v) peptone protease, 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 1% (w/v) brain and heart infusion, glucose 4% (w/v), NaCl 0.5% (w/v), 1.2% (w/v) agar and gentamicin 5 µg/mL) at pH 7.2 at 37°C. Prior to the *in vitro* assays the yeast cells were cultured for 72 h in liquid Fava-Netto's medium at 37°C, under agitation. Next, 1x10⁵ cells/mL were inoculated in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640 - Sigma-Aldrich) in the presence (treated) or absence (control) of **compound 3** at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 7.3 µM [19] at 37°C under agitation.

CELL VIABILITY ASSAY

The cell viability of *P. brasiliensis* was measured temporally after incubation with **compound 3** or in the absence of it. An aliquot of 1 ml was collected after 3, 6, 9, 12, 24, 36, and 48 h and then incubated with propidium iodide (1 µg/ml) for 20 min in the dark and at room temperature. Posteriorly, the cells were analyzed by flow cytometry (C6 Accuri, Accuri Cytometers, Ann Arbor, USA). The analysis was performed in triplicates and 10,000 events were acquired for each sample.

PROTEIN EXTRACTION, DIGESTION, AND NANOUPLC-MS^E ANALYSIS

After 9 h of incubation with **compound 3**, cells were centrifuged at 5,000 x g and resuspended in ammonium bicarbonate buffer (57 mM, pH 8.8). Protein extraction proceeded with mechanical cell lysis using glass beads in a Bead-beater shaker (BioSpec, Bartlesville, Oklahoma, USA) during 5 cycles of 30 seconds each, to expose the proteins in solution. Cell lysis solutions were then centrifuged at 5,000 x g for 15 min at 4°C in order to obtain the protein extract. The integrity of the proteins was later verified by electrophoresis through SDS-PAGE and quantified by the reaction described by Bradford [20].

Proteins were digested according to a previously established protocol [21,22]. In summary, for 150 µg of protein extract of both conditions, 25 µl of RapiGESTTM 0,2% (v/v) (Waters Corporation) were added with subsequent incubation at 80°C for 15 min. Subsequently, 2.5 µl of dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare, Illinois, USA) was added at 100 mM and the sample was again incubated at 60°C for 30 min. Then, 2.5 µl of a 300 mM iodacetamide solution (GE Healthcare) was added to the sample and it was incubated in the dark at room temperature

for 30 min. Finally, 10 μ l of trypsin (50 ng/ μ l) were added to the mixture and the samples were digested at 37°C for 16 h.

The precipitation of RapiGEST™ was performed by adding 10 μ l of a 5% (v/v) trifluoroacetic acid solution (Sigma-Aldrich), followed by incubation at 37°C for 90 min. The samples were then centrifuged at 13,000 x g at 6°C for 30 min and the supernatant was subsequently dried at a vacuum concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany). All peptides were resuspended in 45 μ l of a solution containing 20 mM of ammonium formate and 150 fmol/ μ l of phosphorylase B.

The separation of tryptic peptides by liquid chromatography nanoscale was performed using the nanoACQUITY™ (Waters Corporation). The peptides were separated using a gradient of five fractions of 10.8%, 14%, 16.7%, 20.4% and 65% of acetonitrile and 0.1% (v/v) of formic acid with a flow rate of 2,000 μ l/min. The source was operated in a nano-ESI (+) positive ionization mode. To perform an external calibration, the masses were corrected based on Glu-fibrinopeptide B (GFP; Sigma). Mass spectrometry analysis was performed on a Synapt G1 MS™ (Waters, USA) equipped with a NanoElectronSpray source and two mass analyzers: a quadrupole and a time-of-flight (TOF) sensor operating in V-mode. Data were obtained using the instrument in MS^E mode. The sample was analyzed in three replicates.

Mass spectrometry data were processed using ProteinLynx Global Server, version 2.4 (Waters Corporation). The data were subjected to automatic background subtraction, deisotoping and charge state deconvolution. After processing, each ion comprised an exact mass-retention time that contained the retention time, intensity-weighted average charge, inferred molecular weight based on charge and m/z. The processed next spectra were searched against *Pb18* protein sequences (Broad Institute; http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) together with the reverse sequences.

To classify the proteins' expression as induced or repressed by the exposure to **compound 3**, comparison criteria based on a fold change threshold value of 1,3 was used [23]. The differentially expressed proteins were functionally categorized and their biological functions were proposed according to the Functional Catalogue (FunCat) [24].

GLUCOSE DOSAGE AND INTRACELLULAR LIPID CONTENT

After 6, 9, 12, and 24 h of exposure to **compound 3**, 10 μ l of culture supernatants, both of treated and control conditions, were collected to verify the glucose concentration through a colorimetric reaction according to the protocol provided by the enzymatic glucose kit (Doles Ltda, Goiânia, Goiás). The absorbances were measured under a spectrophotometer at 510 nm.

To determine whether exposure to **compound 3** caused interference in the presence of intracellular lipid droplets, control and treated cells were collected after 9, 12, and 24 h and then labeled with 2 μ g/ml of the Nile Red (Sigma Aldrich) hydrophobic fluorescent probe. The reaction was processed in the dark for 15 min at room temperature. Next, cells were washed twice with PBS 1x, observed under a fluorescence microscope (AxioCam MRc-Scope A1) and analyzed through the 515-575 nm filter. The fluorescence intensity (FI) was determined using the AxioVision software (Carl Zeiss) which provided the pixel's densitometric mean (DM) values in cells labeled with the probe. To avoid any interference in the FI due to the formation of cell clusters, only non-overlapping cells with well-defined borders from three microscope slides were used for quantification. Statistical differences were evaluated using Student's t-test, considering p values < 0.05 as significant.

DETERMINATION OF MITOCHONDRIAL INTEGRITY AND ACTIVITY

We assessed whether the stress condition created by exposure to the **compound 3** would cause any alteration in mitochondrial integrity and activity. For this purpose, we used a double-labeling approach with the fluorescent probes Rhodamine 123 (Sigma-Aldrich) and MitoTracker Green FM (InvitrogenTM). In summary, we harvested yeast cells exposed to **compound 3** for 24 h and incubated them with Rhodamine 123 (2,4 μ M) and MitoTracker Green FM (400 nM) for 45 min in the dark at 37°C. After incubation, cells were washed with PBS 1x three times and observed under a fluorescence microscope (AxioCam MRc-Scope A1) and analyzed with the 515-575 nm filter for Rhodamine 123 and the 450-490 nm filter for MitoTracker Green FM. The FI was determined for both staining probes using the AxioVision software (Carl Zeiss). To avoid any interference in the FI due to the formation of cell clusters, only non-overlapping cells with well-defined borders, from three microscope slides, were used for quantification. Statistical differences were evaluated using Student's t-test, considering p values < 0.05 as significant.

EVALUATION OF INTRACELLULAR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PRODUCTION

To assess whether exposure to the **compound 3** cause any changes in the intracellular ROS production, we stained both control and treated yeast cells for 24 h, with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich) at 25 μ M in the dark for 25 min. Then, cells were washed three times with PBS 1x and analyzed under a fluorescence microscope (AxioCam MRc-Scope A1) through the 450-490 nm filter. The FI was determined using the AxioVision software (Carl Zeiss). To avoid any interference in the FI due to the formation of cell clusters, only non-overlapping cells with well-defined borders, from three microscope slides, were used for quantification. Statistical differences were evaluated using Student's t-test, considering *p* values < 0.05 as significant.

SPIN LABELING FUNGAL MEMBRANE AND EPR SPECTROSCOPY

After incubation, the control and treated samples were centrifuged at 25,000 x g at 4°C for 10 min. The supernatant was removed and the cells were suspended in 2 ml of PBS 1X and centrifuged again. The pellet volume of each sample was completed to 50 μ L with PBS. Then, the lipid spin-label 5-DSA was incorporated in the fungus membranes as described previously for the Leishmania parasite [25–27]. In brief, a spin-label film was prepared on the bottom of a glass tube using a 1 μ L aliquot of ethanolic solution containing the 5-DSA at 4 mg/mL and after evaporation of the solvent, 50 μ L of samples containing fungi ($\sim 1 \times 10^{10}$ cells) were added to the spin-label film and gently agitated. For the EPR measurements, the spin-labeled sample was transferred to 1-mm-i.d. capillary tube that after being sealed with flame was centrifuged at 25,000 x g at 4°C. The EPR spectra were recorded using an EPR EMX-Plus spectrometer of Bruker (Rheinstetten, Germany) through the following instrumental settings: microwave power, 2 mW; modulation frequency, 100 kHz; modulation amplitude, 1.0 G; magnetic field scan, 100 G; sweep time, 168 s; and sample temperature, 25°C.

MOLECULAR DOCKING

The SMILES chemical file format of the chalcone, 4-aminobenzoic acid and sulfamethoxazole were obtained in the PubChem server [28] and carefully standardized according to the protocol proposed by Fourches and colleagues [29]. After structure standardization, up to 2,000 conformations were generated for each drug using OMEGA

v.3.0.0.1 software [30], while the protonation states at neutral pH (7.4 ± 1.0) and AM1-BCC charges [31] were estimated using QUACPAC v.1.7.0.2 [32].

The FASTA sequence of dihydropteroate synthase was obtained in the NCBI and the 3D structure was built using the SWISS-MODEL server [33]. Four main steps were used to build the homology model: (a) identification of structural template in the Protein Data Bank (PDB) [34]; (b) alignment of protein sequences and template structures; (c) model building; and (d) analysis of the geometrical and stereochemical quality of the structures. Then, the best homology model was structurally optimized using the 3Drefine server [35], which refined the model in two stages, the first by optimizing the hydrogen network and the second by minimizing energy using composite physics and knowledge-based force fields [36]. The 3D structures were then imported into the H++ server [37] and the protonation states of their residues were estimated at neutral pH (7.0). Lastly, the structural reliability of the model was evaluated using MolProbity [38].

The resultant protein model was then subjected to the grid-generation protocol using a molecular probe available on OEDocking suite v.3.2.0 [39] for the detection of binding pockets around the protein. Molecular docking details are available in Supplementary Table S1. Finally, molecular docking calculations were performed using the high-resolution protocol of the FRED program with the ChemGauss4 score function [40], both available on the OEDocking suite.

RESULTS AND DISCUSSION

METABOLIC CHANGES IN *P. brasiliensis* IDENTIFIED BY PROTEOMIC ANALYSIS

To proceed with the proteomic analysis, we first tried to assess the viability of *P. brasiliensis* yeast cells in the presence and absence of **compound 3** to 48 h. We observed that within 9 h of exposure, around 90% of the cell population was viable (Figure 1A). This exposure time was chosen to perform the proteomic analysis, to minimize possible biases in the differential expression of proteins due to the analysis of a high percentage of dead cells.

Considering a 1.3-fold change value, we were able to identify 258 differentially expressed proteins, of which 89 were upregulated and 169 downregulated in the presence of the chalcone derivative (Supplementary tables S2 and S3, respectively). Fungus' metabolic

response to the compound showed the modulation of the protein expression from 9 different functional categories, besides the hypothetical proteins (Figure 1B and C).

Among the upregulated proteins, a greater number of proteins related to metabolism and protein synthesis (16.8% and 13.4%, respectively) were found (Figure 1B). Lower number of proteins were classified into protein fate (7.8%); cell cycle and DNA processing (6.7%); transcription (4.4%); cellular transport, transport facilitation and transport routes (4.4%); energy (3.3%); protein with binding function or cofactor requirement (2.2%); cell rescue, defense and virulence (2.2%) and cellular communication/signal transduction mechanisms (1.1%) (Figure 1B).

Alternatively, among the downregulated proteins, four main functional categories were identified. Metabolism (21.3%), protein fate (11.2%), protein synthesis (10%) and energy (7.1%) were categories with higher number of proteins (Figure 1C). Additionally, smaller amounts of proteins were found in the following categories: protein with binding function and cofactor requirement (4.7%); cell rescue, defense, and virulence (4.7%); transcription (2.9%); cellular transport, transport facilitation, and transport routes (1.7%); cell cycle and DNA processing (1.1%) (Figure 1C).

