UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

LAURA HELENA ARAUJO

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COMO POSSÍVEIS MODULADORES PARA A METACASPASE-2 (TbMCA-IIa) DE *Trypanossoma brucei*

Mogi das Cruzes, SP

2024

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

LAURA HELENA ARAUJO

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COMO POSSÍVEIS MODULADORES PARA A METACASPASE-2 (TbMCA-IIa) DE *Trypanossoma brucei*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado

Mogi das Cruzes, SP

2024

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

A663p

Araujo, Laura Helena

Prospecção de moléculas como possíveis moduladores para a metacaspase-2 (tbMCA-IIa) de *Trypanossoma brucei* / Laura Helena Araujo. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.

140 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado

1.Tripanossomíase Africana 2. Metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* 3. Chalconas/uso terapêutico 4. Flavonóides/uso terapêutico I. Machado, Maurício Ferreira Marcondes II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 616.8498

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES.

Às quatorze horas do dia dois de agosto de dois mil e vinte e quatro, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada "PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COMO POSSÍVEIS MODULADORES PARA A METACASPASE-2 (TbMCA-IIa) DE Trypanossoma brucei" para obtenção do grau de doutor(a) pelo(a) candidato(a) **Laura Helena Araujo**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 72 (setenta e dois), a saber: 36 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da tese o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de doutor(a). A comissão examinadora foi constituída pelos senhores professores doutores: Mauricio Ferreira Marcondes Machado, Wagner Alves de Souza Júdice, e Tatiane Faustino de Moraes, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha, da Universidade Federal do ABC, e Kátia Regina Perez, da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador do(a) aluno(a). A sessão pública da defesa da tese foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir, a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a)) por UNANIMIDADE (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 02 de agosto de 2024.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Profª Drª Kátia Regina Perez	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Profª Drª Tatiane Faustino de Moraes	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))

Dedico esta tese a todos os professores e alunos da Instituição, com a esperança de que possa contribuir com conhecimento e inspiração.

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e pela força que me concedeu ao longo deste caminho de aprendizado e evolução contínua.

À minha família, meu mais profundo agradecimento por sempre estarem ao meu lado, oferecendo apoio e incentivo em cada etapa desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado, expresso minha sincera gratidão por sua orientação, paciência, dedicação e confiança em mim depositada ao longo desta trajetória científica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ferreira Marcondes Machado, meu reconhecimento por disponibilizar as instalações e equipamentos da UNIFESP, bem como por toda a ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Dra. Márcia Paranho Veloso, da Universidade Federal de Alfenas, e Dr. Denis Pires de Lima, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, agradeço por cederem os compostos utilizados neste estudo.

Agradeço a todos os professores, colegas e colaboradores do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) e do Centro de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR) pelo apoio e convivência durante esses anos.

À Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) e à Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP), expresso minha gratidão pela oportunidade concedida para realizar este trabalho.

Por fim, gostaria de expressar meu sincero agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, a qual foi fundamental para a realização deste projeto.

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

"A ciência é a busca incessante pelo conhecimento, que nos capacita a compreender o mundo e a transformá-lo para melhor."
Neil deGrasse Tyson

RESUMO

As metacaspases desempenham um papel importante na regulação da morte celular programada, especialmente em tripanossomatídeos como o *Trypanosoma brucei*, agente causador da Tripanossomíase Humana Africana (THA), doença esta que enfrenta desafios no tratamento devido à eficácia limitada e efeitos colaterais dos medicamentos existentes, tornando necessária a busca por novas moléculas terapêuticas eficazes e seguras. Estratégias inovadoras, como triagens fenotípicas para o desenvolvimento de inibidores seletivos, centrada nas proteases como alvos terapêuticos, também desempenham um papel relevante no progresso de tratamentos antitripanossoma. Nesse estudo foram testadas moléculas derivadas de compostos naturais para avaliar a capacidade de inibição da atividade da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*, e também foi realizada a construção de um sistema celular de seleção de inibidores específicos para a TbMCA-IIa. Os resultados apontaram que as moléculas derivadas de éter de oxima (AO-7, AO-12 e EO-20) e compostos derivados de chalconas e flavonoides (EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C) mostraram eficácia como inibidores, com destaque para AO-12, revelando-se não competitivo, e para os compostos EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C, com valores de IC_{50} mais baixos e mecanismos de inibição competitivos e não-competitivos. Após a clonagem bem-sucedida do gene da TbMCA-IIa em um plasmídeo de baixa cópia, foram realizados testes utilizando $CaCl_2$ para avaliar o crescimento celular, demonstrando que a expressão da metacaspase afetou significativamente o crescimento, enquanto que o clone em pET-28a(+) mostrou maior eficiência com 1 mM de $CaCl_2$. Além disso, no experimento realizado com o gene da TbMCA-IIa em pET-28a(+) foi observado que a adição de glicose influenciou o crescimento celular. Esses testes validam a construção do sistema celular de seleção de inibidores, permitindo futuros testes com bibliotecas de inibidores.

Palavras-chave: metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*; capacidade de inibição; sistema de seleção de inibidores.

ABSTRACT

Metacaspases play an important role in the regulation of programmed cell death, especially in trypanosomatids such as *Trypanosoma brucei*, the causative agent of Human African Trypanosomiasis (HAT), a disease that faces challenges in treatment due to the limited efficacy and side effects of existing drugs. This necessitates the search for new effective and safe therapeutic molecules. Innovative strategies, such as phenotypic screenings for the development of selective inhibitors focused on proteases as therapeutic targets, also play a relevant role in the progress of antitrypanosomal treatments. In this study, molecules derived from natural compounds were tested to evaluate their capacity to inhibit the activity of *Trypanosoma brucei* metacaspase-2. Additionally, a cellular system for the selection of specific inhibitors for TbMCA-IIa was constructed. The results indicated that molecules derived from oxime ether (AO-7, AO-12, and EO-20) and compounds derived from chalcones and flavonoids (EM-1A, EM-1B, EM-1C, and EM-F12C) showed efficacy as inhibitors, with AO-12 standing out as a non-competitive inhibitor, and the compounds EM-1A, EM-1B, EM-1C, and EM-F12C showing lower IC_{50} values and competitive and non-competitive inhibition mechanisms. After the successful cloning of the TbMCA-IIa gene into a low-copy plasmid, tests were conducted using $CaCl_2$ to evaluate cell growth, demonstrating that metacaspase expression significantly affected growth, while the clone in pET-28a(+) showed higher efficiency with 1 mM $CaCl_2$. Moreover, in the experiment conducted with the TbMCA-IIa gene in pET-28a(+), the addition of glucose was observed to influence cell growth. These tests validate the construction of the cellular system for inhibitor selection, enabling future tests with inhibitor libraries.

Keywords: *Trypanosoma brucei* metacaspase-2; inhibition capacity; inhibitor selection system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição geográfica da Tripanossomíase Humana Africana reportada em 2022 21
Figura 2: Estrutura química dos medicamentos utilizados no tratamento da Tripanossomíase Humana Africana 24
Figura 3: Ciclo celular do Trypanosoma brucei 26
Figura 4: Estruturas dos domínios presentes nas metacaspases de Trypanosoma brucei 28
Figura 5: Estrutura tridimensional da TbMCA-IIa 29
Figura 6: Pontos de clivagem do substrato através da ação das endopeptidases e exopeptidases 31
Figura 7: Representação de Schechter e Berger para ligação de um substrato peptídico a uma protease 32
Figura 8: Clãs de peptidases que utilizam um resíduo essencial de cisteína na catálise 33
Figura 9: Representação do mecanismo enzimático referente ao processo de hidrólise de proteínas pelas cisteíno proteases 35
Figura 10: Diagrama representativo de uma reação enzimática 36
Figura 11: Curva de Michaelis-Menten demonstrando o efeito da concentração do substrato na velocidade inicial de uma reação enzimática 38
Figura 12: Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk 39
Figura 13: Esquema ilustrativo de inibição competitiva em uma reação enzimática 40
Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk representando o comportamento da enzima mediante a variação de concentração de um inibidor competitivo 41
Figura 15: Esquema ilustrativo de inibição não competitiva em uma reação enzimática 42
Figura 16: Gráfico de Lineweaver-Burk representando o comportamento da enzima mediante a variação de concentração de um inibido não competitivo 42
Figura 17: Esquema ilustrativo de inibição incompetitiva em uma reação enzimática 43
Figura 18: Gráfico de Lineweaver-Burk representando o comportamento da enzima mediante a variação de concentração de um inibido incompetitivo 44
Figura 19: Síntese de éteres de oxima a partir de oximas e halogenetos de alquil(arila). 45
Figura 20: Exemplos de medicamentos contendo porção éter de oxima 46
Figura 21: Estrutura molecular da chalcona 47
Figura 22: Derivados bioativos de chalcona 48
Figura 23: Estrutura molecular do flavonoide 49
Figura 24: Estruturas das principais classes de flavonoides 50

CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1: NOVEL OXIMIC COMPOUNDS ACTING AS *Trypanosoma brucei* METACASPASE-2 (*Tb*MCA-IIA) POTENTIAL INHIBITORS

Figure 1: Screening of oximic compounds against TbMCA-IIa. Remaining activity of 10 μM of acyl oximes (A) and ether oxime (B) compounds incubated with TbMCA-IIa after 10 minutes of incubation. 82
Figure 2: Inhibitory kinetics profiles of the AO-7 effect against TbMCA-IIa. (A) Hyperbolic rectangular plot, (B) Lineweaver Burk plot showing mixed inhibition, (C) Slope replot, and (D) Intercept replot. 82
Figure 3: Inhibitory kinetics profiles of the EO-20 effect against TbMCA-IIa. (A) Hyperbolic rectangular plot, (B) Lineweaver Burk plot showing mixed inhibition, (C) Slope replot, and (D) Intercept replot. 82
Figure 4: Proposed mechanism of the TbMCA-IIa mixed inhibition. Mixed inhibition mechanism of TB-10 and EO-20 against TbMCA-IIa. The parameter α defines the degree to which inhibitor binding affects the affinity to the enzyme substrate. If $\alpha > 1$, the inhibition mechanism is mixed. Non-competitive inhibition mechanism of AO-12 against TbMCA-IIa. The parameter α defines the degree to which inhibitor binding affects the affinity to the enzyme substrate. If $\alpha = 1$, the inhibition is non-competitive. 82
Figure 5: Inhibitory kinetics profiles of the AO-12 effect against TbMCA-IIa. (A) Hyperbolic rectangular plot, (B) Lineweaver Burk plot showing non-competitive inhibition, (C) Slope replot, and (D) Intercept replot. 82
Figure 6: AO-12 effects on the TbMCA-IIa structure. (A) effect of AO-12 on the structure of TbMCA-IIa WT, where (•) without compound, (0) with 2 μM of AO-12 and (•) with 10 μM of AO-12; (B) effect of AO-12 on the structure of TbMCA2 D189/190A, where (•) without compound, (0) with 2 μM of AO-12 and (•) with 10 μM of AO-12 and (C) Evident based on changes in the maximum fluorescence intensity at an emission wavelength of 330 nm upon increased AO-12 concentration. 82
Figure 7: Molecular docking of AO-12 against TbMCA-IIa. (A) 3D representation of the AO-12 proximity to the TbMCA-IIa calcium-binding site, comprised by Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190}, and Asp^{220} amino acid residues, (B) 3D representation of the amino acid residues involved in the four H-bonds established with AO-12. 82

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2: COMPOSTOS DERIVADOS DE CHALCONAS E FLAVONOIDES COMO AGENTES MODULADORES DA METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa)

Figura 1: Triagem das moléculas sobre a atividade da metacaspase-2 de Trypanosoma brucei. Atividade remanescente da TbMCA-IIa com (■) 1 μM e (▫) 6 μM dos compostos das classes chalconas e flavonoides.. 104
Figura 2: Cinética de inibição do composto EM-1A frente a TbMCA-IIa. (○) Controle; (●) 1 μM; (□) 2 μM; (■) 3 μM; (△) 4 μM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto. 104

Figura 3: Cinética de inibição do composto EM-1B frente a TbMCA-IIa. (○) Controle; (●) 1 μM; (□) 2 μM; (■) 3 μM; (△) 4 μM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto. 104
Figura 4: Cinética de inibição do composto EM-1C frente a TbMCA-IIa (○) Controle; (●) 1 μM; (□) 2 μM; (■) 3 μM; (△) 4 μM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto. 104
Figura 5: Cinética de inibição do composto EM-F12C frente a TbMCA-IIa (○) Controle; (●) 1 μM; (□) 2 μM; (■) 3 μM; (△) 4 μM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto. 104
Figura 6: Perfil do mecanismo de inibição competitivo da TbMCA-IIa pelos compostos EM-1A, EM-1C e EM-F12C......104
Figura 7: Perfil do mecanismo de inibição não competitivo da TbMCA-IIa pelo composto EM-1B......104
Figura 8: Variação de pH e a interação do inibidor competitivo EM-1A no sítio ativo da TbMCA-IIa......104

CAPÍTULO 3 – CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR DE SELEÇÃO DE INIBIDORES PARA A METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei*

Figura 1: Amplificação do gene da TbMCA-IIa.....123
Figura 2: Amplificação do plasmídeo Den Trx pColA 123
Figura 3: Triagem das colônias transformadas com o gene da TbMCA-IIa 125
Figura 4: Preparação para sequenciamento da amostra de TbMCA-IIa no plasmídeo Den TR x pColA 126
Figura 5: Influência da variação de concentração de $CaCl_2$ no crescimento das colônias contendo o gene da TbMCA-IIa no plasmídeo com origem de replicação pColA 127
Figura 6: Influência da variação de concentração de $CaCl_2$ no crescimento das colônias com o gene da TbMCA-IIa em pET-28a(+) 129
Figura 7: Efeito da adição de glicose no crescimento das colônias com o gene da TbMCA-IIa em pET-28a(+).....131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1: NOVEL OXIMIC COMPOUNDS ACTING AS *Trypanosoma brucei* METACASPASE-2 (*Tb*MCA-IIA) POTENTIAL INHIBITORS

Table 1: Inhibitory potential (IC50) values for AO-7, AO-12, and EO-20 80
Table 2: Binding affinity energy values (Affinity) of AO-7, AO-12, and EO-20 ligands interacting with TbMCA-IIa, number of H-bonds, and other intermolecular interactions established between them.....81

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2: COMPOSTOS DERIVADOS DE CHALCONAS E FLAVONOIDES COMO AGENTES MODULADORES DA METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa)

Tabela 1: Estrutura molecular dos compostos derivados chalconas e flavonoides. 104
Tabela 2: Potencial inibitório (IC50) dos compostos derivados de chalconas e flavonois na modulação da atividade enzimática da TbMCA-IIa......104
Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos mecanismos de inibição e valores de afinidade dos compostos EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C......104

CAPÍTULO 3 – CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR DE SELEÇÃO DE INIBIDORES PARA A METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei*

Tabela 1: Condições da PCR para amplificação do gene da TbMCA-IIa 116
Tabela 2: Condições da PCR para amplificação do plasmídeo.....116
Tabela 3: Parâmetros utilizados na PCR para a confirmação da clonagem.....119
Tabela 4: Condições da PCR para amplificação DNA recombinante 120
Tabela 5: Condições utilizadas no teste para avaliação do crescimento celular sob diferentes concentrações de $CaCl_2$.....121

ABREVIATURAS E SIGLAS

13C-NMR Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (C13)

1H-NMR Ressonância magnética de prótons

Abz Ácido orto-aminobenzóico

DMSO Dimetilsulfóxido

d doubleto

dd duplo doubleto

DTT Ditiotreitol

EDDnp N- (2,4-dinitrofenil) etilenodiamina

FRET Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência

Hz Hertz

IPTG Isopropil-β-d-1-tiogalactopiranósido

J constantes de acoplamento

m multipleto

MCA Metacaspase

MHz Megahertz

PBS Tampão fosfato-salino

PCD Programmed Cell Death

ppm partes por milhão

s singleto

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

TbMCA-IIa Metacaspase- 2 *Trypanosoma brucei*

THA Tripanossomíase Humana Africana

TLC Thin-layer chromatography

TMS Tetrametilsilano

UAF Unidades Arbitrárias de Fluorescência

δ Representação de mudanças químicas

ABREVIAÇÕES DE AMINOÁCIDOS

NOME	SÍMBOLO	ABREVIAÇÃO
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 TRIPANOSSOMIASE HUMANA AFRICANA 20

1.1.1 Epidemiologia e Distribuição 20

1.1.2 Manifestações Clínicas 22

1.1.3 Tratamentos e Desafios 23

1.1.4 Ciclo de Vida do *Trypanosoma brucei* 26

1.1.5 Exploração dos Mecanismos Moleculares 27

1.1.5.1 Metacaspase-2 de Trypanosoma brucei 28

1.2 PAPEL DA ENZIMOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS 30

1.2.1 Enzimas proteolíticas 30

1.2.2 Reação de catálise enzimática 35

1.2.3 Cinética Enzimática 36

1.2.4 Inibidores Enzimáticos 39

1.3 MEDICAMENTOS SINTÉTICOS COMO POTENCIAIS MODULADORES BIOLÓGICOS NA BUSCA PELO DESENVOLVIMENTO DE TERAPIAS MAIS EFICAZES 44