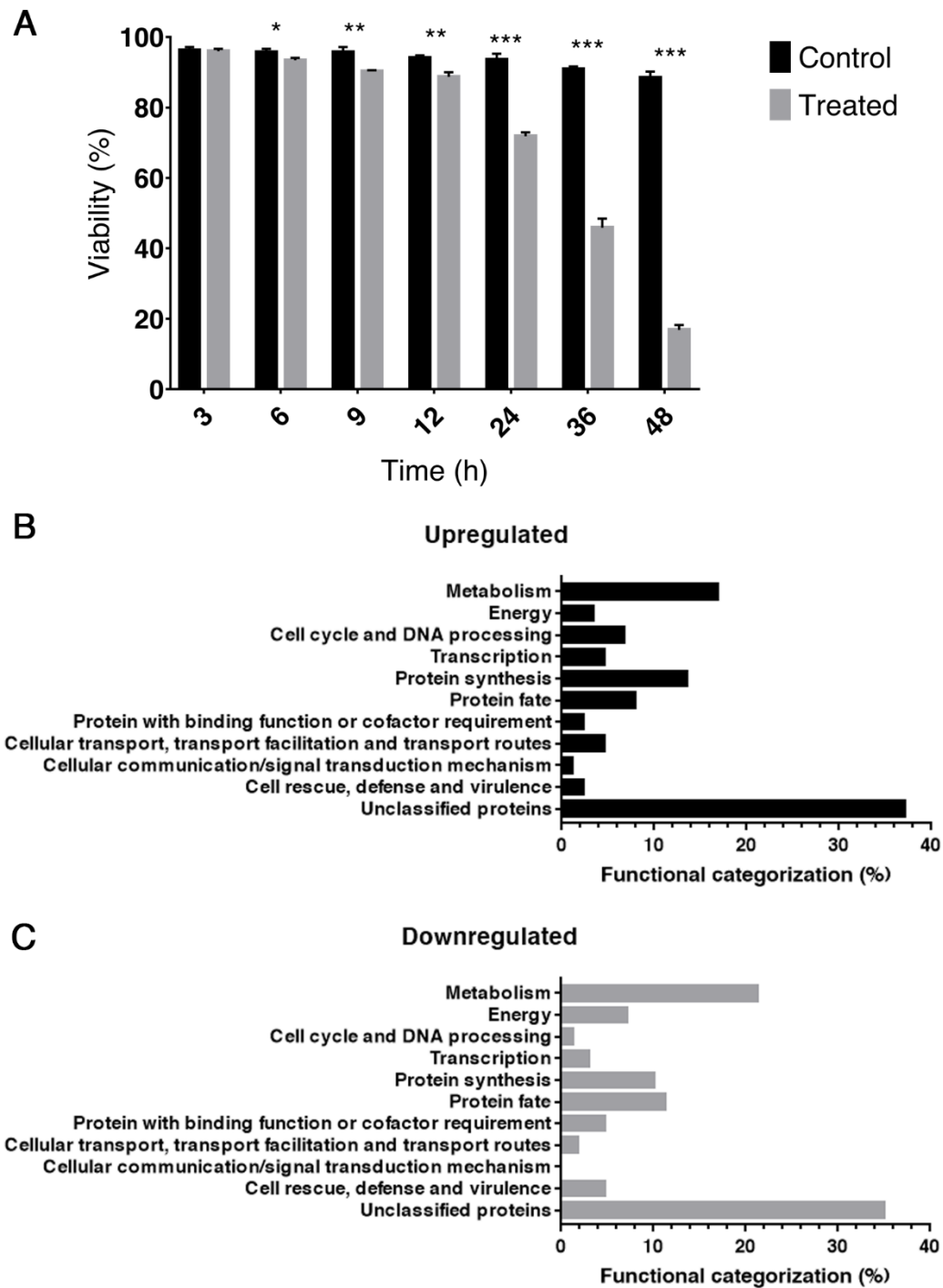


Figure 1: Viability of *P. brasiliensis* yeast cells exposed to compound 3 and functional categories of differentially expressed proteins identified by proteomic analysis. (A) The viability of cells exposed (treated) or not (control) to **compound 3** were compared and expressed in the graph as the mean (\pm standard deviation) of three experimental replicates of the living and dead cells' populations. The asterisks (*), (**), and (***) indicate the significant differences between treated and control with p -values < 0.05 , < 0.01 , and < 0.001 , respectively according to the Student's t Test. The graphs that follow express the percentage (%) of upregulated (**B**) and downregulated (**C**) proteins in different functional categories taking into account a fold change of 1.3.

COMPOUND 3 CAUSED AN IMPAIRMENT IN *P. brasiliensis*' GLUCOSE AND LIPID CONSUMPTION

The expression of some proteins related to metabolism and energy production was decreased under the conditions of the present study. Among these 6 were related to lipid metabolism, 4 related to carbohydrate metabolism and 3 related to glycolysis and gluconeogenesis (Figure 2A and Supplementary Table S3). The downregulated proteins related to lipid metabolism may lead to a disruption of the β -oxidation pathway, which catabolizes fatty acids and yields energy precursors, such as acetyl-CoA. Other compounds characterized as antifungals prototypes present the same effect on *Paracoccidioides lutzii* and other fungi species. The mode of action of the compound camphene thiosemicarbazide (TSC-C) was tested in *P. lutzii* and the authors showed the downregulation of proteins belonging to the β -oxidation pathway [41]. This very same pathway was also downregulated in *P. lutzii* under carbon sources deprivation [42] and oxidative stress [43]. In addition, enzymes of the β -oxidation pathway was also downregulated in *Candida tropicalis* [44], which led to growth arrest of the pathogen cells.

Regarding C-compound and carbohydrate metabolism, the downregulation of such proteins may inhibit the production of intermediate compounds that could be used as glucose precursors and impairs acetyl-CoA production [45]. Moreover, carbohydrate metabolism could be important for stress responses in fungi cells during infection [46]. *P. lutzii* yeast cells after incubation with argentilactone [47] and TSC-C [41], exposure to oxidative stress [43] and during zinc deprivation [48], showed downregulation of carbohydrate metabolism. The downregulated proteins related to glycolysis and gluconeogenesis show that the production of pyruvate seems to be hindered in *P. brasiliensis* cells treated with the compound under study. Glycolysis proteins were downregulated in *P. lutzii* cells under different stress conditions, such as treatment with argentilactone [47] and TSC-C in proteome [41] and transcriptome [49] approaches, oxidative stress [43]. In addition, inhibition of glycolytic proteins by the antifungal peptide PgAFP extracted from *Penicillium chrysogenum* prevented *Aspergillus flavus* cells growth [50].

These findings led us to investigate whether the glucose and lipid sources consumption could be compromised by the exposure of cells to the **compound 3**. Firstly, we applied a colorimetric method to measure glucose's concentration available in liquid cultures where *P. brasiliensis* yeast cells were growing in the presence or absence of **compound 3**. Consistently

with the proteomic findings, the exposure to the molecule caused a substantial difference in the pathogen's extracellular glucose consumption profile after 12 h of incubation (Figure 2B).

A fluorescence microscopy approach using the Nile red fluorescent dye was employed to check the presence of intracellular lipid deposits. Here, we point to the accumulation of highly fluorescent lipid droplets after exposure to the **compound 3** after 9 h of incubation (Figure 2C). This result was further confirmed by measuring the FI of the darkfield photomicrographs, which indicated an even greater difference between these two treatments after 12 and 24 h (Figure 2D). This result supports the proteomic findings, indicating a reduction in the consumption of carbon sources.

To summarize, downregulation of proteins that play a role in general metabolism and energy conservation seems to be a common response of *Paracoccidioides* spp. facing antifungal molecules. TSC-C led to the downregulation of proteins related to glycolysis, β -oxidation and the citrate cycle, including glucose-6-phosphate isomerase, 3-ketoacyl CoA thiolase and aconitase [41], which were also downregulated after treatment with the compound under study. In contrast, a metabolic shift was observed in the *P. lutzii* proteome as a response to argentilactone. Although the authors observed a decrease in the expression of proteins related to the glycolytic pathway, an increase in the expression of proteins related to lipid degradation was verified [47].

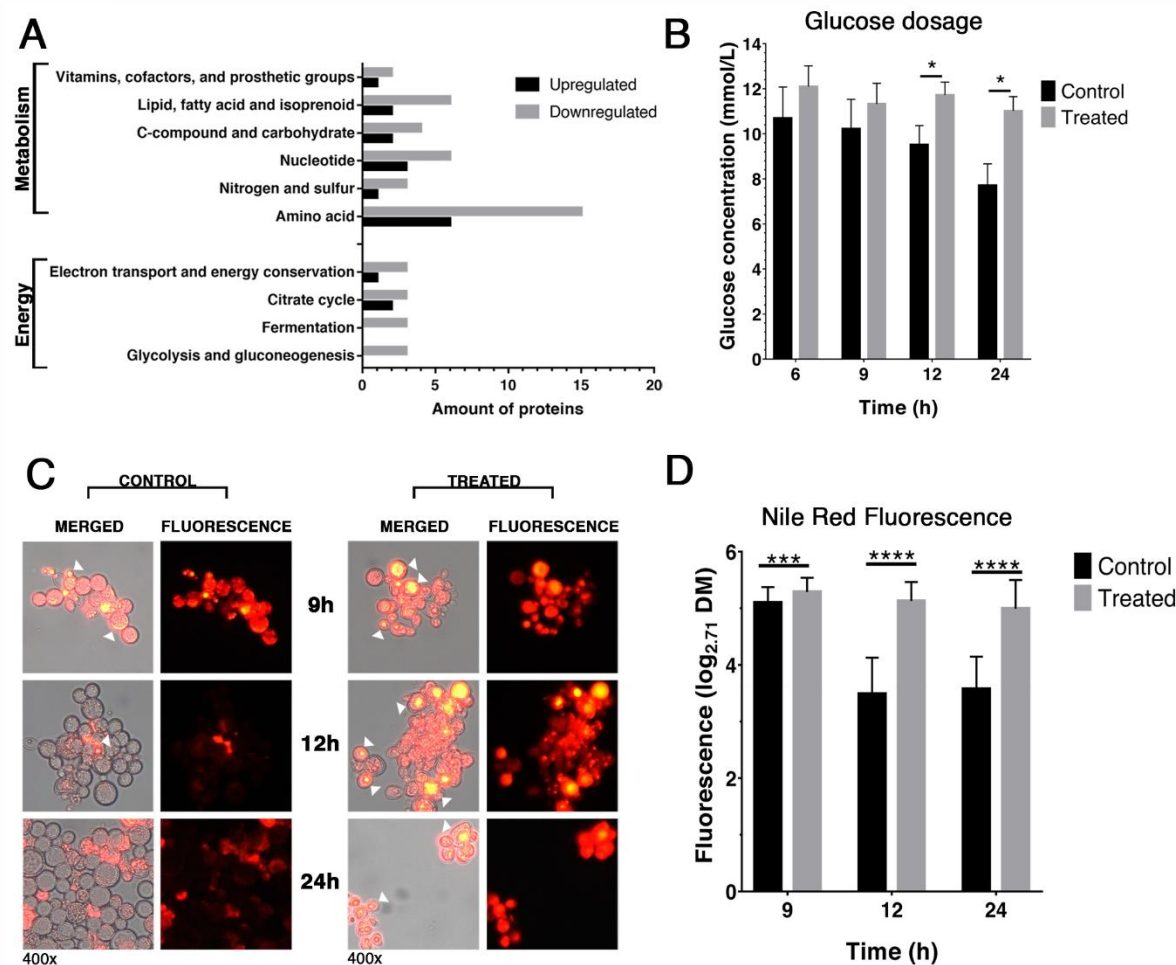


Figure 2: Extracellular Glucose and intracellular lipids dosage. (A) Amount of differentially expressed proteins from different subcategories produced from metabolism and energy production. (B) Dosage of glucose in the culture medium where cells were grown in the presence or absence of **compound 3**. (C) Fluorescence photomicrographs of *P. brasiliensis* yeasts under control and treatment with compound 3 conditions. Nile Red dye was used to assess the presence of intracellular lipid droplets. White arrowheads point to cells with large lipid deposits. All the micrographs were obtained at 400x magnification. (D) Measurement of intracellular lipid content using photomicrographs' fluorescence intensity. All comparisons were made using Student's t test with asterisks (*), (**), (***) and (****) indicating p -value < 0.05 , < 0.01 , < 0.001 and < 0.0001 respectively.

EXPOSURE TO THE COMPOUND 3 LED TO A REDUCTION IN THE MITOCHONDRIAL MASS AND ACTIVITY

Across the set of proteins being differentially expressed during the response to **compound 3**, enzymes that take part in different steps in the citric acid cycle and in the electron chain transport were both up and downregulated. Whilst the citrate synthase protein (PADG_08387), which plays the first step of the citric acid cycle was upregulated, downstream proteins such as aconitate hydratase (PADG_11845) and the E2 component of α -ketoglutarate dehydrogenase (PADG_05904) were downregulated. Additionally, we also found some

components of multisubunit complexes that take part in the electron transport chain to be downregulated (Supplementary Table 2). Taking these proteomic findings into account, we hypothesized that **compound 3** could be causing an imbalance in the production of citrate cycle intermediates, impairing electron production.

We used the fluorescent dyes Rhodamine 123 and MitoTracker Green to investigate how the pathogen's mitochondria behaved during the stress condition caused by **compound 3**. Rhodamine 123 accumulates in mitochondria as a function of the organelle's membrane potential, contrary to MitoTracker Green, which accumulates in the mitochondrial matrix independently of this physical property [51]. These distinct staining patterns allowed us to infer mitochondrial activity and mass, respectively, according to the fluorescence intensity emitted by these molecules.

We found that mitochondrial activity was significantly reduced after 12 h of exposure to the **compound 3** under study (Figure 3A and B). Furthermore, smaller mitochondrial populations were also observed in yeast during all exposure times analyzed (Figure 3A and C). This finding is in agreement with the literature that demonstrates that the disruption of genes encoding several proteins related to the citrate cycle in *C. albicans* led to a decrease in ATP production [52]. A more intense mitochondrial activity was found in *P. brasiliensis* yeasts recovered from macrophages not primed with interferon gamma when compared to yeasts recovered from primed macrophages, suggesting that this is an important trait related to the survival of the fungal cells in the host milieu [53]. In this case, if the effect of the reduced activity of the electron transport chain by the chalcone derivative remains in the context of in vivo infection, this molecule could contribute as a powerful weapon for the management of infection in patients with an imbalanced production of this pro-inflammatory cytokine [54,55].

Several citric acid cycle proteins were downregulated in other *P. lutzii* assays. Aconitate hydratase, for example, was also downregulated during hypoxia [56], treatment with TSC-C [41] and zinc deprivation [48]. TCA showed downregulation during *P. lutzii* cells under oxidative stress [43] and other fungal species, such as *A. flavus*, showed downregulation of citric acid cycle after treatment with *Curcuma longa* oil. The latter led to mitochondrial dysfunction due to lack of mitochondrial proteins activity [57].