1.3.1 Compostos Derivados de Éteres Oxímicos 45

1.3.2 Chalconas 46

1.3.3 Flavonoides 48

2 JUSTIFICATIVA 52

3 OBJETIVOS 55

3.1 OBJETIVO GERAL 55

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 55

CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1: NOVEL OXIMIC COMPOUNDS ACTING AS *Trypanosoma brucei* METACASPASE-2 (*Tb*MCA-IIA) POTENTIAL INHIBITORS 56

INTRODUCTION 58

1. EXPERIMENTAL PROCEDURES 60

1.1 PRODUCTION OF RECOMBINANT *Tb*MCA-IIA 60

1.2 PURIFICATION OF RECOMBINANT *Tb*MCA-IIA 61

1.3 PEPTIDE SYNTHESIS 61

1.4 COMPOUNDS SYNTHESIS 62
***1.4.1 Synthesis of (E)*-3,4-dimethoxylbenzaldehyde oxime (2) 62**
1.5 GENERAL PROCEDURE FOR SYNTHESIS OF ACYL OXIMES 3-12 62
***1.5.1 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-(O-benzoyl)oxime (AO-3) 62**
***1.5.2 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-chloro)benzoyl]oxime (AO-4) 63**
***1.5.3 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-nitro)benzoyl]oxime (AO-5) 63**
***1.5.4 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-trifluoromethyl)benzoyl]oxime (AO-6) 63**
***1.5.5 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(3,5-dinitro)benzoyl]oxime (AO-7) 64**
***1.5.6 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methyl)benzoyl]oxime (AO-9) 64**
***1.5.7 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methoxy)benzoyl]oxime (AO-10) 64**
***1.5.8 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-fluoro)benzoyl]oxime (AO-11) 65**
***1.5.9 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-*tert*-butil)benzoyl]oxime (AO-12) 65**
1.6 GENERAL PROCEDURE FOR SYNTHESIS OF OXIME ETHERS 14-21 65
***1.6.1 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-chloro)benzyl]oxime (EO-14) 65**
***1.6.2 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methyl)benzyl]oxime (EO-15) 66**
***1.6.3 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-*tert*-butil)benzyl]oxime (EO-16) 66**
***1.6.4 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methoxy)benzyl]oxime (EO-17) 66**
***1.6.5 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-nitro)benzyl]oxime (EO-18) 67**
***1.6.6 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-bromo)benzyl]oxime (EO-19) 67**
***1.6.7 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-trifluoromethyl)benzyl]oxime (EO-20) 67**
***1.6.8 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-fluoro)benzyl]oxime (EO-21) 68**
1.7 SCREENING OF OXYMIC COMPOUNDS AS A *Tb*MCA-IIA MODULATOR .. 68
1.8 DETERMINATION OF IC_{50} VALUES FOR INHIBITOR 68
1.9 ENZYME KINETICS AND MECHANISM DETERMINATION 69
1.10 THE EFFECT OF ACIL OXIME 12 ON THE INTRINSIC FLUORESCENCE OF *TB*MCA-IIA WT AND *TB*MCA-IIA D189/190A 69
1.11 MOLECULAR DOCKING METHODOLOGY 70
2. RESULTS 71
2.1 SCREENING FOR THE INHIBITORY ACTIVITY OF OXIME COMPOUNDS .. 71
2.2 INHIBITORY CONCENTRATION (IC_{50}) 71
2.3 INHIBITION MECHANISM OF *Tb*MCA-IIA BY OXYMIC COMPOUNDS 71
2.4 INTERACTION AT ACIL OXIME 12 WITH CALCIUM BINDING SITE OF *Tb*MCA-IIA 72
2.5 MOLECULAR DOCKING STUDIES 73

3. DISCUSSION 73

4. CONCLUSIONS 75

REFERENCES 77

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2: COMPOSTOS DERIVADOS DE CHALCONAS E FLAVONOIDES COMO AGENTES MODULADORES DA METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa) 90

1 INTRODUÇÃO 93

2 RESULTADOS 94

2.1 TRIAGEM DE COMPOSTOS 94

2.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO (IC_{50}) 95

2.3 MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA TbMCA-IIa PELAS MOLÉCULAS DERIVADAS DA CLASSE DAS CHALCONAS E DOS FLAVONOIDES 96

3 DISCUSSÃO 97

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS 99

5 METODOLOGIA 99

5.1 TRIAGEM DE COMPOSTOS 99

5.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO 100

5.3 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS INIBITÓRIOS 100

REFERENCIAS 102

LEGENDAS DE TABELAS E FIGURAS 104

CAPÍTULO 3 – CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR DE SELEÇÃO DE INIBIDORES PARA A METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* 112

1 INTRODUÇÃO 114

2 METODOLOGIA 115

2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA TbMCA-IIa 115

2.2 AMPLIFICAÇÃO DO VETOR 116

2.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 116

2.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR 117

2.5 CLONAGEM DA TbMCA-IIA UTILIZANDO A TÉCNICA T5 EXONUCLEASE DNA ASSEMBLY (TEDA) 117

2.6 TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS *Escherichia coli* DH5α COMPETENTES 117

2.7 TRIAGEM DE CLONES POSITIVOS 118

2.8 CULTIVO, ARMAZENAMENTO E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL 119

2.9 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA SEQUENCIAMENTO 119

2.10 TESTE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) EM RESPOSTA À VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE $CaCl_2$.....120

2.11 TESTE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) MEDIANTE ADIÇÃO DE GLICOSE.....121

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES 122

3.1 OBTENÇÃO DO CLONE DA METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* RECOMBINANTE 122

3.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) EM RESPOSTA À VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE $CaCl_2$.....126

3.3 TESTE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) MEDIANTE ADIÇÃO DE GLICOSE.....130

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS..... 133

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS 135

REFERÊNCIAS..... 137

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRIPANOSSOMIASE HUMANA AFRICANA

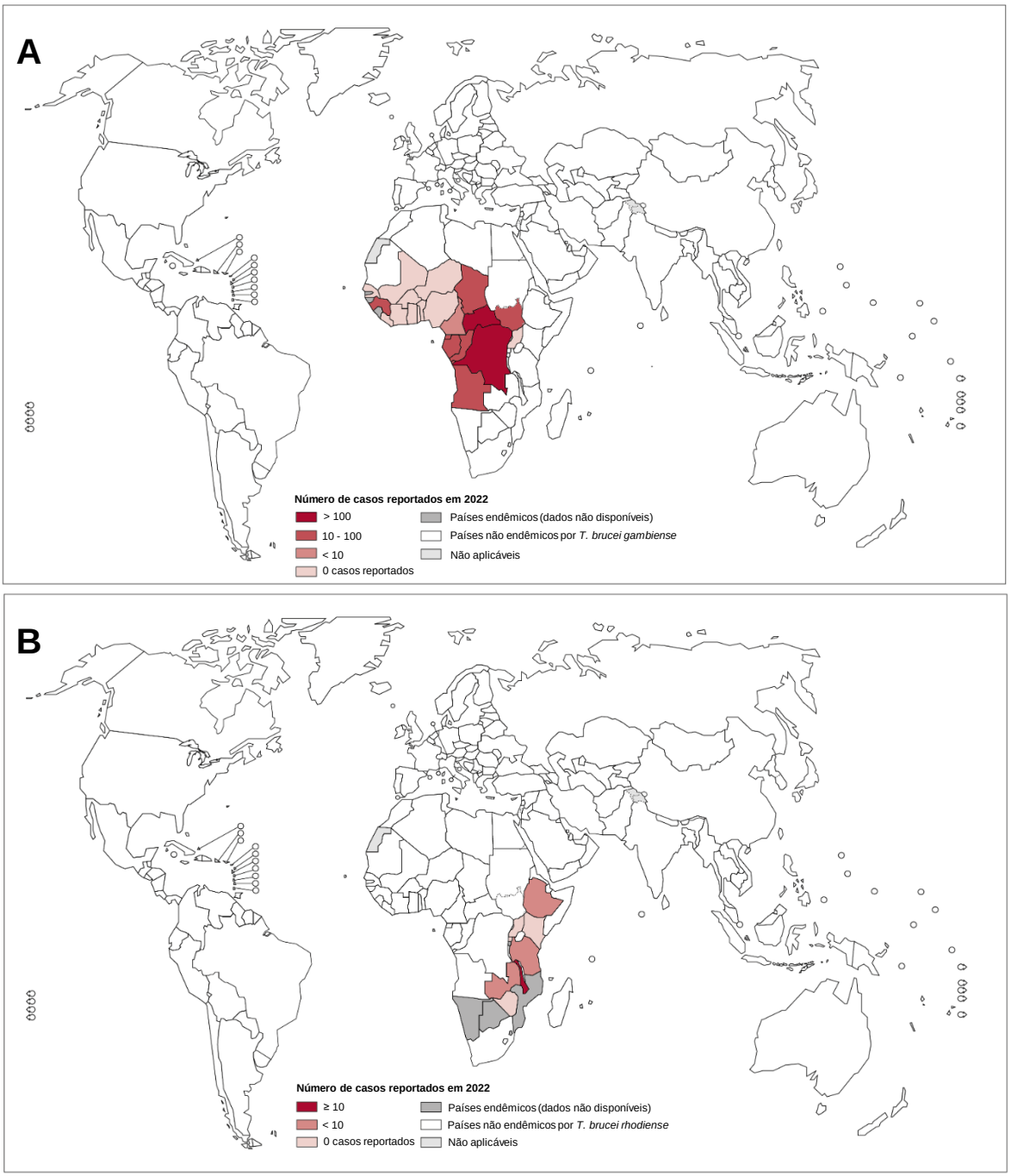
A Tripanossomíase Humana Africana (THA), conhecida como doença do sono, é uma enfermidade tropical negligenciada presente em 36 países africanos endêmicos. Causada pelo *Trypanosoma brucei*, um protozoário transmitido para hospedeiros mamíferos pela picada da mosca tsé-tsé (*Glossina spp*), essa doença apresenta duas formas principais dependendo da subespécie do *Trypanosoma* (GAO *et al.*, 2020). A forma crônica da THA é predominantemente causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense*, abrangendo a maioria dos casos (cerca de 98%) na África Central e Ocidental. Em contraste, a forma aguda é provocada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense* na África Oriental e Austral. Embora menos comum, essa variante é mais agressiva em seu desenvolvimento (FALL, 2022).