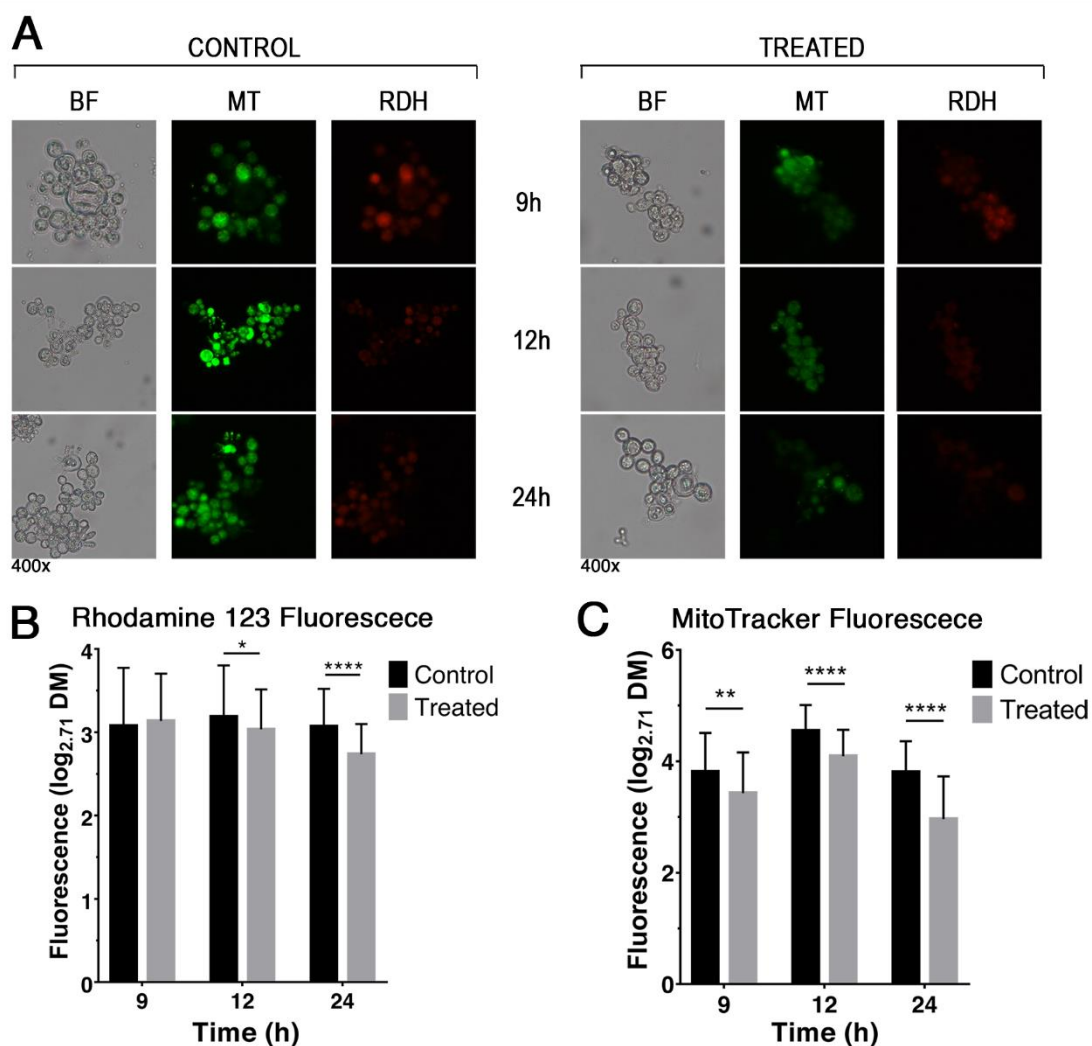


Figure 3: Mitochondrial mass and activity assessment. (A) Panels show brightfield (BF) and fluorescence photomicrographs using both Rhodamine 123 (RDH) and MitoTracker Green (MT) dyes in the evaluation of mitochondrial activity and integrity, respectively. All the micrographs were obtained at 400x of magnification. The graphs that follow express the fluorescence intensities of Rhodamine 123 (B) and MitoTracker Green (C). All comparisons were made using Student's t test with asterisks (*), (**), (***) and (****) indicating p -value < 0.05 , < 0.01 , < 0.001 and < 0.0001 respectively.

EXPOSURE TO COMPOUND 3 LED TO INCREASED PRODUCTION OF ROS

Dysfunctions caused by inhibition of complexes III and IV of the electron transport chain leads to increased production of intracellular ROS [58]. As we discussed in the previous section, complex III subunit 7 (PADG_04501) and complex IV subunit 4 (PADG_04397) were downregulated, which is a good indicator that the electron transport chain is impaired. The proteomic profile of the *P. brasiliensis* cells under treatment with **compound 3**, pointed to a decrease in the activity of the respiratory chain. Thus, we investigate whether the stress

condition generated by the **compound 3** would contribute to the increased production of intracellular ROS.

In fact, we observed greater fluorescence among yeast cells treated with **compound 3** at all time points analyzed (Figure 4A and B). Interestingly, a 4-nitrochalcone has also been reported to produce increased ROS levels and mitochondrial membrane depolarization in *Leishmania amazonensis* [59] just like we found in our analysis. It is noteworthy the role of a chalcone derivative in producing this effect on HepG2, a human's liver cancer cell line, even for a short period of exposure and causing relatively weak cytotoxic effects on the normal fibroblast cell line WI-38 [60]. This information agrees with our results and with previous reports that **compound 3** caused low cytotoxic effects in mammalian fibroblast cell lines[19], highlighting the great selective potential of the chalcone class.

The downregulation of several proteins related to electron transport chain and respiration point to an impairment of the energy production in *Paracoccidioides* yeast cells under stress conditions. The repression of such proteins leads to the accumulation of potential energy along the mitochondrion membrane, stimulate the production of endogenous ROS and hinders the overall energy production within these organelles. *P. lutzii* cells treated with TSC-C [41], *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Pichia angusta* and *Saccharomyces cerevisiae* treated with oligomycin (an ATP synthase inhibitor) [61], and apoptolidin (an F₀F₁-ATPase inhibitor) [62] in several fungal species have shown to impair energy production in fungal cells increasing intracellular ROS and cell growth arrest. This shows the importance of understanding the mode of action of compounds that could be alternatives to classical fungal infection treatment, including PCM.

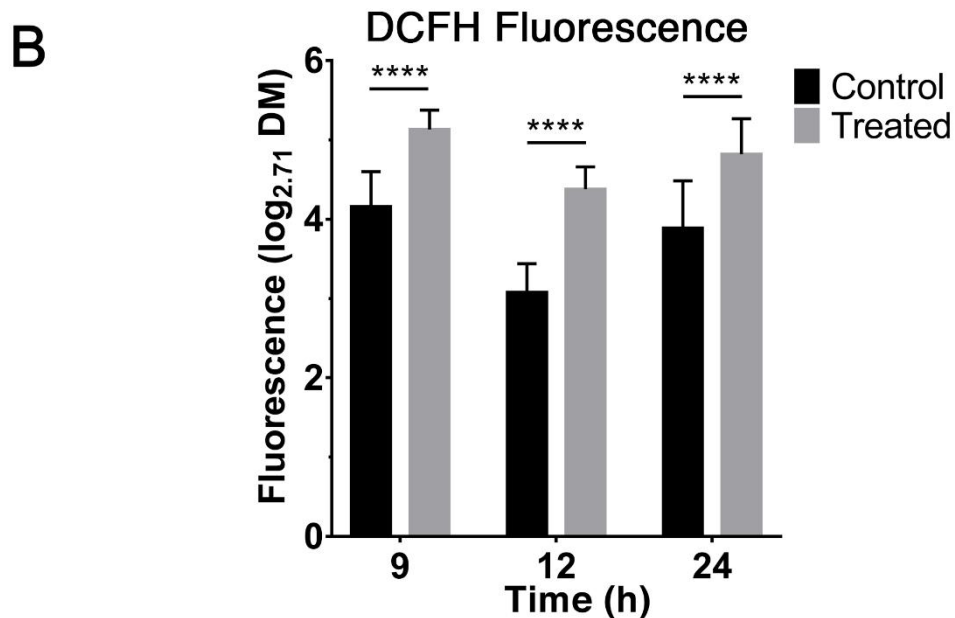
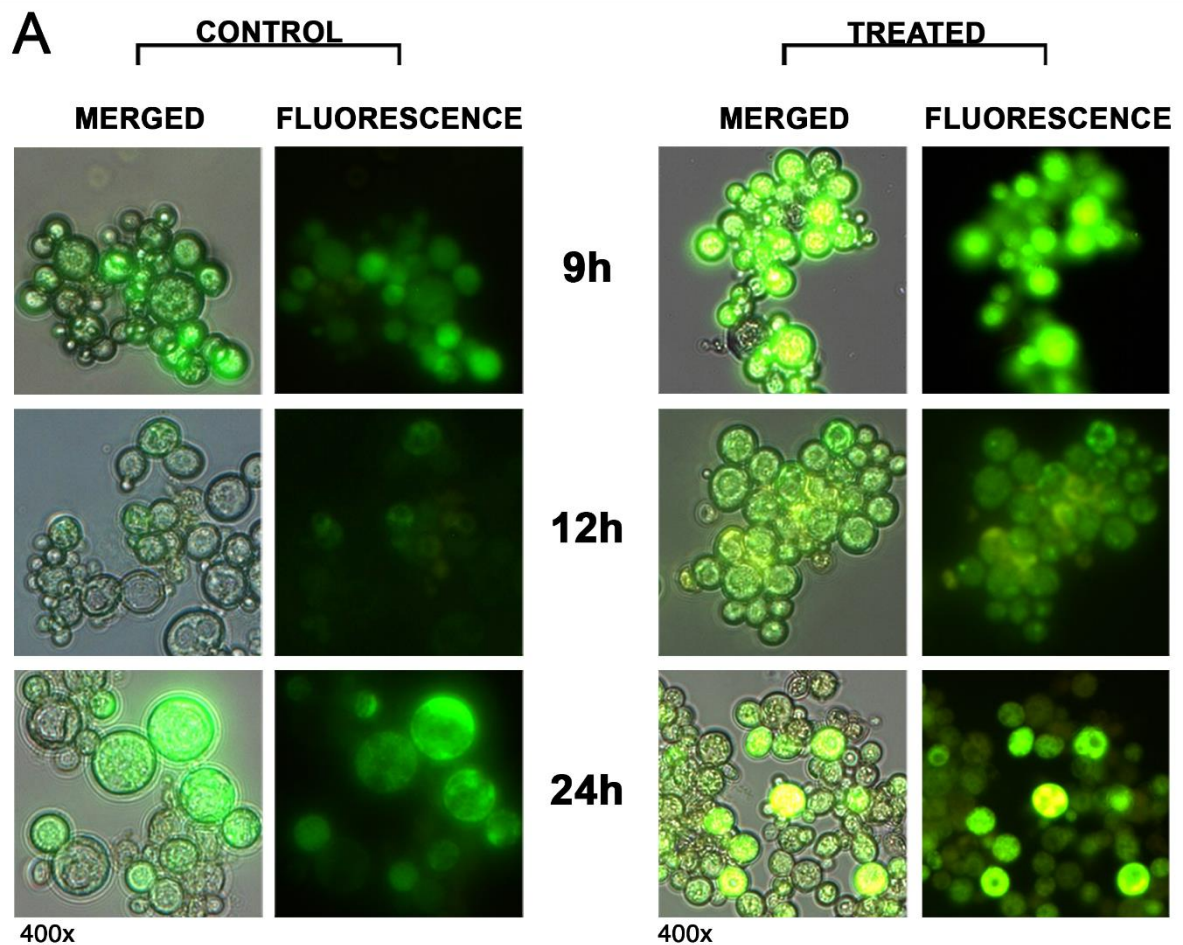


Figure 4: Evaluation of the production of intracellular reactive oxygen species. (A) Panels show fluorescence photomicrographs using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and the merged images with bright field photomicrographs. All the micrographs were obtained at 400x of magnification. (B) The graph expresses the fluorescence intensities of DCFH. Statistical comparisons were made using Student's t test with asterisks (****) indicating p -value < 0.0001.

COMPOUND 3 IMPACTED MEMBRANE FLUIDITY

We associated the feature of the **compound 3** causing an increase in ROS with the increase in the rigidity of the plasma membrane. The increased production of mitochondrial ROS gives rise to lipid oxidation products formed during the peroxidation of ω -6 polyunsaturated fatty acids (linoleic, γ -linolenic, and arachidonic acid) [63–65]. Several reactive aldehydes are formed during the subsequent chain of free radical reactions and among these lipid peroxidation products, the 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) represents one of the most bioactive and well-studied lipid alkenals [66,65]. 4-HNE is an amphiphilic compound, which tends to concentrate on biomembranes, where it can react with membrane proteins, such as transporters, ion channels and receptors [67].

Figure 5 shows the EPR spectra of the spin label 5-DSA in *P. brasiliensis*' membranes after different time intervals of culture with and without treatment with the **compound 3**. Parameter $2A//$ measured directly on the EPR spectra indicated that treatment with this compound leads to a large increase in membrane rigidity. The fluidity of the membrane did not change over the incubation time for treated and untreated samples. This indicates that the effect of the compound occurs in a treatment period shorter than 9 h. Additionally, EPR signal showed a considerable fraction of free spin label in solution (outside the membrane), suggesting that the **compound 3** caused a decrease in the amount of membrane in the sample that could be a consequence of membrane degradation.

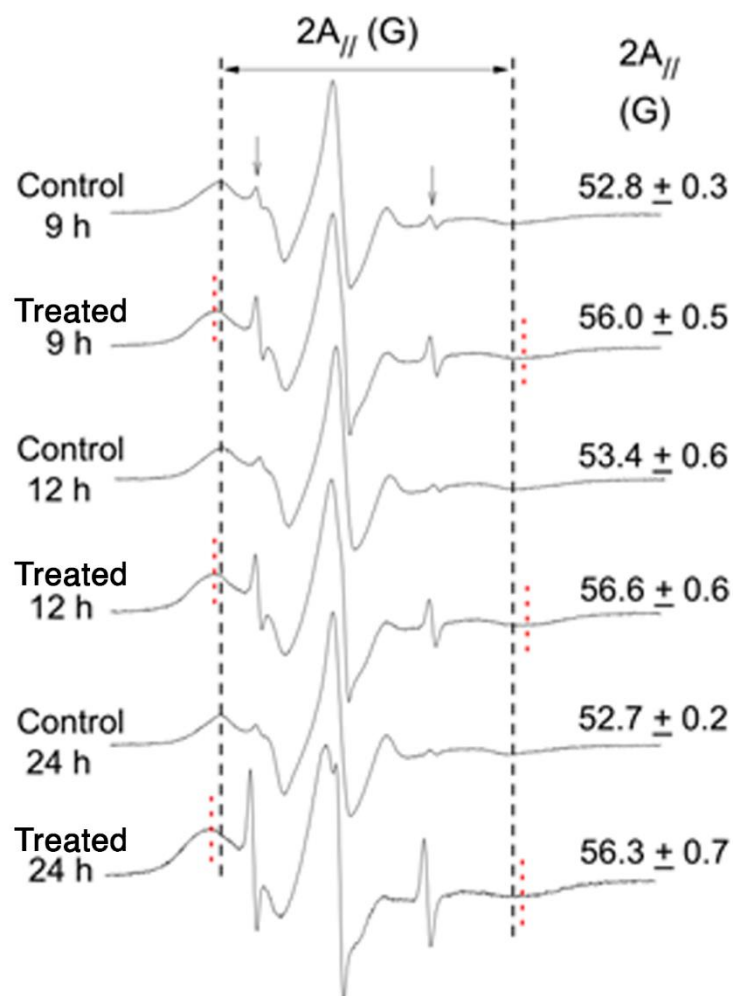


Figure 5: Representative EPR spectra of spin probe 5-DSA in fungus membranes for the control and treated samples with compound 3 for 24 h. The mean \pm S.D. values of the EPR parameter $2A_{//}$ (outer hyperfine splitting), which is given by the separation in magnetic field units between the first peak and the last inverted peak of the spectrum, are indicated. The increase in $2A_{//}$ indicates membrane rigidity. The arrows indicate unimportant resonance lines from a small fraction of spin label freely tumbling in the aqueous phase (outside the membrane), which is sometimes observed for samples with low cell concentration. The EPR spectra were recorded with a scan range of the total magnetic field of 100 G (X axis) and intensity represented in arbitrary units (Y axis).

The effects of membrane rigidity generated by β -carbonile derivatives in *L. amazonensis* were also associated with an increase in ROS production [68]. Furthermore, in previous works, similar cell membrane changes occurred for treatments with another novel chalcone-like compound, **LQFM064** [69]. Although it has been shown that 4-HNE has very little effect on the fluidity of the lipid bilayer of liposomes made from *Escherichia coli* lipids [70], we believe in the possibility that the membrane modifications caused by the 4-HNE

generated in the cytoplasm are the main responsible factors for the membrane rigidity observed here.

THE COMPOUND 3 IS A PUTATIVE INHIBITOR OF DIHYDROPTEROATE SYNTHASE (DHPS)

Among the proteins identified by proteomic analysis, DHPS was found to be expressed only in the presence of **compound 3**. This protein is related to the synthesis of folate, which in turn, participates as an enzymatic cofactor in the biosynthesis of purines, pyrimidines, and some amino acids such as glycine and methionine [71]. Other works have suggested the possibility that other chalcone derivatives act as DHPS inhibitors of pathogenic bacteria using molecular docking approaches [72,73]. Therefore, we hypothesize that the upregulation of this protein in the presence of **compound 3** is due to inhibition processes.

A molecular docking assay was performed to compare the interaction of DHPS with three ligands, including 4-aminobenzoic acid (PABA), the protein substrate; sulfamethoxazole is a recognized competitive inhibitor [74,75] and the chalcone derivative. No 3D structure of DHPS from the fungus *P. brasiliensis* is available in the Protein Data Bank (PDB) [34]. Thus, to perform the molecular docking analyses, a homology-based model was built for the protein using the SWISS-MODEL server. The developed model showed an effective score when evaluated by the MolProbity server. The score was in the range of 1.3 and the clashcore 0.22. The MolProbity score is the result of the overall quality of the model and the clashscore is the number of serious conflicts per 1000 atoms [76]. These values are important for the evaluation of the model quality.

Through our docking analysis, it was observed that the three ligands showed a considerable affinity with DHPS, demonstrating ChemGauss4 scores of -8,970,508 for **compound 3**, -7,122,934 for PABA and -6,755,193 for sulfamethoxazole. The 2D diagram shows all possible interactions predicted for each ligand with DHPS (Figure 6A-C). It was possible to identify only a Pi-Pi interaction between the single aromatic ring of PABA with the PHE-527 residue (Figure 6A). Furthermore, it is noteworthy that the rings of **compound 3** and the sulfamethoxazole inhibitor structures can interact with the LYS-563 and PHE-527 amino acid residues of the protein by Pi-cation and Pi-Pi bonds respectively (Figure 6B and C). Additionally, interaction analysis showed that the three ligands could form hydrogen bonds with the amino acid residue LYS-563 (Figure 6D).

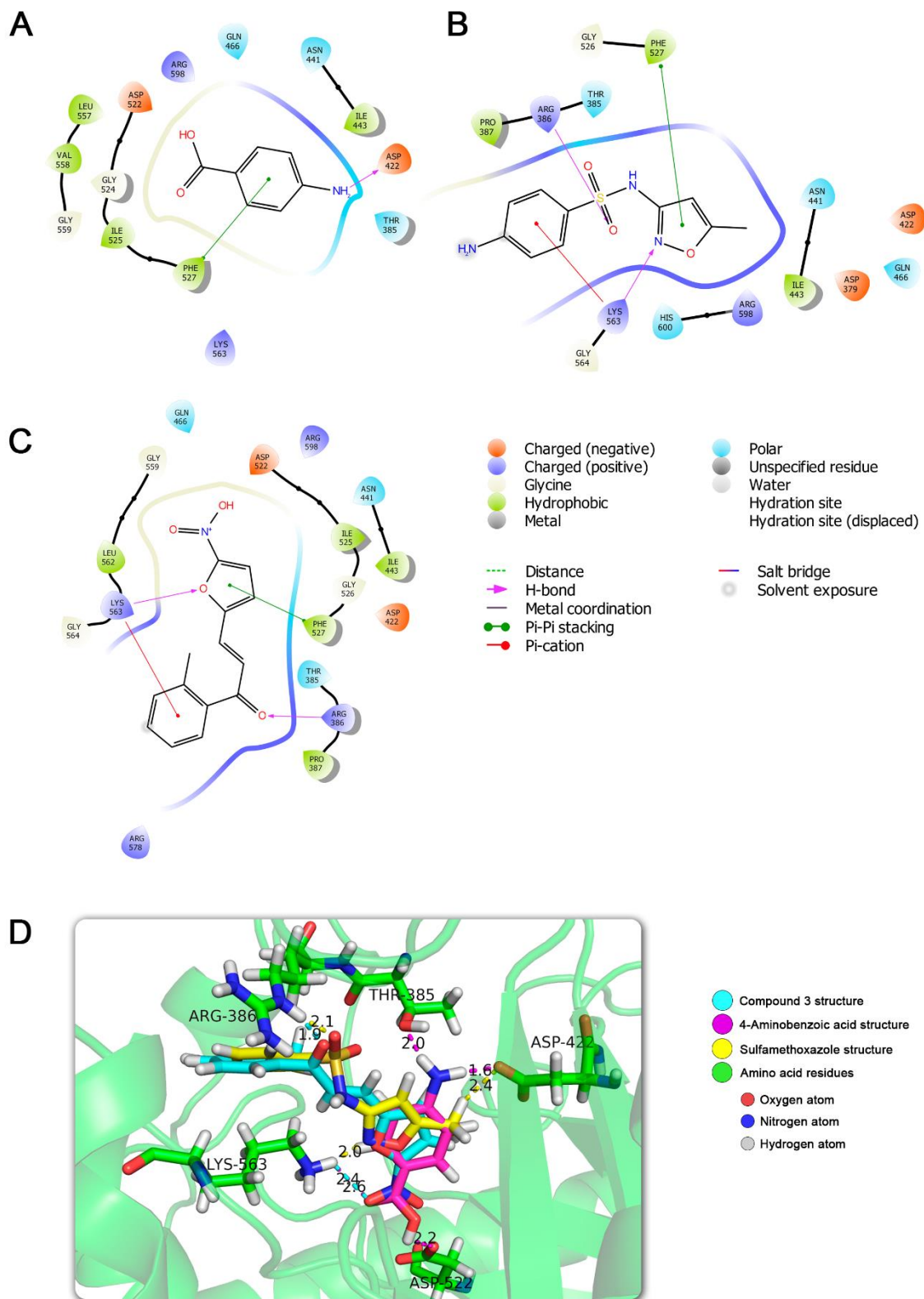


Figure 6: Molecular docking of compound 3 and inhibitors with dihydropteroate synthase (DHPS). The first three figures depict through 2D schematics the putative interactions of 4-aminobenzoic acid (A), sulfamethoxazole

(B) and **compound 3** (C) molecules with the amino acid residues of DHPS. (D) Overlapping poses of the three compounds in the DHPS pocket.

Our results predicted that chalcone has a binding mode with DHPS similar to the other known ligands. Furthermore, the more negative ChemGauss4 score predicted for the interaction with **compound 3** indicates that the complex formed by this ligand and the target protein is probably more stable than the complexes formed with the other three ligands. Thus, **compound 3** can be considered a potential DHPS inhibitor. This finding is encouraging, since this protein is a well-known target for cotrimoxazole, which is one of the drugs currently used in the clinical management of PCM.

MODEL OF METABOLIC CHANGES AND POSSIBLE MODES OF ACTION THAT PARTICIPATE IN THE INHIBITION OF *P. brasiliensis* GROWTH BY COMPOUND 3

Figure 7 depicts all the metabolic alterations induced by the **compound 3** found through proteomic analysis and that we were able to validate by *in vitro* and *in silico* approaches. Our results highly support the hypothesis that **compound 3** negatively impacted the energy machinery of *P. brasiliensis* yeast cells leading to instabilities that range from the utilization of carbon sources in glycolysis and β -oxidation, the production of electrons by the citrate cycle, and the transfer of these electrons through the mitochondrial electron transport chain.

The activation of amino acid degradation pathways promote the replenishment of the citric acid cycle as a possible adaptation of *P. brasiliensis* to overcome the induced deficiency of intermediates during phagocytosis in macrophages [77]. Interestingly, we found the enzyme aspartate aminotransferase (PADG_03686) expressed exclusively during exposure to the **compound 3** (Figure 7). This enzyme is responsible for catalyzing the transamination reaction of L-glutamate or L-aspartate into α -ketoglutarate or oxaloacetate, such enzyme may be acting to replenish the necessary intermediates of the citrate cycle [78]. Additionally, glutaryl-CoA dehydrogenase (PADG_12025) was also expressed only during treatment with **compound 3** (Figure 7). This enzyme is present in the degradation pathways of the amino acids L-lysine and L-tryptophan [79]. Since the final product of these pathways is pyruvate, we believe that its induction might represent an unsuccessful response to the non-depletion of acetyl moieties generated by the repression of glycolysis and β -oxidation.

On the other hand, enzymes supplying the citrate cycle were also downregulated. Among them, we found 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD - PADG_08468 -

Figure 7), a protein that involved in the catabolism of L-tyrosine and L-phenylalanine into homogentisate [80]. The activity of this enzyme seems to be mandatory during the host-pathogen relationships, for example, it is recruited during the growth of *Penicillium marneffeii* inside macrophages [81]. HPPD is also overexpressed during the mycelium-to-yeast transition in *P. brasiliensis* and its inhibition causes the abolition of this important process in the early stages of the infection [82]. The pyruvate carboxylase (PADG_04103) expression was found only under the control condition without **compound 3** (Figure 7). This protein can act in an anaplerotic pathway of the citrate cycle, promoting the ATP-dependent carboxylation of pyruvate to oxaloacetate and it is an important precursor of the gluconeogenic pathway under glucose starvation conditions [83,84]. Taken together, this information indicates that the fungus does not use all the amino acids as carbon sources to try to overcome the metabolic imbalance caused by the **compound 3**.

Thioredoxin (PADG_05504) is a small oxidoreductase that acts in a system along with thioredoxin reductase, promoting the reduction of proteins oxidized by ROS [85]. Together with cytochrome c peroxidase (PADG_03163), these proteins have pivotal roles in the response to oxidative stress, hypoxia and ex vivo and in vivo infections [53,77,43,56,86]. Since **compound 3** caused an increase in ROS production, it is particularly intriguing that these proteins appeared to be downregulated in our proteomic analyses. Therefore, we hypothesize that other proteins that were not regulated, such as superoxide dismutase and catalase, may still be acting in the management of this stress condition.

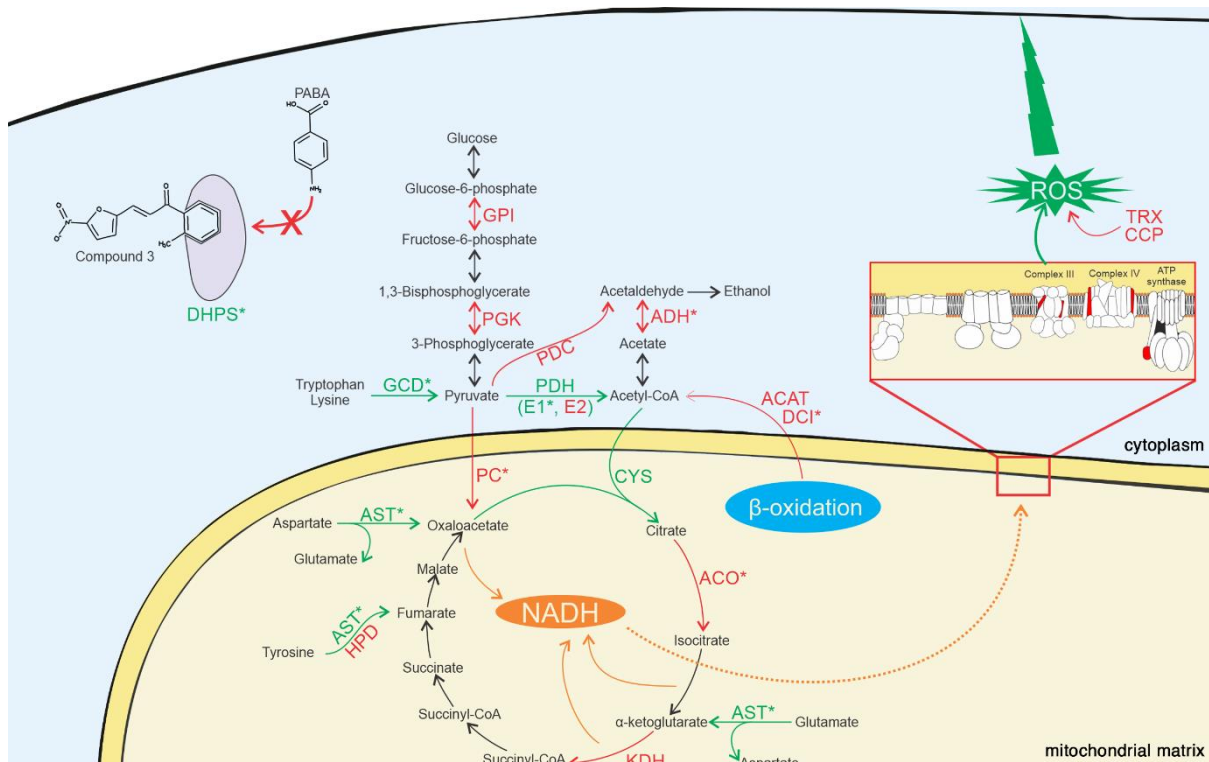


Figure 7: Schematic illustration of the metabolic changes induced by compound 3 in *P. brasiliensis* revealed by proteomic analysis. The main proteins regulated by the compound are part of the glycolytic pathway, citrate cycle, β -oxidation and electron transport chain. Proteins represented in green color were more abundant in the sample treated with **compound 3**. The upregulated proteins were (GCD - glutaryl CoA dehydrogenase; PDH - pyruvate dehydrogenase; CYS - citrate synthase; AST - aspartate aminotransferase; DHPS - dihydropteroate synthase). Among them, a green asterisk (*) indicates their presence only in the treated sample. The proteins represented by the red color were more abundant in the control sample and the downregulated proteins were (GPI - glucose-6-phosphate isomerase; PGK - phosphoglycerate kinase; PC - pyruvate carboxylase; HPD - 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; KDH - 2-oxoglutarate dehydrogenase; ACO - aconitate hydratase; ACAT - 3-ketoacyl-CoA thiolase; DCI - delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase; ADH - aldehyde dehydrogenase; PDC - pyruvate decarboxylase; TRX - thioredoxin; CCP - cytochrome C peroxidase). Among the downregulated proteins, those highlighted with a red asterisk (*) were present exclusively in the control sample.