1.1.1 Epidemiologia e Distribuição

Historicamente o *Trypanosoma brucei* foi responsável por epidemias no final do século XIX, resultando na morte de quase um milhão de pessoas. Os países coloniais iniciaram medidas de controle precoce dos vetores e vigilância da doença, quase levando a erradicação da Tripanossomíase Africana na década de 60. No entanto, após a independência governamental e a interrupção da vigilância, houve uma recorrência da doença com um aumento significativo de incidência no final da década de 90. A Tripanossomíase Africana continua a ser observada principalmente em comunidades rurais e áreas empobrecidas, no entanto, essa distribuição é subnotificada e apesar dos esforços da Organização Mundial da Saúde (OMS) em reinstituir programas de controle, nem todos os países notificam a doença ou implementam efetivamente essas medidas, contribuindo sua persistência como um desafio de saúde pública em muitas regiões da África (MAXFIELD, 2023).

A **Figura 1** apresenta a distribuição global da Tripanossomíase Humana Africana (THA) reportada em 2022, ilustrando a prevalência da doença em diferentes regiões da África, destacando a predominância dos dois subtipos de parasitas.

Figura 1: Distribuição geográfica da Tripanossomíase Humana Africana reportada em 2022



A: número de casos reportados para *Trypanosoma brucei gambiense*; **B:** número de casos reportados para *Trypanosoma brucei rhodesiense.*

Fonte: World Health Organization (2023), Adaptado

Com relação aos tipos específicos da doença, o *Trypanosoma brucei gambiense* é endêmico em 24 países da África Ocidental e Central, sendo responsável por mais de 95% dos casos notificados em 2022. Por outro lado, o *Trypanosoma*

brucei rhodesiense é endêmico em 13 países da África Oriental e Austral, representando cerca de 5% dos casos notificados no mesmo ano. Entre 1999 e 2022, o número notificado de novos casos da forma crônica da Tripanossomíase Humana Africana (*T. b. gambiense*) caiu 97%, de 27.862 para 799. Durante o mesmo período, o número de novos casos notificados da forma aguda da Tripanossomíase Humana Africana (*T. b. rhodesiense*) caiu 94%, de 619 para 38 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Apesar da queda no número de casos notificados ao longo dos anos, é essencial o desenvolvimento contínuo de melhores medicamentos para combater a doença e garantir sua erradicação total.

1.1.2 Manifestações Clínicas

A Tripanossomíase Humana Africana (THA) é uma doença que pode se manifestar de diferentes formas, dependendo do estágio da infecção. No estágio inicial, chamado hemolinfático, o *Trypanosoma* se multiplica no sangue e nos sistemas linfáticos, resultando em sintomas gerais como febre, dores de cabeça e dores no corpo. Se não for tratada adequadamente, a infecção progride para o segundo estágio, conhecido como meningoencefálico. Nesse estágio tardio, os parasitos atravessam a barreira hematoencefálica, causando graves distúrbios neurológicos, incluindo problemas de sono, que deram à doença o nome característico de "doença do sono africana". Esses distúrbios neurológicos podem levar à morte se não forem tratados. Tanto as infecções por *Trypanosoma brucei gambiense* quanto por *Trypanosoma brucei rhodesiense* seguem esse padrão de desenvolvimento em dois estágios, com sintomas gerais no primeiro estágio e complicações neurológicas graves no segundo estágio (FALL, 2022).

Com relação às manifestações clínicas, o início precoce da doença muitas vezes se manifesta como um cancro cutâneo no local da inoculação. Posteriormente, os sintomas sistêmicos se desenvolvem, incluindo febre intermitente, cefaleia, prurido e linfadenopatia, comumente observada no triângulo posterior do pescoço, conhecido como "sinal de Winterbottom". Febres ondulantes são características, refletindo a multiplicação do *Trypanosoma* no sangue, e podem persistir por dias a semanas, separadas por intervalos afebris. A hepatosplenomegalia pode ocorrer na fase inicial. No estágio tardio da doença, surgem sintomas neurológicos graves, como distúrbios do sono, tremores, fraqueza, paralisia, alterações psiquiátricas e outros distúrbios neuropsiquiátricos. Sem tratamento, qualquer subgrupo de *T. brucei* pode resultar em

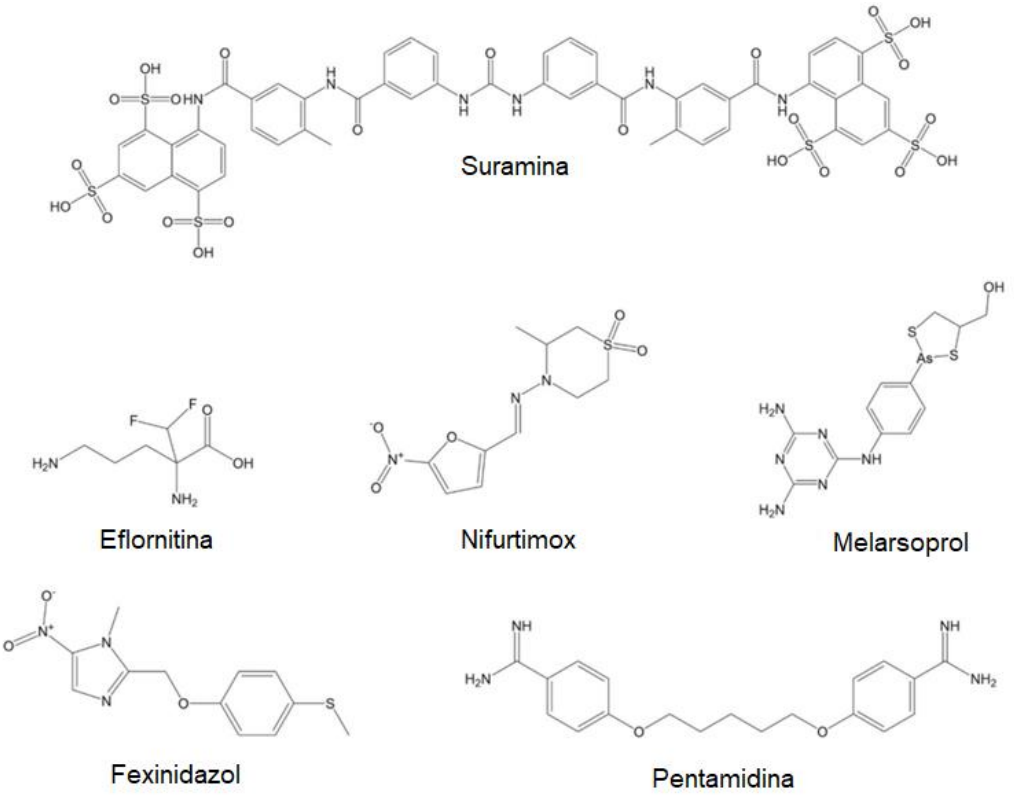
coma e morte, com uma progressão mais rápida em infecções por *T. brucei rhodesiense* do que em infecções por *T. brucei gambiense*. O diagnóstico da doença é baseado em uma combinação de história clínica, exposição a áreas endêmicas, visualização direta de organismos e testes sorológicos. O tratamento precoce é essencial para evitar complicações graves e fatais associadas à THA, que pode evoluir para uma fase meningoencefálica se não for tratada adequadamente (MAXFIELD, 2023).

1.1.3 Tratamentos e Desafios

Os tratamentos para a THA variam de acordo com o estágio da doença e a cepa do *Trypanosoma*. Na fase inicial, para infecções por *T. b. gambiense*, a pentamidina é a opção mais utilizada, enquanto para infecções por *T. b. rhodesiense*, a suramina é aplicada. Em estágios mais avançados da doença causada por *T. b. rhodesiense*, o melarsoprol, um composto à base de arsênico, é empregado, embora seja conhecido por sua toxicidade significativa. Além desses tratamentos tradicionais, outros medicamentos como a efornitina, a combinação de nifurtimox-efornitina (NECT) e o fexinidazol têm sido utilizados para tratar fases crônicas da doença. No entanto, essas opções também apresentam desafios, incluindo toxicidade aguda, especialmente na fase de envolvimento do sistema nervoso central, e o desenvolvimento de resistência por parte do *Trypanosoma*. Portanto, embora esses tratamentos sejam úteis, há uma necessidade de desenvolver terapias mais eficazes e seguras para enfrentar a THA (FALL, 2022).

A **Figura 2** a seguir detalha as estruturas dos principais medicamentos utilizados para o tratamento tanto para a *T. b. gambiense* quanto para a *T. b. rhodesiense.*

Figura 2: Estrutura química dos medicamentos utilizados no tratamento da Tripanossomíase Humana Africana



Fonte: Fall (2022)

A suramina é usada para tratar infecções por *T. b. rhodesiense*, administrada com uma série de cinco injeções intravenosas durante três semanas. No entanto, sua administração está associada a efeitos adversos como lesões cutâneas, choque anafilático, insuficiência renal e neurotoxicidade. Para a doença gambiense, a pentamidina é administrada por injeção intramuscular durante 7 a 10 dias, mas também pode causar efeitos colaterais como hipo ou hiperglicemia e pressão arterial baixa. Ambos os medicamentos não atravessam eficientemente a barreira hematoencefálica, não sendo eficazes no tratamento da fase do sistema nervoso central (SNC) (RODGERS, 2009).

Na fase tardia da doença, a eflornitina é usada para tratar infecções gambienses do SNC, mas seu uso é limitado devido à resistência natural da *T. b. rhodesiense*. A administração deste fármaco é complexa, realizada em infusões intravenosas de 100 mg/kg durante 14 dias, e pode causar efeitos colaterais como pancitopenia e distúrbios gastrointestinais. O melarsoprol é o único medicamento eficaz para infecções do SNC por ambas as formas de *T. brucei*, mas é altamente tóxico, com efeitos colaterais

graves, incluindo a encefalopatia reativa pós-tratamento, que pode ser fatal (RODGERS, 2009).

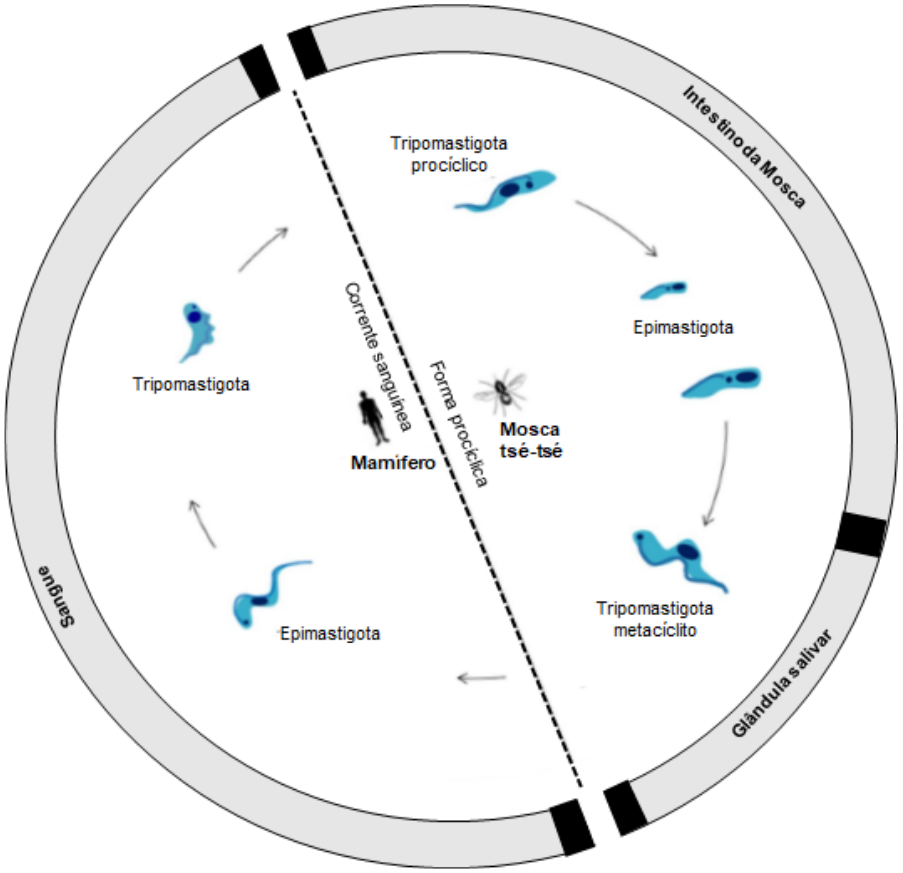
O nifurtimox, utilizado para tratar a doença de Chagas, tem sido usado experimentalmente em infecções gambienses refratárias ao melarsoprol, mas sua eficácia é variável e pode causar efeitos colaterais graves, incluindo reações neurológicas. A combinação de nifurtimox e eflornitina tem mostrado resultados promissores como uma alternativa de tratamento (RODGERS, 2009). Já o acoziborol emergiu recentemente como um candidato promissor para o tratamento da doença do sono provocada por *T. b. gambiense*. Caso obtenha aprovação, sua aplicação seria direcionada ao estágio crônico da doença, requerendo apenas uma administração em um único dia (FALL, 2022).

Em síntese, esses medicamentos, em sua maioria desenvolvidos entre 1910 e 1940, têm eficácia limitada e podem causar efeitos colaterais e toxicidade. Além disso, os parasitos podem desenvolver resistência, ligada a mudanças na captação celular e distribuição molecular dos medicamentos. Quando os tratamentos falham, a doença se torna mais desafiadora de controlar. Portanto, compreender o modo de ação dos medicamentos e os mecanismos de resistência é necessário para desenvolver estratégias eficazes de tratamento e prevenção da THA, visando reduzir sua carga e impacto (FALL, 2022). Nesse sentido, o entendimento do ciclo de vida do parasita torna-se essencial, pois permite identificar pontos vulneráveis no processo de replicação e desenvolvimento do parasita, que podem ser explorados como alvos terapêuticos.

1.1.4 Ciclo de Vida do *Trypanosoma brucei*

O *Trypanosoma brucei* é um parasito extracelular que passa por diversas transformações durante seu ciclo de vida, tanto no hospedeiro mamífero quanto no vetor, a mosca tsé-tsé (**Figura 3)**.

Figura 3: Ciclo celular do *Trypanosoma brucei*



Após a picada da mosca tsé-tsé, o *Trypanosoma brucei* é transmitido para o hospedeiro mamífero na forma de tripomastigota metacíclico. No intestino médio da mosca, o parasito se converte em formas pró-cíclicas e posteriormente epimastigotas proliferativas e migram para a glândula salivar da mosca, se diferenciando em metacíclicas não proliferativas, prontas para a transmissão a um novo hospedeiro mamífero.
Fonte: Fall (2021), Adaptado

No sangue do hospedeiro, o *T. brucei* assume diferentes formas, todas cobertas por uma camada de glicoproteínas de superfície variante (GSV), que permite a evasão do sistema imunológico. À medida que a parasitemia aumenta, o *Trypanosoma* se adapta, preparando-se para sobreviver no inseto vetor. Dentro da mosca tsé-tsé, o parasita passa por diversos estágios morfológicos, culminando na forma metacíclica infecciosa nas glândulas salivares (FALL, 2022; MAXFIELD, 2023).

Na forma de tripomastigotas no vetor, a glicose é a principal fonte de energia, convertida em piruvato, acetato, succinato e alanina. Enzimas da glicólise são encontradas em organelas chamadas glicossomos. Na forma pró-cíclica, em condições de baixa glicose, a prolina torna-se a principal fonte de energia, enquanto a glicose é preferida em ambientes ricos nesse açúcar. O acetato é excretado como produto final, ou usado na biossíntese de ácidos graxos. Em certas condições, outros substratos como intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou aminoácidos, como a treonina, também podem ser utilizados como fontes de energia (FALL, 2022).