CONCLUSION

Through a proteomics approach using mass spectrometry, we were able to access the changes in the profile of expressed proteins after treatment with **compound 3**. This chalcone derivative caused major disturbances in carbohydrate and lipid metabolism, in addition to impairing energy production. Our hypothesis is that the interrupted expressions of some components of the citrate cycle and the electron transport chain caused a decrease in mitochondrial activity. This malfunction in turn, caused increased production of ROS and membrane rigidity. Additionally, we have gathered some predictions that point to this compound as a putative inhibitor for dihydropteroate synthase. Together, all these results highlight **compound 3** as a promising drug for anti-PCM therapy and serve as a stimulus for the promotion of continued studies that validate its use for the management of infection.

FUTURE PERSPECTIVE

The proteomic approach demonstrated that the **compound 3** caused important metabolic changes in *P. brasiliensis*, some of which could be confirmed by *in vitro* validations. Thus, in order to further characterize the antifungal properties of this compound, we intend to verify its effectiveness in the context of *in vivo* infection models.

SUMMARY POINTS

- Previously, our group identified the **compound 3** as promising against PCM, through a virtual screening strategy;
- We performed a proteomic analysis of *P. brasiliensis* yeasts cultivated or not with **compound 3** and found 258 differentially expressed proteins;
- Among the differentially expressed proteins, 89 were upregulated and 169 downregulated;
- Guided by the high percentage of proteins related to metabolism and energy production being downregulated (28.4%), we proceeded with *in vitro* and *in silico* assays;
- **Compound 3** impacted glucose and lipid consumption in *P. brasiliensis*;
- **Compound 3** produced a reduction in the mitochondria's population as well as led to a reduction in the activity of the electron transport chain in treated cells;
- Decrease in mitochondrial activity and downregulation of defense proteins may have led to increased accumulation of intracellular reactive oxygen species in the presence of the **Compound 3**;
- **Compound 3** caused damage and an increase in plasma membrane rigidity;
- The molecular docking strategy pointed the **Compound 3** as a potential inhibitor of the DHPS, a well-established target in the current treatment of PCM.

REFERENCES ANNOTATIONS

- 5 – **Of interest:** Highlights the lack of new therapeutic strategies for paracoccidioidomycosis treatment;
- 7 – **Of interest:** Summarizes the potential biological activities of chalcones;
- 16 – **Of considerable interest:** Pioneer work that attests the effectiveness of chalcone derivatives against *Paracoccidioides* spp.;
- 19 – **Of considerable interest:** Work in which **compound 3** and other promising chalcone derivatives against *Paracoccidioides* spp. were found through a virtual screening approach;
- 70 – **Of interest:** Shows that a chalcone derivative also caused membrane instabilities in *Leishmania amazonensis*;
- 74 – **Of considerable interest:** Investigates the affinity of chalcone derivatives with dihydropteroate synthase from *Streptococcus pneumoniae*.

REFERENCES

1. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *The Lancet Infectious Diseases*. 17(11), e367–e377 (2017).
2. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 11, 224–282 (2017).
3. WHO/Department of control of neglected tropical diseases. Ending the neglected to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021-2030 [Internet]. (2020). Available from: https://www.who.int/neglected_diseases/resources/who-ucn-ntd-2020.01/en/.
4. Griffiths J, Colombo AL, Denning DW. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13(5), e0007195 (2019).
5. do Carmo Silva L, de Oliveira AA, de Souza DR, *et al.* Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going? *Journal of Fungi*. 6(4), 300 (2020).
6. Chaves AFA, Navarro MV, de Barros YN, Silva RS, Xander P, Batista WL. Updates in Paracoccidioides Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. *Journal of Fungi*. 7(2), 116 (2021).
7. Gomes MN, Muratov EN, Pereira M, *et al.* Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. *Molecules*. 22(8), 1210 (2017).

8. Nakayama T, Takahashi S, Waki T. Formation of Flavonoid Metabolons: Functional Significance of Protein-Protein Interactions and Impact on Flavonoid Chemodiversity. *Front. Plant Sci.* [Internet]. 10 (2019). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00821/full>.
9. Davies KM, Jibrán R, Zhou Y, *et al.* The Evolution of Flavonoid Biosynthesis: A Bryophyte Perspective. *Front. Plant Sci.* [Internet]. 11 (2020). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00007/full>.
10. Rani A, Anand A, Kumar K, Kumar V. Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 14(3), 249–288 (2019).
11. Bitencourt TA, Komoto TT, Massaroto BG, *et al.* Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 13(1), 229 (2013).
12. Seleem D, Benso B, Noguti J, Pardi V, Murata RM. In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Lichochalcone-A against *Candida albicans* Biofilms. *PLOS ONE.* 11(6), e0157188 (2016).
13. Lin M-Y, Yuan Z-L, Hu D-D, *et al.* Effect of loureirin A against *Candida albicans* biofilms. *Chinese Journal of Natural Medicines.* 17(8), 616–623 (2019).
14. Alwan WS, Karpoomath R, Palkar MB, *et al.* Novel imidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 95, 514–525 (2015).
15. Melo WCMA, Santos MB dos, Marques B de C, Regasini LO, Giannini MJSM, Almeida AMF. Selective photoinactivation of *Histoplasma capsulatum* by water-soluble derivatives chalcones. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 18, 232–235 (2017).
16. de Carvalho Tavares L, Johann S, Maria de Almeida Alves T, *et al.* Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 46(9), 4448–4456 (2011).
17. de Sá NP, Cisalpino PS, Tavares L de C, *et al.* Antifungal activity of 6-quinolinylnyl N-oxide chalcones against *Paracoccidioides*. *J Antimicrob Chemother.* 70(3), 841–845 (2015).
18. de Sá NP, Cisalpino PS, Tavares LC, *et al.* Effects of two 6-quinolinylnyl chalcones on the integrity of plasma membrane of *Paracoccidioides brasiliensis*. *The Journal of Antibiotics.* 70(3), 277–284 (2017).
19. Silva LC, Neves BJ, Gomes MN, *et al.* Computer-aided identification of novel anti-paracoccidioidomycosis compounds. *Future Microbiology.* 13(13), 1523–1535 (2018).
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72(1), 248–254 (1976).
21. Murad AM, Souza GHMF, Garcia JS, Rech EL. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. *Journal of Separation Science.* 34(19), 2618–2630 (2011).

22. Murad AM, Rech EL. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnol.* 12, 82 (2012).
23. Vödisch M, Scherlach K, Winkler R, *et al.* Analysis of the *Aspergillus fumigatus* Proteome Reveals Metabolic Changes and the Activation of the Pseurotin A Biosynthesis Gene Cluster in Response to Hypoxia. *J Proteome Res.* 10(5), 2508–2524 (2011).
24. Ruepp A, Zollner A, Maier D, *et al.* The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 32(18), 5539–5545 (2004).
25. Moreira RA, Mendanha SA, Fernandes KS, *et al.* Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in *Leishmania amazonensis* Membranes at Concentrations Similar to Those Needed for Cytotoxicity Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(6), 3021–3028 (2014).
26. Fernandes KS, de Souza PEN, Dorta ML, Alonso A. The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1859(1), 1–9 (2017).
27. Alonso L, Cardoso ÉJS, Gomes RS, Mendanha SA, Dorta ML, Alonso A. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 183, 110421 (2019).
28. Wang Y, Bryant SH, Cheng T, *et al.* PubChem BioAssay: 2017 update. *Nucleic Acids Research.* 45(D1), D955–D963 (2017).
29. Fourches D, Muratov E, Tropsha A. Trust, but Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation. *J. Chem. Inf. Model.* 56(7), 1243–1252 (2016).
30. OMEGA v.3.0.0.1: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>. .
31. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J Comput Chem.* 23(16), 1623–1641 (2002).
32. QUACPAC v.1.7.0.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>. .
33. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research.* 46(W1), W296–W303 (2018).
34. Rose PW, Prlić A, Altunkaya A, *et al.* The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Research.* 45(D1), D271–D281 (2017).
35. Bhattacharya D, Nowotny J, Cao R, Cheng J. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Research.* 44(W1), W406–W409 (2016).
36. Bhattacharya D, Cheng J. 3Drefine: Consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 81(1), 119–131 (2013).

37. Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*. 40(W1), W537–W541 (2012).
38. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*. 27(1), 293–315 (2018).
39. OEDocking v.3.2.0: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM, USA. <http://www.eyesopen.com>. (2017).
40. McGann M. FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *J Comput Aided Mol Des*. 26(8), 897–906 (2012).
41. e Silva KS, da S Neto BR, Zambuzzi-Carvalho PF, *et al.* Response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal camphene thiosemicarbazide determined by proteomic analysis. *Future Microbiology*. 13(13), 1473–1496 (2018).
42. Lima P de S, Casaletti L, Bailão AM, Vasconcelos ATR de, Fernandes G da R, Soares CM de A. Transcriptional and Proteomic Responses to Carbon Starvation in *Paracoccidioides*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 8(5), e2855 (2014).
43. de Arruda Grossklaus D, Bailão AM, Vieira Rezende TC, *et al.* Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes and Infection*. 15(5), 347–364 (2013).
44. Kanayama N, Ueda M, Atomi H, Tanaka A. Genetic Evaluation of Physiological Functions of Thiolase Isozymes in the n-Alkane-Assimilating Yeast *Candida tropicalis*. *Journal of Bacteriology*. 180(3), 690–698 (1998).
45. Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. Transcriptional Response of *Candida albicans* upon Internalization by Macrophages. *Eukaryotic Cell*. 3(5), 1076–1087 (2004).
46. Fountain JC, Yang L, Pandey MK, *et al.* Carbohydrate, glutathione, and polyamine metabolism are central to *Aspergillus flavus* oxidative stress responses over time. *BMC Microbiology*. 19(1), 209 (2019).
47. Prado RS, Bailão AM, Silva LC, *et al.* Proteomic profile response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal argentilactone. *Front. Microbiol.* [Internet]. 6 (2015). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00616/full>.
48. Parente AFA, de Rezende TCV, de Castro KP, *et al.* A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. *Fungal Biology*. 117(6), 399–410 (2013).
49. Silva L do C, Ossa DPT, Castro SV da C, *et al.* Transcriptome Profile of the Response of *Paracoccidioides* spp. to a Camphene Thiosemicarbazide Derivative. *PLOS ONE*. 10(6), e0130703 (2015).
50. Delgado J, Owens RA, Doyle S, Asensio MA, Núñez F. Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99(20), 8701–8715 (2015).
51. Doherty E, Perl A. Measurement of Mitochondrial Mass by Flow Cytometry during Oxidative Stress. *React Oxyg Species (Apex)*. 4(10), 275–283 (2017).

52. Tao L, Zhang Y, Fan S, Nobile CJ, Guan G, Huang G. Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO₂ sensing and hyphal development in *Candida albicans*. *PLOS Genetics*. 13(8), e1006949 (2017).
53. Chaves EGA, Parente-Rocha JA, Baeza LC, *et al.* Proteomic Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* During Infection of Alveolar Macrophages Primed or Not by Interferon-Gamma. *Front. Microbiol.* [Internet]. 0 (2019). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00096/full>.
54. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. IMBALANCE OF IL-2, IFN- γ AND IL-10 SECRETION IN THE IMMUNOSUPPRESSION ASSOCIATED WITH HUMAN PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. *Cytokine*. 13(4), 248–252 (2001).
55. Nishikaku AS, Molina RFS, Albe BP, *et al.* Immunolocalization of IFN-gamma in the lesions of resistant and susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 63(2), 281–288 (2011).
56. Lima P de S, Chung D, Bailão AM, Cramer RA, Soares CM de A. Characterization of the *Paracoccidioides* Hypoxia Response Reveals New Insights into Pathogenesis Mechanisms of This Important Human Pathogenic Fungus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9(12), e0004282 (2015).
57. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*. 220, 1–8 (2017).
58. Larosa V, Remacle C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*. 38(5), BSR20171492 (2018).
59. Assolini JP, da Silva TP, da Silva Bortoleti BT, *et al.* 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology*. 884, 173392 (2020).
60. Zhu H, Tang L, Zhang C, *et al.* Synthesis of Chalcone Derivatives: Inducing Apoptosis of HepG2 Cells via Regulating Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. *Front. Pharmacol.* [Internet]. 0 (2019). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01341/full>.
61. Liu S, Charlesworth TJ, Bason JV, *et al.* The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species. *Biochemical Journal*. 468(1), 167–175 (2015).
62. Salomon AR, Voehringer DW, Herzenberg LA, Khosla C. Apoptolidin, a selective cytotoxic agent, is an inhibitor of F₀F₁-ATPase. *Chemistry & Biology*. 8(1), 71–80 (2001).
63. Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1772(7), 718–736 (2007).

64. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 157(1), 1–11 (2009).
65. Jovanović O, Škulj S, Pohl EE, Vazdar M. Covalent modification of phosphatidylethanolamine by 4-hydroxy-2-nonenal increases sodium permeability across phospholipid bilayer membranes. *Free Radical Biology and Medicine*. 143, 433–440 (2019).
66. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology*. 4, 193–199 (2015).
67. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal Research Reviews*. 28(4), 569–631 (2008).
68. Alonso L, de Paula JC, Baréa P, *et al.* Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1863(1), 183473 (2021).
69. Alonso L, Menegatti R, Gomes RS, *et al.* Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 151, 105407 (2020).
70. Malingriaux EA, Rupprecht A, Gille L, *et al.* Fatty Acids are Key in 4-Hydroxy-2-Nonenal-Mediated Activation of Uncoupling Proteins 1 and 2. *PLOS ONE*. 8(10), e77786 (2013).
71. Zambuzzi-Carvalho PF, Fernandes AG, Valadares MC, *et al.* Transcriptional profile of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides lutzii* in response to sulfamethoxazole. *Medical Mycology*. 53(5), 477–492 (2015).
72. Suwito H, Ni'matuzahroh, Kristanti AN, *et al.* Antimicrobial Activities and In silico Analysis of Methoxy Amino Chalcone Derivatives. *Procedia Chemistry*. 18, 103–111 (2016).
73. Kaur H, Gahlawat S, Singh J, Narasimhan B. Molecular Docking Study of Active Diazenyl Scaffolds as Inhibitors of Essential Targets Towards Antimicrobial Drug Discovery. *Curr Drug Targets*. 20(15), 1587–1602 (2019).
74. Bermingham A, Derrick JP. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays*. 24(7), 637–648 (2002).
75. Stratton CF, Namanja-Magliano HA, Cameron SA, Schramm VL. Binding Isotope Effects for para-Aminobenzoic Acid with Dihydropteroate Synthase from *Staphylococcus aureus* and *Plasmodium falciparum*. *ACS Chem. Biol.* 10(10), 2182–2186 (2015).
76. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 1), 12–21 (2010).
77. Parente-Rocha JA, Parente AFA, Baeza LC, *et al.* Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. *PLOS ONE*. 10(9), e0137619 (2015).
78. Jeong SY, Jin H, Chang JH. Crystal structure of L-aspartate aminotransferase from *Schizosaccharomyces pombe*. *PLOS ONE*. 14(8), e0221975 (2019).

79. Zhang M, Gao C, Guo X, *et al.* Increased glutarate production by blocking the glutaryl-CoA dehydrogenation pathway and a catabolic pathway involving 1-2-hydroxyglutarate. *Nat Commun.* 9(1), 2114 (2018).
80. Lin H-Y, Yang J-F, Wang D-W, *et al.* Molecular insights into the mechanism of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibition: enzyme kinetics, X-ray crystallography and computational simulations. *The FEBS Journal.* 286(5), 975–990 (2019).
81. Boyce KJ, McLauchlan A, Schreider L, Andrianopoulos A. Intracellular Growth Is Dependent on Tyrosine Catabolism in the Dimorphic Fungal Pathogen *Penicillium marneffei*. *PLOS Pathogens.* 11(3), e1004790 (2015).
82. Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, *et al.* Transcriptome Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* Cells Undergoing Mycelium-to-Yeast Transition. *Eukaryot Cell.* 4(12), 2115–2128 (2005).
83. Xiberras J, Klein M, Prosch C, Malubhoy Z, Nevoigt E. Anaplerotic reactions active during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glycerol. *FEMS Yeast Research* [Internet]. 20(foz086) (2020). Available from: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz086>.
84. Jitrapakdee S, Wallace JC. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J.* 340(Pt 1), 1–16 (1999).
85. Binder J, Shadkchan Y, Osherov N, Krappmann S. The Essential Thioredoxin Reductase of the Human Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus* Is a Promising Antifungal Target. *Front. Microbiol.* [Internet]. 0 (2020). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01383/full>.
86. Oliveira LN, Lima P de S, Araújo DS, *et al.* iTRAQ-based proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* in response to hypoxia. *Microbiological Research.* 247, 126730 (2021).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary table S1: Molecular docking details.

SWISS-MODEL						
GMQE	QMEAN	TEMPLATE	RESOLUTION	SEQ Identif	COVERAGE	Ligands

0.58	-2.23	2bmb.1.A	X-ray, 2.30 Å	40.22%	0.75	1 x PMM
------	-------	----------	---------------	--------	------	---------

MolProbity					
Clashscore	Favored Rotamers	Ramachandran Favored	Score MolProbity	Resolution	

0.22	367	431	1.30	98th	
------	-----	-----	------	------	--

Docking		
Ligands	RECEPTOR	FRED SCORE

Compound 3	1	-8.970.508
4-Aminobenzoic acid	1	-7.122.934
Sulfamethoxazole	1	-6.755.193

Supplementary table S2: Proteins with increased expression.

Accession number¹	Protein name	Score²	Fold change³
METABOLISM			
Amino acid metabolism			
PADG_03686	Aspartate aminotransferase	1233	*
PADG_06671	3-isopropylmalate dehydrogenase	595,58	*
PADG_01963	Glycine cleavage system H protein	824,05	*
PADG_06429	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial	1040	1,733
PADG_12025	Glutaryl-CoA dehydrogenase	1411,6	*
PADG_01228	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	1487,9	*
Lipid metabolism			
PADG_07526	Lipase/esterase	571,74	*
PADG_07104	NADH-cytochrome b5 reductase	783,16	*
Nitrogen and sulfur metabolism			
CYN1	Cyanate hydratase	1162,1	*
Nucleotide metabolism			
PADG_05225	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	689,31	*
PADG_00190	IMP-specific 5'-nucleotidase 1	607,27	*
PADG_01100	Uracil phosphoribosyltransferase	569,08	1,391
Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups			
PADG_00443	Dihydropteroate synthase	730,33	*
C-compound and carbohydrate metabolism			
PAAG_05761	4-carboxymuconolactone decarboxylase family protein	884,15	*
PADG_04698	Extradiol ring-cleavage dioxygenase	761,2	*
ENERGY			
Citrate cycle			
PADG_08387	Citrate synthase	3570,3	1,377
PADG_00246	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	790,66	*
Electron transport and membrane-associated energy conservation			
PADG_08460	NADPH dehydrogenase	748,2	*
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING			
Cell cycle			

PADG_04810	GTP-binding nuclear protein	629,23	2,293
PADG_05693	Cell division control protein 48	985,09	*
PADG_00951	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	864,81	*
PADG_00183	Profilin	5185,2	1,733
DNA processing			
PADG_04557	DNA excision repair protein ERCC-1 replication fork protection complex	492,56	*
PADG_11078	subunit Csm3/Swi3	1133	*
TRANSCRIPTION			
PADG_01878	Pre-mRNA-processing factor 31	768,4	*
PADG_05652	Pre-mRNA-splicing factor cwc23	726,5	*
PADG_04075	rRNA processing protein RRP9	692,3	*
PADG_06856	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	810,4	*
PROTEIN SYNTHESIS			
PADG_06048	40S ribosomal protein S27	4488,5	2,387
PADG_01026	60S ribosomal protein L43	5215,9	2,117
PADG_05244	60S ribosomal protein L44	827,24	*
PADG_07924	60S ribosomal protein L24	750,97	*
PADG_03325	60S ribosomal protein L21	6011,5	*
PADG_04315	40S ribosomal protein S24	2242,1	*
PADG_01427	40S ribosomal protein S12	2401,3	1,336
PADG_02445	40S ribosomal protein S15	4509,9	1,363
PADG_06110	Translation initiation factor SUI1	850,35	1,35
PADG_08244	60S acidic ribosomal protein P1	22394	1,433
PADG_01387	60S ribosomal protein L7	1068,1	1,477
PADG_04731	60S ribosomal protein L14	545,06	1,492
PROTEIN FATE			
Protein folding and stabilization			
PADG_12323	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1255,7	1,507
PADG_05239	Tubulin-specific chaperone A	530,54	1,768
Protein degradation			
PADG_04795	Deubiquitination-protection protein dph1	664,77	*
PADG_07190	Proteasome endopeptidase complex	691,74	*
PADG_00071	26S proteasome regulatory subunit RPN10	469,45	*
PADG_03274	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim9	570,52	*
PADG_07515	UBX domain-containing protein	543,36	*

PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT

PADG_00872	Histone H4	1114	1,363
PADG_07134	Histone H4	1007,3	*

CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES

PADG_08391	Plasma membrane ATPase	800,11	*
PADG_01440	ADP, ATP carrier protein	769,22	*
PADG_03524	Coiled-coil domain-containing protein	926,46	*
PADG_07023	Carnitine O-acetyltransferase	628,76	*

CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM

PADG_08191	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	488,94	*
------------	--	--------	---

CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE

PADG_03963	30 kDa heat shock protein	8793	1,507
PADG_12204	Hydroxyacylglutathione hydrolase	590,39	*

UNCLASSIFIED

PADG_03361	Hypotetical protein	523,88	*
PADG_04086	Hypotetical protein	936,18	*
PADG_08274	Hypotetical protein	477,74	*
PADG_04908	Hypotetical protein	519,55	*
PADG_04475	Hypotetical protein	1682,5	2,075
PADG_00688	Hypotetical protein	2086,5	2,691
PADG_06924	Hypotetical protein	576,86	*
PADG_02473	Hypotetical protein	3869,2	*
PADG_05391	Hypotetical protein	743,37	*
PADG_11804	Hypotetical protein	516,11	*
PADG_02371	Hypotetical protein	475,25	*
PADG_03696	Hypotetical protein	844,73	*
PADG_03456	Hypotetical protein	495,82	*
PADG_11789	Hypotetical protein	554,86	*
PADG_02181	Hypotetical protein	558,25	*
PADG_11826	Hypotetical protein	908,85	*
PADG_05034	Hypotetical protein	678,83	*
PADG_11424	Hypotetical protein	863,96	*
PADG_03117	Hypotetical protein	1939,3	*
PADG_04343	Hypotetical protein	748,87	*
PADG_01788	Hypotetical protein	1052,9	*
PADG_11262	Hypotetical protein	681,18	*
PADG_05823	Hypotetical protein	495,99	*
PADG_06105	Hypotetical protein	741,44	*

PADG_06080	Hypotetical protein	567,98	*
PADG_02858	Hypotetical protein	1514,3	*
PADG_08007	Hypotetical protein	485,09	*
PADG_04322	Hypotetical protein	969,46	*
PADG_03488	Hypotetical protein	607,3	*
PADG_01796	Hypotetical protein	791,28	*
PADG_00345	Hypotetical protein	773,91	*
PADG_06647	Hypotetical protein	694,59	*
PADG_06426	Hypotetical protein	1036,35	*

¹**Access number:** obtained from the *Paracoccidioides brasiliensis*:

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html

²**Score:** probability for the prediction of peptides.

³**Fold change:** change in protein abundance. A threshold of 1.3 was established

* Indicate the proteins found exclusively in the treated sample.

Supplementary table S3: Proteins with decreased expression.

Accession number ¹	Protein name	Score ²	Fold change ³
METABOLISM			
Amino acid metabolism			
PADG_02726	Cysteine synthase	623,61	0,0735346
PADG_01418	Cysteine dioxygenase	555,97	*
PADG_01886	Adenosylhomocysteinase	2279,1	*
PADG_07031	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	514,18	*
PADG_06876	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	1259,2	*
PADG_01286	Homoisocitrate dehydrogenase	812,56	*
PADG_01328	* Ornithine aminotransferase	492,72	*
PADG_07609	Dihydroxy-acid dehydratase	536,45	*
PADG_08468	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3090,2	0,6570468
PADG_07029	Acetylorntithine aminotransferase	494,48	*
PADG_01564	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (Acylyating)	2555,4	0,4867522
PADG_04516	Glutamate dehydrogenase	453,35	0,6976763
PADG_08464	Maleylacetoacetate isomerase	819,5	0,7482636
PADG_05492	Serine 3-dehydrogenase	517,22	0,0281559
PADG_02456	Cystathionine gamma-lyase	451,87	*
Lipid metabolism			
PADG_06425	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	638,53	*
PADG_01687	3-ketoacyl-CoA thiolase B	8061,2	0,6440364
PAAG_03689	3-ketoacyl-CoA thiolase B	2118,4	0,6187834
PADG_02751	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	5302,7	0,4867522
PADG_05310	Leukotriene A(4) hydrolase	696,69	0,3395955
PADG_00546	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	699,3	*
Nitrogen and sulfur metabolism			
PADG_07674	Carbonic anhydrase	895,28	0,7557837
PADG_02728	Sulfite oxidase	1193,2	0,664
PADG_02048	Nitroreductase family protein	2115	0,6376282
Nucleotide metabolism			
PADG_02183	ADP-ribose pyrophosphatase	510,32	*
PADG_08066	Purine nucleoside phosphorylase	562,9	*
PADG_00832	Adenylosuccinate synthetase	754,18	*
PADG_07585	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	553,59	*
PADG_04867	Allantoate amidohydrolase	525,2	*

PADG_02246	Adenosine kinase	1532,6	0,310367
Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups			
PADG_05357	Hydroxyethylthiazole kinase	507,32	*
PADG_00344	Iron-sulfur cluster assembly 2	632,15	*
C-compound and carbohydrate metabolism			
PADG_12009	Trehalose 6-phosphate phosphatase	749,18	*
PADG_12426	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	612,63	*
PADG_03859	Chlorophyll synthesis pathway protein BchC	492,35	*
PADG_00912	UDP-galactopyranose mutase	919,19	*
ENERGY			
Glycolysis and gluconeogenesis			
PADG_00451	Glucose-6-phosphate isomerase	1288	0,748
PADG_01896	Phosphoglycerate kinase	601,36	0,583
PADG_04103	Pyruvate carboxylase	1013,5	*
Fermentation			
PADG_03403	Aldehyde dehydrogenase	662	*
PADG_00714	Pyruvate decarboxylase	1352,2	0,4065697
PADG_00171	L-lactate dehydrogenase (cytochrome)	777,57	0,5655254
Citrate cycle			
PADG_07213	Acetyltransferase component of pyruvate Dehydrogenase complex	4965,1	0,651
PADG_11845	Aconitate hydratase, mitochondrial	4011,4	*
PADG_05904	Dihydrolipoamide succinyltransferase (PADG_05904)	949,45	0,763
Electron transport and membrane-associated energy conservation			
PADG_04501	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	1017,6	0,4231621
PADG_04397	Cytochrome c oxidase subunit 4, mitochondrial	644,97	*
PADG_07813	ATP synthase F1, gamma subunit	2694,5	0,733
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING			
Cell cycle			
PADG_00849	Nuclear segregation protein Bfr1	545,41	*
PADG_11857	Mitotic checkpoint protein BUB3	483,49	*
TRANSCRIPTION			
RNA synthesis			
PADG_06182	Transcriptional repressor TUP1	557,49	*

RNA processing

PADG_05587	U2 small nuclear ribonucleoprotein B	662,93	*
PADG_00167	Pre-mRNA-splicing factor cwc26	512,7	*
PADG_07884	Polyadenylate-binding protein	715,74	*
URM1	Ubiquitin-related modifier 1	519,56	*

PROTEIN SYNTHESIS

PADG_00878	Isoleucine-tRNA ligase	526,73	*
PADG_08472	Lysine--tRNA ligase	791,31	*
PADG_05897	Serine-tRNA ligase	674,78	*
PADG_07888	Eukaryotic translation initiation factor 5A	489,18	*
PADG_07977	Eukaryotic translation initiation factor 1A	1319,5	*
PADG_01914	60S ribosomal protein L35	777,68	*
PADG_01654	40S ribosomal protein S6	2047,2	
PADG_05686	ribosome biogenesis protein	493,42	*
PADG_03316	40S ribosomal protein S4	492,28	*
PADG_04730	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	3260,1	0,6570468
PADG_04657	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	4699,5	0,6505091
PADG_07870	small subunit ribosomal protein S7	568,66	*
PADG_02828	Ribosomal protein	623,84	0,698
PADG_07803	60S ribosomal protein L12	1667,4	0,756
PADG_02446	60S acidic ribosomal protein P2	7855,9	0,7633795
PADG_01949	Elongation factor Tu	653,62	0,7633795
PADG_02759	Ribosome recycling factor	1315,6	0,6440364

PROTEIN FATE**Protein folding and stabilization**

PADG_05203	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	574,3	*
PADG_00001	- Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2196,4	0,5827482
PADG_03319	Protein translocase SEC61 complex gamma subunit, archaeal and eukaryotic	489,29	*

Protein degradation

PADG_00634	Vacuolar protease A	712,83	*
PADG_03192	Proteasome component PUP2	982,94	*
PADG_03965	Proteasome subunit beta	1120,8	0,6570468
PADG_08087	Proteasome subunit beta type	894,7	0,6376282
PADG_08442	Proteasome subunit alpha type	1454,7	*
PADG_01605	Polyubiquitin	4980,2	0,4771139
PADG_07891	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	4439,9	0,4630131

PADG_00995	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	4955,2	0,4916442
PADG_06290	Proteosome endopeptidase complex	717,99	*
PADG_04167	*Aspartyl aminopeptidase	534,5	*
PADG_03149	Aminopeptidase	561,11	*
PADG_04092	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1105	0,7046881
AMPP	Probable Xaa-Pro aminopeptidase P	498,91	0,7117703
PADG_03680	Proteasome subunit beta type	744,77	0,7557837
PADG_07460	Vacuolar aminopeptidase	672,84	0,7408182
PADG_06753	COXassembly mitochondrial protein	577,41	*

PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT

PADG_05907	Histone H2B	786,59	*
PADG_05608	GTP-binding protein ypt7	538,8	*
PADG_00282	GTP-binding protein ypt2	699,14	*
PADG_08342	GTP-binding protein ypt1	927,62	*
PADG_00326	ADP-ribosylation factor-like protein 1	483,72	*
PADG_06294	Hsp70 nucleotide exchange factor fes1	540,44	*
PADG_05032	Hsp90 binding co-chaperone (Sba1)	2658,8	0,502
PADG_04311	Cellular nucleic acid-binding protein	1333	0,4676664

CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES

PADG_08188	Vacuolar-sorting protein snf7	505,79	*
PADG_03175	V-type proton ATPase subunit F	740,31	*
PADG_04319	V-type ATPase, G subunit	568,35	*

CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE

PADG_05504	Thioredoxin	12749	0,6187834
PADG_03163	Cytochrome C peroxidase	4243,5	0,4317105
PADG_07946	Peroxisomal matrix protein	1057,9	0,6636503
PADG_03204	Stress responsive A/B barrel domain-containing protein	901,61	*
PADG_07699	S-formylglutathione hydrolase	486,3	0,7189237
PADG_04559	Progesterone binding protein	5505,4	0,677
PADG_07634	Averantin oxidoreductase	579,86	*
PADG_04288	L-PSP endoribonuclease family protein (Hmf1)	34606	0,7557837

UNCLASSIFIED

PADG_06202	Hypotetical protein	488,15	*
PADG_03822	Hypotetical protein	870,41	*
PADG_03455	Hypotetical protein	493,53	*
PADG_01812	Hypotetical protein	685,66	*
PADG_03159	Hypotetical protein	727,88	*
PADG_07506	Hypotetical protein	1174,3	*

PADG_02338	Hypotetical protein	1122,4	*
PADG_00429	Hypotetical protein	546,57	*
PADG_12020	Hypotetical protein	1139,5	*
PADG_11854	Hypotetical protein	720,69	*
PADG_03115	Hypotetical protein	1656,2	0,4025242
PADG_03210	Hypotetical protein	1851,8	0,204
PADG_00674	Hypotetical protein	1279,9	0,1188373
PADG_00674	Hypotetical protein	581,94	0,1164841
PADG_05149	Hypotetical protein	526,05	*
PADG_06136	Hypotetical protein	2984,4	*
PADG_00211	Hypotetical protein	1655,3	*
PADG_06568	Hypotetical protein	14877	0,5543273
PADG_08483	Hypotetical protein	642,05	0,5488116
PADG_11079	Hypotetical protein	866,15	0,5117086
PADG_05032	Hypotetical protein	1911,5	0,6126264
PADG_08615	Hypotetical protein	7305,4	0,6187834
PADG_12432	Hypotetical protein	1409	*
PADG_00541	Hypotetical protein	1357,6	*
PADG_11306	Hypotetical protein	504,48	*
PADG_02465	Hypotetical protein	456,99	*
PADG_00824	Hypotetical protein	727,85	*
PADG_00578	Hypotetical protein	539,85	*
PADG_00818	Hypotetical protein	514,45	*
PADG_00465	Hypotetical protein	5427,2	*
PADG_00169	Hypotetical protein	554,18	*
PADG_03654	Hypotetical protein	1423,1	*
PADG_07740	Hypotetical protein	489,41	*
PADG_03407	Hypotetical protein	567,03	*
PADG_01773	Hypotetical protein	656,73	*
PADG_08368	Hypotetical protein	515,24	*
PADG_00893	Hypotetical protein	498,06	*
PADG_03997	Hypotetical protein	569,69	*
PADG_11453	Hypotetical protein	515,54	*
PADG_05600	Hypotetical protein	776,99	*
PADG_11333	Hypotetical protein	620,53	*
PADG_06470	Hypotetical protein	692,94	*
PADG_11317	Hypotetical protein	684,06	*
PADG_05491	Hypotetical protein	781,02	*
PADG_07287	Hypotetical protein	675,67	*
PADG_12447	Hypotetical protein	775,53	*
PADG_02352	Hypotetical protein	5357	*
PADG_11502	Hypotetical protein	504,35	*
PADG_06118	Hypotetical protein	538,28	*
PADG_01363	Hypotetical protein	8490,8	0,67032
PADG_00158	Hypotetical protein	676,07	0,67032

PADG_01366	Hypotetical protein	2321,8	0,6907343
PADG_02764	Hypotetical protein	993,31	0,733447
PADG_01857	Hypotetical protein	6480,1	0,7046881
PADG_08724	Hypotetical protein	2168,2	0,7482636
PADG_03219	Hypotetical protein	1702,3	*
PADG_03097	Hypotetical protein	671,88	*
PADG_12327	Hypotetical protein	951,24	*
PADG_11713	Hypotetical protein	654,04	*

¹**Access number:** obtained from the *Paracoccidioides brasiliensis*:

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html

²**Score:** probability for the prediction of peptides.

³**Fold change:** change in protein abundance. A trashold of 1.3 was established

* Indicate the proteins found exclusively in the control sample.

A rectangular area at the bottom of the page features a blurred, grayscale microscopic image of cells, likely showing cell walls and internal structures. The text 'Capítulo 3' is overlaid on this image in a large, white, sans-serif font.

Capítulo 3

CONCLUSÃO

Por meio da abordagem proteômica por espectrometria de massas, verificou-se as mudanças no perfil das proteínas expressas após o tratamento com o **composto 3**. Este derivado da chalcona causou distúrbios no metabolismo de carboidratos e lipídios, além de prejudicar a produção de energia. Hipotetiza-se que a expressão interrompida de alguns componentes do ciclo do citrato e da cadeia de transporte de elétrons causou uma diminuição na atividade mitocondrial. Este mau funcionamento, por sua vez, causou aumento na produção de ROS e rigidez da membrana. Por fim, as análises *in silico* apontam para o papel desse composto como um suposto inibidor da diidropteroato sintase. Juntos, todos esses resultados destacam este derivado de chalcona como um fármaco promissor na terapia anti-PCM e servem como estímulo para a promoção de estudos contínuos que validem seu uso para o tratamento da infecção.

PERSPECTIVAS

As perspectivas que surgem a partir dos resultados obtidos com este trabalho envolvem:

- Avaliar o efeito do **composto 3** sobre a eficiência de macrófagos da linhagem J774 em eliminar as leveduras de *P. brasiliensis* previamente expostas a este composto;
- Padronização do ensaio cometa em células de *P. brasiliensis* para verificar possíveis danos causados ao DNA do fungo pelo **Compound 3**;
- Performar ensaios de virulência das leveduras de *P. brasiliensis* expostas ao **composto 3** em um modelo de *Galleria mellonella*.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 347–355, set. 2016.
- ALBANO, A. P. N. et al. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 46, n. 2, p. 513–517, jun. 2015.
- ALWAN, W. S. et al. Novel imidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 514–525, 5 maio 2015.
- ANDRADE, J. T. et al. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti- *Candida* agents. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 8, p. 702–712, ago. 2018.
- ANDRADE, U. V. et al. Treatment compliance of patients with paracoccidioidomycosis in Central-West Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, n. 2, 2019.
- ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182–196, 1 fev. 2017.
- AYMAN, M. et al. Targeting microbial resistance: Synthesis, antibacterial evaluation, DNA binding and modeling study of new chalcone-based dithiocarbamate derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 282–292, 1 abr. 2019.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313–318, 1 abr. 2013.
- BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 229, 17 set. 2013.
- BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–1191, 1 set. 2013.
- BORBA, J. V. V. B. et al. Chemoproteomic identification of molecular targets of antifungal prototypes, thiosemicarbazide and a camphene derivative of thiosemicarbazide, in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0201948, 27 ago. 2018.
- BOSCO, S.; BAGAGLI, E. Paracoccidioidomycosis in Animals and Humans. In: **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**. [s.l: s.n.]. p. 129–145.
- C. P., T. et al. *Paracoccidioides* spp. and *Histoplasma capsulatum*: Current and New Perspectives for Diagnosis and Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1333–1348, 31 maio 2018.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. **Paracoccidioides Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies**. Review Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/5313691/>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 01 2017.
- CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. Dihydropteroate Synthase (Sulfonamides) and Dihydrofolate Reductase Inhibitors. In: **Bacterial Resistance to Antibiotics – From Molecules to Man**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2019. p. 163–172.
- CASTRO, L. F. DE et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470–485, 1 nov. 2013.
- CHAVES, A. F. A. et al. Updates in Paracoccidioides Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 116, fev. 2021.
- COSTA, A. N. et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 68, n. 4, p. 441–448, abr. 2013.
- DA COSTA, A. D. et al. Voice disorders in residual paracoccidioidomycosis in upper airways and digestive tract. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 3, p. 180–184, 1 jul. 2017.
- DAS, M.; MANNA, K. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. **Journal of Toxicology**, v. 2016, 2016.
- DAVIES, K. M. et al. The Evolution of Flavonoid Biosynthesis: A Bryophyte Perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.
- DE CARVALHO TAVARES, L. et al. Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4448–4456, 1 set. 2011.
- DE SÁ, N. P. et al. Antifungal activity of 6-quinolinylnyl N-oxide chalcones against Paracoccidioides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 841–845, 1 mar. 2015.
- DE SÁ, N. P. et al. Effects of two 6-quinolinylnyl chalcones on the integrity of plasma membrane of Paracoccidioides brasiliensis. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 3, p. 277–284, mar. 2017.
- DO CARMO SILVA, L. et al. Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going? **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 300, dez. 2020.
- DREWES, G.; KNAPP, S. Chemoproteomics and Chemical Probes for Target Discovery. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1275–1286, 1 dez. 2018.
- E SILVA, K. S. et al. Response of Paracoccidioides lutzii to the antifungal camphene thiosemicarbazide determined by proteomic analysis. **Future Microbiology**, v. 13, n. 13, p. 1473–1496, 1 out. 2018.
- FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.
- FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161–165, 1 dez. 2009.

FONTANA, F. F. et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 159–165, mar. 2010.

FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516–524, jun. 2011.

FRANTZI, M.; LATOSINSKA, A.; MISCHAK, H. Proteomics in Drug Development: The Dawn of a New Era? **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 13, n. 2, p. 1800087, 2019.

GAVIRIA, M. et al. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 376–383, 1 jul. 2015.

GILLET, L. C.; LEITNER, A.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 449–472, 12 jun. 2016.

GOMES, M. N. et al. Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1210, ago. 2017.

GRIFFITHS, J.; COLOMBO, A. L.; DENNING, D. W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007195, 16 maio 2019.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, Analytical Techniques/Mechanisms. v. 12, n. 5, p. 483–490, 1 out. 2008.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67–202, 1 nov. 2002.