Em suma, o ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* envolve uma série de transformações complexas que ocorrem tanto no hospedeiro mamífero quanto no vetor, a mosca tsé-tsé. Essas transformações são essenciais para a sobrevivência e propagação do *Trypanosoma*. Além disso, a adaptação metabólica do parasito a diferentes condições ambientais, como a transição entre a forma de tripomastigotas no vetor, destaca sua capacidade de explorar uma variedade de fontes de energia para sustentar seu ciclo de vida.

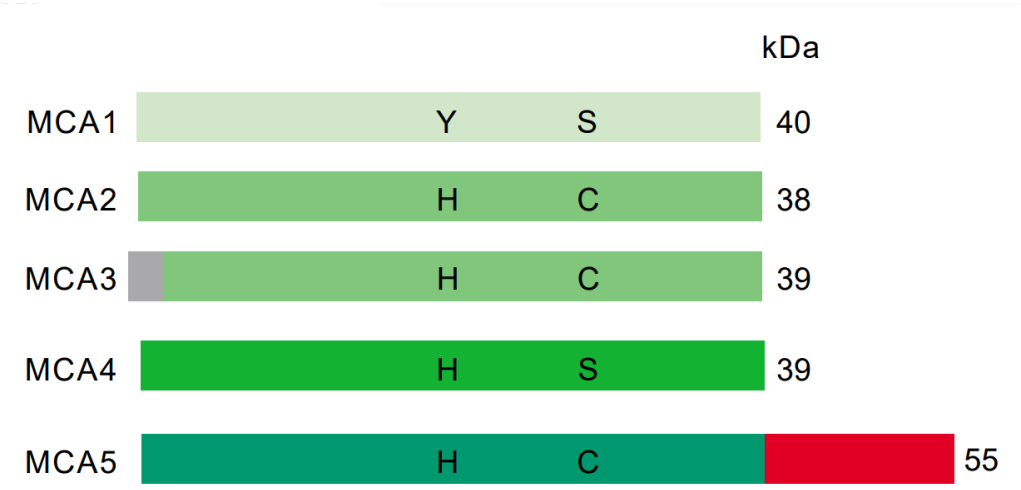
1.1.5 Exploração dos Mecanismos Moleculares

Dentre as estratégias para o desenvolvimento de identificação de alvos terapêuticos está a exploração dos mecanismos moleculares que influenciam a sobrevivência e a patogenicidade do *Trypanosoma*. Nesse contexto, as metacaspases emergem como elementos-chave, oferecendo uma possível abordagem para intervenções terapêuticas mais direcionadas e eficazes. Elas são um grupo de enzimas que desempenham um papel importante em eventos de autoprocessamento e ativação celular, e são encontradas em uma variedade de organismos unicelulares, incluindo o *Trypanosoma brucei*. No *T. brucei*, as metacaspases têm sido associadas à regulação da diferenciação celular, resposta ao estresse oxidativo e escape do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, estudos têm investigado o potencial das metacaspases como alvos terapêuticos para o tratamento da Tripanossomíase Africana, visando interromper processos vitais do parasito e melhorar a eficácia dos tratamentos disponíveis (BERG, 2010; SALVESEN; HEMPEL; COLL, 2016; KLEMENČIČ; FUNK, 2017).

1.1.5.1 Metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*

No genoma do *Trypanosoma brucei* são codificados 5 tipos de metacaspases (TbMCAI-V), conforme **Figura 4**, que se diferenciam quanto à atividade catalítica, sendo a TbMCA-IIa uma das variantes enzimaticamente ativa que desempenha um papel importante na regulação de eventos de autoprocessamento e ativação celular (MOTTRAM *et al.*, 2003).

Figura 4: Estruturas dos domínios presentes nas metacaspases de *Trypanosoma brucei*



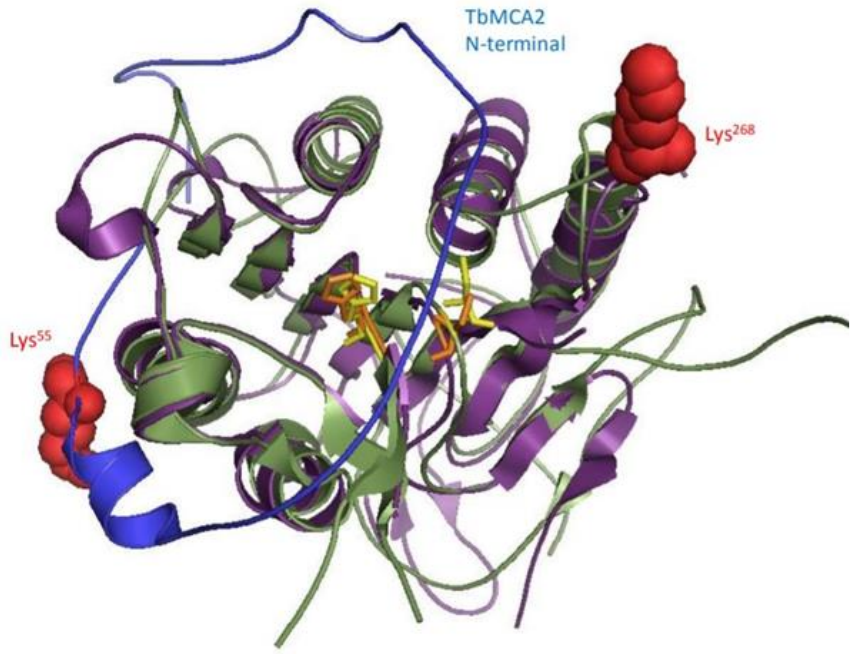
Nas metacaspases de *Trypanosoma brucei*, os aminoácidos tirosina (Y), serina (S), histidina (H) e cisteína (C) estão posicionados no sítio ativo. Os diversos domínios da metacaspase são destacados em verde, enquanto a sequência alvo das organelas é representada em cinza. O domínio C-terminal é destacado em vermelho.
Fonte: Mottram *et al.* (2003), Adaptado

A metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* é encontrada nos endossomos positivos RAB11 do *Trypanosoma* (HELLMS, 2006). Sua estrutura apresenta uma folha β composta por oito filamentos, sendo seis paralelos e dois antiparalelos, e uma região N-terminal que envolve o sítio ativo da enzima, bloqueando o subsítio S_1 (**Figura 5**). Apesar dessa característica, a TbMCA-IIa demonstra capacidade de hidrolisar pequenos substratos peptídicos sintéticos (GILIO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2013; MCLUSKEY *et al*., 2012).

Para sua atividade proteolítica, a TbMCA-IIa passa por um autoprocessamento em dois sítios específicos (Lys^{55} e Lys^{268}), permitindo a ligação do substrato ao sítio ativo.

Esse autoprocessamento é dependente da presença de íons cálcio, que se ligam à enzima em dois sítios de afinidade diferentes, que influenciam tanto a atividade proteolítica quanto a especificidade ao substrato (GILIO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2013; MCLUSKEY *et al*., 2012).

Figura 5: Estrutura tridimensional da TbMCA-IIa



A TbMCA-IIa tem sua estrutura tridimensional destacada em verde, com ênfase nos dois sítios de autoprocessamento, marcados em vermelho (Lys^{55} e Lys^{268}). A região N-terminal é apresentada em azul, bloqueando o sítio ativo da enzima. A estrutura tridimensional da YCA1 é representada em roxo.
Fonte: Gilio (2017)

Além disso, estudos indicam que o pH desempenha um papel importante na atividade proteolítica da TbMCA-IIa. Enquanto a forma processada da enzima apresenta um $pH_{ótimo}$ em torno de 7,4, a forma mutante não processada tem um $pH_{ótimo}$ de 8,5. Em relação à especificidade ao substrato, a TbMCA-IIa mostra preferência por resíduos básicos de aminoácidos na posição P_1 e resiste à hidrólise de substratos com resíduos carregados negativamente nas posições P_2 e P_3, podendo funcionar como inibidores competitivos (MACHADO *et al.*, 2013).

A análise da estrutura cristalográfica revelou que a TbMCA-IIa possui um subsítio S_1 carregado negativamente, revestido por resíduos específicos (Cys^{92}, Ser^{156}, Asp^{95} e Asp^{211}), essenciais para sua atividade, sendo que a ligação do substrato ao sítio ativo envolve interações de hidrogênio com resíduos de aspartato, especialmente

importantes para a ligação do resíduo de arginina na posição P_1 (MACHADO *et al*., 2013).