HIGGS, J. et al. Chalcone derivatives: synthesis, in vitro and in vivo evaluation of their anti-anxiety, anti-depression and analgesic effects. **Heliyon**, v. 5, n. 3, 19 mar. 2019.

HRYCYK, M. F. et al. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, v. 56, n. 8, p. 950–962, 1 nov. 2018.

JIANG, Y. et al. Phylogeny, ecology and taxonomy of systemic pathogens and their relatives in Ajellomycetaceae (Onygenales): *Blastomyces*, *Emergomyces*, *Emmonsia*, *Emmonsiiellopsis*. **Fungal Diversity**, v. 90, n. 1, p. 245–291, 1 maio 2018.

KANT, R. et al. Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 113, p. 34–49, 4 maio 2016.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 1 out. 2009.

LIN, M.-Y. et al. Effect of loureirin A against *Candida albicans* biofilms. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 17, n. 8, p. 616–623, 1 ago. 2019a.

LIN, Y. et al. A novel chalcone derivative exerts anti-inflammatory and anti-oxidant effects after acute lung injury. **Aging (Albany NY)**, v. 11, n. 18, p. 7805–7816, 24 set. 2019b.

- MARIO, D. N. et al. Paracoccidioidomycosis in the northern region of Rio Grande do Sul. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 10, n. 4, 2020.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700–711, out. 2013.
- MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 11–20, set. 2015.
- MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, mar. 2017.
- MASCARELLO, A. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Tetrahedron Young Investigator Award 2010: Professor Seeberger. v. 18, n. 11, p. 3783–3789, 1 jun. 2010.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus Paracoccidioides brasiliensis as Revealed by Gene Genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 1 jan. 2006.
- MELO, W. C. M. A. et al. Selective photoinactivation of Histoplasma capsulatum by water-soluble derivatives chalcones. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 232–235, 1 jun. 2017.
- MENDES, J. F. et al. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by Paracoccidioides lutzii. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 402–406, 2017a.
- MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224–282, 2017b.
- MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases. **Community Eye Health**, v. 26, n. 82, p. 21–24, 2013.
- NETO, J. M. L. et al. Sequelae lesions in the larynxes of patients with Paracoccidioidomycosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, p. 39–43, 1 jan. 2011.
- NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125–137, 1 fev. 2007.
- OMOSA, L. K. et al. Antibacterial activities and structure–activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 27 jun. 2016.
- OZASLAN, M.; OGUZKAN, S. B. Use of Plant Extracts in Alternative Medicine. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 21, n. 1, p. 1–7, 2018.
- PAZ, G. S. DA et al. Infection by Histoplasma capsulatum, Cryptococcus spp. and Paracoccidioides brasiliensis in bats collected in urban areas. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1797–1805, 2018.
- PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. **Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 51, n. 12, p. 705–718, dez. 2015.

- PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, maio 2009.
- PRADO, R. S. et al. Proteomic profile response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal argentilactone. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* Ultrastructural Findings. In: FRANCO, M. et al. (Eds.). . **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC Press, 1994. p. 27–47.
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 1 nov. 2017.
- RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. DO E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, International Dermatology. v. 26, n. 2, p. 257–269, 1 abr. 2008.
- RESTREPO, A. et al. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 182–197, abr. 2008.
- RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 1 ago. 2004.
- ROCHA-SILVA, F. et al. Paracoccidioidomycosis: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* genome in biological samples by quantitative chain reaction polymerase (qPCR). **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 359–362, 1 ago. 2018.
- RODRIGUES, M. L.; ALBUQUERQUE, P. C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006479, 14 jun. 2018.
- SACRISTÁN, C. et al. Paracoccidioidomycosis ceti in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 585–587, 2018.
- SAHU, N. K. et al. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–225, 2012.
- SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n. 6, p. 613–624, 2010.
- SALZER, H. J. F. et al. Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. **Respiration; International Review of Thoracic Diseases**, v. 96, n. 3, p. 283–301, 2018.
- SASIDHARAN, R. et al. Anti-inflammatory effect of synthesized indole-based chalcone (2E)-3-(4-bromophenyl)-1-(1H-indol-3-yl) prop-2-en-1-one: an in vitro and in vivo studies. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 41, n. 6, p. 568–576, dez. 2019.
- SELEEM, D. et al. In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Lichochoalcone-A against *Candida albicans* Biofilms. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157188, 10 jun. 2016.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, jun. 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS TREATMENT. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 31–37, set. 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, set. 2017.

SILVA FERREIRA, C. et al. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. **Future Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 973–985, 1 jul. 2016.

SILVA, G. et al. Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. **Molecular Carcinogenesis**, v. 55, n. 10, p. 1438–1448, 2016.

SILVA, L. C. et al. Computer-aided identification of novel anti-paracoccidioidomycosis compounds. **Future Microbiology**, v. 13, n. 13, p. 1523–1535, 1 out. 2018.

SINGULANI, J. DE L. et al. Fungal-host interactions: insights into microRNA in response to *Paracoccidioides* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 3 ago. 2020.

SOLOMON, V. RAJA.; LEE, H. Anti-breast cancer activity of heteroaryl chalcone derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 3, p. 213–220, 1 abr. 2012.

TAVARES, A. H. et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genetics and Biology**, v. 81, p. 98–109, 1 ago. 2015.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 1 ago. 2009.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 30 out. 2014.

TELES, F. R. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2254–2264, 15 out. 2011.

TIRADO-SÁNCHEZ, A.; GONZÁLEZ, G. M.; BONIFAZ, A. Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 11, p. 1105–1117, 1 nov. 2020.

TOBÓN, A. M. et al. Residual Pulmonary Abnormalities in Adult Patients with Chronic Paracoccidioidomycosis: Prolonged Follow-Up after Itraconazole Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 7, p. 898–904, 1 out. 2003.

TURINI GONZALES MARIOTO, D. et al. Study of differential expression of miRNAs in lung tissue of mice submitted to experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 55, n. 7, p. 774–784, 1 out. 2017.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, 1 set. 2017.

UEDA, K. et al. *Trichosporon asteroides* Isolated from Cutaneous Lesions of a Suspected Case of “paracoccidioidomycosis ceti” in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). **Mycopathologia**, v. 182, n. 9, p. 937–946, 1 out. 2017.

- UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 1 jul. 2004.
- VIDAL, M. S. M. et al. Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: High Rate of Inter-laboratorial Variability among Medical Mycology Reference Centers. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3174, 11 set. 2014.
- VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.
- VILELA, R. et al. The taxonomy of two uncultivated fungal mammalian pathogens is revealed through phylogeny and population genetic analyses. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18119, 13 set. 2021.
- WEBER, S. A. T. et al. Dysphonia and laryngeal sequelae in paracoccidioidomycosis patients: a morphological and phoniatic study. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 219–225, 1 maio 2006.
- WECKE, T.; MASCHER, T. Antibiotic research in the age of omics: from expression profiles to interspecies communication. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2689–2704, 1 dez. 2011.
- WENZEL, M.; BANDOW, J. E. Proteomic signatures in antibiotic research. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 15, p. 3256–3268, 2011.
- WHO/DEPARTMENT OF CONTROL OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES. **Ending the neglected to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021-2030**, 15 maio 2020. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/resources/who-ucn-ntd-2020.01/en/>
- XIE, Y. et al. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132–149, 2015.
- YADAV, P. et al. Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1,2,3-triazole conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 263–274, 15 jul. 2018.
- ZHANG, E.-H. et al. An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2013, p. 815621, 2013.
- ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 28 jun. 2017.

ANEXOS: ARTIGOS EM COLABORAÇÃO

Anexo 1: Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going?



Review

Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going?

Lívia do Carmo Silva ^{1,2,*†}, Amanda Alves de Oliveira ^{1,2}, Dienny Rodrigues de Souza ^{1,2},
Katheryne Lohany Barros Barbosa ^{1,2}, Kleber Santiago Freitas e Silva ¹,
Marcos Antonio Batista Carvalho Júnior ¹, Olívia Basso Rocha ¹, Raísa Melo Lima ^{1,2},
Thaynara Gonzaga Santos ^{1,2}, Célia Maria de Almeida Soares ¹ and Maristela Pereira ^{1,*†}

¹ Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia 74690-900, GO, Brazil; o.amanda.alves@gmail.com (A.A.d.O.); diennybiotec@gmail.com (D.R.d.S.); katherynelohany@gmail.com (K.L.B.B.); smallbinho@hotmail.com (K.S.F.eS.); carvalhojr.biolic@gmail.com (M.A.B.C.J.); oliviabassorochoa@gmail.com (O.B.R.); raisamelolima@hotmail.com (R.M.L.); thaynara075@hotmail.com (T.G.S.); cmasoares@gmail.com (C.M.d.A.S.)

² Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia 74605-050, GO, Brazil

* Correspondence: liviacarmo@ufg.br (L.d.C.S.); mani@ufg.br (M.P.); Tel/Fax: +55-62-3521-1110 (M.P.)

† To whom correspondence and material requests should be addressed to Laboratory for Molecular Biology, Federal University of Goiás, Avenida Esperança, s/n, ICB2, Sala 206, Goiânia 74690-900, GO, Brazil.

Received: 23 September 2020; Accepted: 16 November 2020; Published: 19 November 2020



Abstract: Paracoccidioidomycosis is a neglected disease that causes economic and social impacts, mainly affecting people of certain social segments, such as rural workers. The limitations of antifungals, such as toxicity, drug interactions, restricted routes of administration, and the reduced bioavailability in target tissues, have become evident in clinical settings. These factors, added to the fact that Paracoccidioidomycosis (PCM) therapy is a long process, lasting from months to years, emphasize the need for the research and development of new molecules. Researchers have concentrated efforts on the identification of new compounds using numerous tools and targeting important proteins from *Paracoccidioides*, with the emphasis on enzymatic pathways absent in humans. This review aims to discuss the aspects related to the identification of compounds, methodologies, and perspectives when proposing new antifungal agents against PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; antifungal; nanotechnology; patent

1. Introduction

The infection caused by fungi of the genus *Paracoccidioides* was first described by Adolpho Lutz in 1908. In 1971, during the meeting of several mycologists from Latin America in Medellín-Colombia, the term Paracoccidioidomycosis (PCM) was made official to designate the systemic granulomatous infection caused by the thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* [1,2]. Several aspects of the infection remained unknown for a long period, including the taxonomic classification of the pathogen and a more appropriate therapeutic approach [3]. Nowadays, however, the importance of this disease in Latin America is recognized, with it being one of the main causes of deaths due to fungi infections [4].

The eradication of the fungus in the tissues is slow and treatment might last from months to years of antifungal administration. *Paracoccidioides* spp. are sensitive to various systemic antifungals, but the therapeutic options are limited to antifungals that act on two main targets, plasma membrane

Anexo 2: In vitro and in silico analysis reveals antifungal activity and potential targets of curcumin on *Paracoccidioides* spp.

Brazilian Journal of Microbiology
https://doi.org/10.1007/s42770-021-00548-6



CLINICAL MICROBIOLOGY - RESEARCH PAPER



In vitro and in silico analysis reveals antifungal activity and potential targets of curcumin on *Paracoccidioides* spp.

Olivia Basso Rocha¹ · Lívia do Carmo Silva¹ · Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior¹ · Amanda Alves de Oliveira^{1,2} · Célia Maria de Almeida Soares¹ · Maristela Pereira¹

Received: 8 December 2020 / Accepted: 21 June 2021
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

The search for new compounds with activity against *Paracoccidioides*, etiologic agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), is extremely necessary due to the current scenario of the available therapeutic arsenal. Treatment is restricted to three classes of antifungals with side effects. Curcumin is a polyphenol with antifungal effects that is extracted from *Curcuma longa*. The present work aimed to evaluate the activity of curcumin in different species of *Paracoccidioides* and to evaluate the potential molecular targets of curcumin using computational strategies. In addition, interactions with classic antifungals used in the treatment of PCM were evaluated. Curcumin inhibits the growth of *Paracoccidioides* spp. exerting a fungicidal effect. The combination of curcumin with amphotericin B, co-trimoxazole, and itraconazole showed a synergistic or additive interaction. Molecular targets as superoxide dismutase, catalase, and isocitrate lyase were proposed based on in silico approaches. Curcumin affects the fungal plasma membrane and increases the production of reactive oxygen species. Therefore, curcumin is a good alternative for the treatment of PCM.

Keywords Antifungal activity · Curcumin · *Paracoccidioides* spp.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides*, has presented a serious public health problem. The majority of the patients is unable to work due to the sequelae that compromise their vital functions [1, 2]. The treatment of the disease is usually long and lasts from 1 to 2 years, depending on the degree of progression of the disease [3]. In addition, the limitations of antifungals have become increasingly evident in the clinic, such as toxicity, drug interactions, restricted routes of administration, and

reduced bioavailability in target tissues [4], demonstrating the importance of antifungal drug research.

Nature is a rich source of new antifungal compounds and the therapeutic potential of plants is commonly used in popular medicine [5]. Due to the chemical diversity of plants, several researchers have concentrated efforts on the evaluation of the antifungal activity of extracts and essential oils from medicinal plants [6]. Curcumin (1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) is a polyphenolic compound described as the main phytochemical of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae family) rhizome, popularly known as turmeric and has been extensively investigated due to its benefit to human health. This compound presents anti-inflammatory, antimutagenic and anticancer activity [7]. Regarding its antimicrobial potential, antibacterial, antiviral, and antifungal activities have already been reported [8]. Studies have explored the toxicity of turmeric and curcumin and showed that the compound is relatively safe at an orally dose of 6 g/day for 4–7 weeks [9]. In addition, nephroprotective, hepatoprotective, and immunomodulatory effects have been associated with curcumin [10, 11]. Therefore, curcumin is an alternative to current antifungal therapies.

Responsible Editor: Carlos Pelleschi Taborda

Olivia Basso Rocha and Lívia do Carmo Silva contributed equally to this work and share the first authorship.

✉ Maristela Pereira
maristelaufg@gmail.com

¹ Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Avenida Esperança, s/n, ICB2, Sala 206, Goiânia, Goiás 74690-900, Brazil

² Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Published online: 29 July 2021

Springer