Essas características funcionais e estruturais da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* destacam seu papel na regulação da homeostase celular e sugerem sua importância como um potencial alvo terapêutico.

1.2 PAPEL DA ENZIMOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS

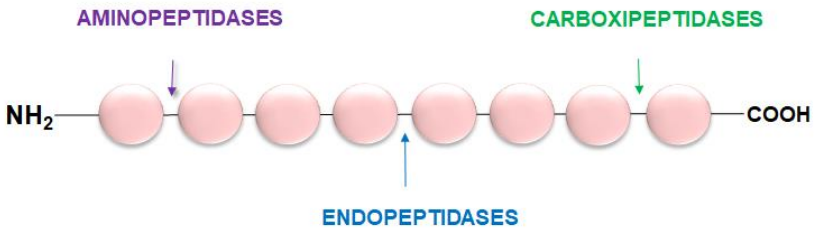
A enzimologia desempenha um papel importante na identificação e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para uma variedade de doenças, incluindo a Tripanossomíase Humana Africana (THA). No contexto da THA, entender a especificidade de substrato e as reações enzimáticas é fundamental para o desenvolvimento de medicamentos eficazes. Por exemplo, ao estudar as enzimas envolvidas no ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*, como as metacaspases, é possível identificar potenciais alvos terapêuticos. Essas enzimas estão envolvidas em processos vitais para a sobrevivência do *Trypanosoma*, tornando-as alvos promissores para o desenvolvimento de terapias direcionadas (BERG, 2010). Além disso, compreender as reações enzimáticas específicas e os substratos preferenciais dessas enzimas permite o desenho de compostos que possam inibir seletivamente sua atividade, interferindo no ciclo de vida do *Trypanosoma* e oferecendo novas abordagens terapêuticas. Assim, ao integrar os conhecimentos da enzimologia com a pesquisa de medicamentos, podemos identificar e otimizar candidatos a medicamentos mais eficazes e com menor toxicidade para o tratamento da THA.

1.2.1 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases ou proteinases, desempenham um papel importante nos processos biológicos, sendo responsáveis por quebrar as ligações peptídicas presentes nas proteínas. Essa função é essencial para o metabolismo celular normal e para a regulação de diversos processos, incluindo o funcionamento mitocondrial e a manutenção da homeostase celular. Além disso, elas são fundamentais em diversos processos bioquímicos, onde controlam aspectos como tamanho, estrutura e composição das principais proteínas (TRONCOSO, 2022).

As proteases podem ser classificadas com base na reação catalisada em hidrolases de ligações peptídicas, subdivididas em exopeptidases e endopeptidases. As endopeptidases realizam a hidrólise específica das ligações peptídicas dentro da cadeia polipeptídica e são classificadas conforme o tipo de resíduo de aminoácido em seus sítios catalíticos, incluindo cisteíno, serina, metalo, aspartil, treonino e glutamino proteases. Por outro lado, as exopeptidases atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, removendo resíduos de aminoácidos, seja nas extremidades N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases), conforme demonstrado na **Figura 6** (WALSH, 2002; BARRET, 1994; BARRETT; RAWLINGS, 2012).

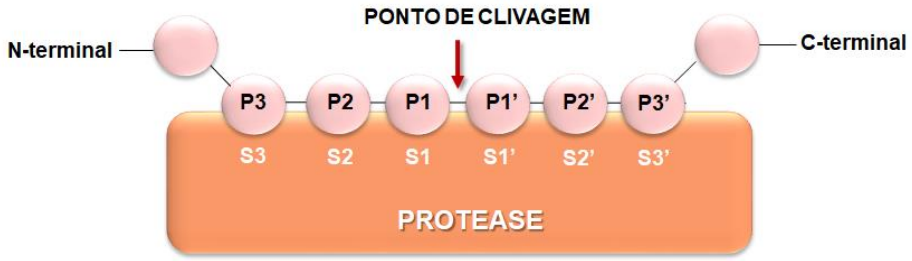
Figura 6*:* Pontos de clivagem do substrato através da ação das endopeptidases e exopeptidases



Fonte: Drauz, Gröger E May (2012), Adaptado

Outro critério de classificação é a natureza do sítio ativo, com a especificidade das exopeptidases garantida pelos subsítios de especificidade, identificados como S (subsítio) e P (peptídeo) no substrato. Após a clivagem, em direção ao N-terminal, são identificados os subsítios S_1, S_2, S_3, até $S_{(N)}$, com seus resíduos correspondentes rotulados como P_1, P_2, P_3, até $P_{(N)}$. Já na direção do C-terminal, os subsítios são designados como S_1', S_2', S_3', até $S_{(N)}$', com seus resíduos associados nomeados como P_1', P_2', P_3', até $P_{(N)}$'. Essa convenção foi estabelecida por Schechter e Berger em 1967 que descreveram a interação entre a protease e seu substrato com base nesses subsítios, conforme **Figura 7** (SCHECHTER; BERGER 1967; BRIX; STÖCKER, 2014).

Figura 7: Representação de Schechter e Berger para ligação de um substrato peptídico a uma protease



Fonte: Clementi e Fumagali (2015), Adaptado

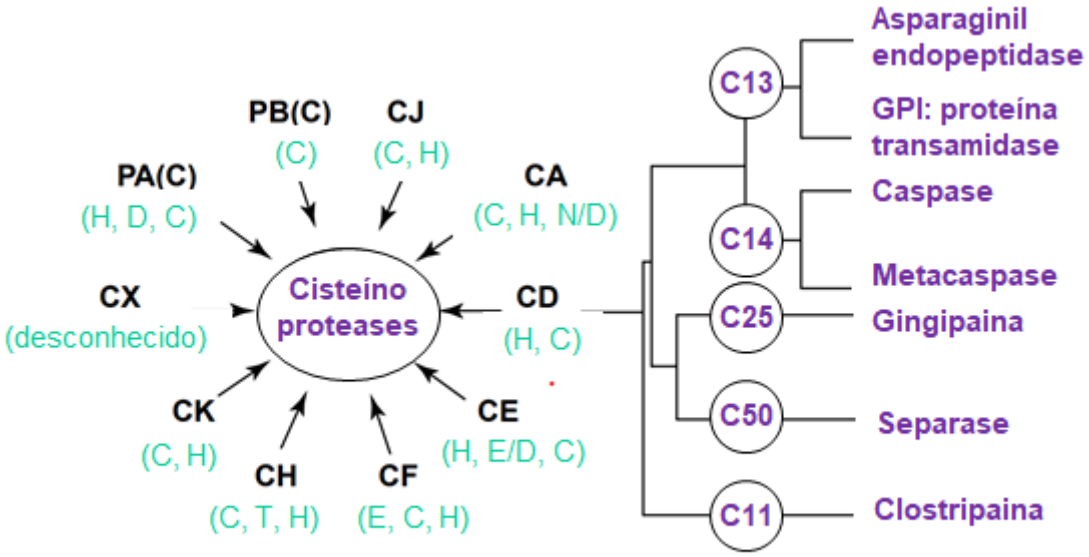
Além disso, as enzimas proteolíticas podem ser agrupadas com base em relações evolutivas em famílias e clãs, com o banco de dados MEROPS sendo uma referência nessa classificação, abrangendo diferentes mecanismos catalíticos representados por letras específicas como S, C, T, A, G, M e U (TRONCOSO, 2022). Quando o substrato se liga ao sítio ativo da protease, ocorrem mudanças conformacionais na enzima que facilitam a quebra das ligações peptídicas. Dependendo do tipo de protease, diferentes mecanismos podem estar envolvidos. Por exemplo, nas cisteíno, serino e treonino proteases, um resíduo de aminoácido com um grupo nucleofílico atua como nucleófilo, atacando o carbono carbonílico do substrato e formando um intermediário covalente. Já nas aspartil e metalo proteases, moléculas de água podem agir como nucleófilos, ativadas pelo ambiente catalítico da protease. Em ambos os casos, esses ataques nucleofílicos resultam na quebra das ligações peptídicas, dividindo a proteína em peptídeos menores. Após a reação, os produtos são liberados do sítio ativo da protease, permitindo que ela esteja pronta para catalisar outra reação. Essas enzimas são altamente específicas para seus substratos, garantindo a regulação precisa dos processos biológicos (TRONCOSO, 2022).

1.2.1.1 Cisteíno proteases: Caspases e Metacaspases

Dentre as famílias existentes, emergem as denominadas cisteíno proteases, que são enzimas encontradas em diversos organismos e desempenham funções vitais em processos biológicos, tais como crescimento, diferenciação e morte celular. Caracterizam-se pela presença de resíduos de cisteína e histidina em seus sítios ativos, formando uma díade catalítica. Essas enzimas são agrupadas em clãs

estruturais (**Figura 8**), como o clã CA (papaína) e o clã CD (caspases) (MOTTRAM, 2003)

Figura 8: Clãs de peptidases que utilizam um resíduo essencial de cisteína na catálise



Fonte: Mottram *et al.* (2003), Adaptado

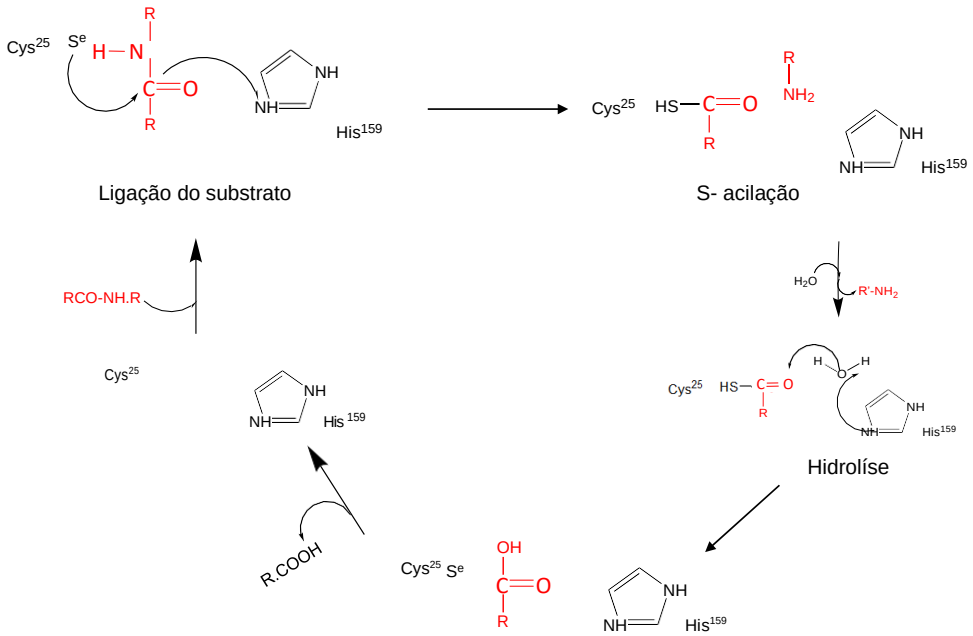
As caspases, pertencentes ao clã CD, são endopeptidases que desempenham um papel essencial na regulação da morte celular programada. Elas hidrolisam seus substratos após resíduos de ácido aspártico na posição P_1, sendo expressas como enzimas precursoras inativas e caracterizados por uma folha β central altamente conservada. Para sua ativação, é necessário o processamento entre os domínios p10 e p20, estes que auxiliam na clivagem de alvos específicos (p10) e na manutenção da forma da proteína e interação com outras moléculas (p20) (SALVESEN; HEMPEL; COLL, 2016; KLEMENČIČ; FUNK, 2017).

Por outro lado, as metacaspases (MCAs), também pertencem a família C14, e são homólogas às caspases, sendo encontradas em plantas, fungos e protozoários. Elas compartilham a característica de hidrolisar ligações peptídicas após resíduos básicos na posição P_1 do substrato, estando relacionadas com a morte celular programada (KLEMENCIC, 2018).

Ao contrário das caspases, as metacaspases não necessitam de dimerização para ativação. Sua estrutura, composta por uma folha β de 6 filamentos paralelos e 2 antiparalelos, permite a ativação por cofatores, como íons de cálcio. A ativação ocorre por meio de clivagem específica na região de ligação entre os domínios p20 e p10, embora existam exceções, como a metacaspase-9 de *Arabidopsis thaliana* do tipo II, que é independente de cálcio para atividade. Outra exceção a esse padrão foi observada na metacaspase-2 do *Trypanosoma brucei*. Essa metacaspase, ao ser submetida a clivagens *in vitro* inespecíficas quando isolada em altas concentrações de proteínas, não demonstra autoprocessamento entre os domínios p20 e p10 (ŞENTÜRK, 2017; VERCAMMEN *et al.,* 2004).

Com relação ao mecanismo de ação das cisteíno proteases (**Figura 9**), exemplificado pela papaína, a enzima inicialmente se liga de forma reversível ao substrato, formando o complexo enzima-substrato (ES). O tiolato, formado a partir de um par estável de íons tiolato-imidazólio entre os resíduos de cisteína e histidina no sítio ativo, realiza um ataque nucleofílico ao grupo carbonil da ligação amina hidrolisada (éster). Esse processo libera o fragmento C-terminal do produto clivado e forma um intermediário tetraédrico acil (S-acil). Em seguida, ocorre a protonação do nitrogênio da ligação amida pelo cátion imidazólico, promovendo sua hidrólise. A parte amina do substrato se liga à His^{159} e a carboxila ao resíduo de Cys^{25} através de uma ligação tioéster, formando uma acil-enzima. O ataque nucleofílico de uma molécula de água, assistido por His^{159}, que atua como catalisador básico, resulta na deacilação da enzima, liberando a porção C-terminal do peptídeo clivado e regenerando a enzima (STORRER E MENARD, 1994; FRICKER, 2010). O resíduo Asn^{175} é conservado em todas as sequências de aminoácidos das cisteíno proteases e está localizado próximo à His^{159} (STORRER E MENARD, 1994; FRICKER, 2010).

Figura 9: Representação do mecanismo enzimático referente ao processo de hidrólise de proteínas pelas cisteíno proteases

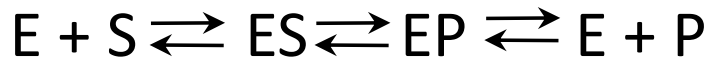


Fonte: Storrer e Menard (1994)

1.2.2 Reação de catálise enzimática

As enzimas são catalisadores bioquímicos fundamentais para os processos vitais dos organismos vivos. A partir de uma reação enzimática (**Figura 10**), ocorre a conversão de substratos em produtos específicos, catalisada pela enzima. Durante esse processo, os substratos são reconhecidos e ligados à enzima, formando um complexo enzima-substrato. Em seguida, a enzima facilita a catálise da reação, promovendo alterações na estrutura dos substratos e facilitando sua conversão em produtos. Após a conclusão da reação, os produtos são liberados da enzima, que retorna ao seu estado original, ficando disponível para catalisar outras reações semelhantes (NELSON; COX, 2014).

Figura 10: Diagrama representativo de uma reação enzimática



Uma reação enzimática básica ocorre com a presença de E, S e P, que simbolizam a enzima, o substrato e o produto, respectivamente. Durante o processo, são formados complexos transitórios da enzima com o substrato (ES) e com o produto (EP).
Fonte: Nelson *et al.* (2014)

O campo da enzimologia se concentra em estudar detalhadamente essas moléculas, incluindo seus mecanismos de ação, cinética e termodinâmica, bem como sua interação com substratos e fatores físico-químicos como pH, temperatura e concentração de substrato. Durante a descoberta de medicamentos, a enzimologia desempenha um papel fundamental ao caracterizar a enzima alvo e suas variantes, permitindo uma melhor compreensão de sua estrutura e função e identificando possíveis alvos terapêuticos para o desenvolvimento de estratégias de inibição seletiva (WOLFENDEN, 2001; SRINIVASAN, 2020).

1.2.3 Cinética Enzimática

Adicionalmente, a enzimologia mecanística oferece percepções valiosas sobre os mecanismos de ação dos inibidores de enzimas, o que é essencial para o desenho de compostos terapêuticos. Ao compreender o curso das reações catalisadas por enzimas, é possível direcionar a busca por compostos capazes de interferir especificamente no funcionamento da enzima alvo, seja bloqueando seu sítio ativo ou alterando sua conformação. Esse conhecimento é especialmente relevante nas fases iniciais da descoberta de medicamentos, onde a identificação de compostos com potencial terapêutico é essencial para o avanço da pesquisa farmacêutica (RUFER, 2021).

A descoberta de medicamentos é um processo multifacetado relacionado com a identificação de alvos terapêuticos, validação e otimização química em função do resultado bioquímico e/ou fisiológico desejado. Uma das primeiras etapas é a Triagem de Alto Desempenho (HTS, do inglês High-Throughput Screening), que envolve a avaliação de uma grande quantidade de compostos químicos para identificar aqueles com potencial para se tornarem medicamentos. Esse processo utiliza técnicas automatizadas para testar rapidamente milhares ou até milhões de compostos,

permitindo a identificação de candidatos promissores para o desenvolvimento farmacêutico. Nessa fase, é importante ter um bom projeto experimental para garantir que os resultados sejam confiáveis. Após o HTS, é comum usar curvas concentração-resposta (CRC) para avaliar a eficácia dos compostos identificados. Um parâmetro comum usado nessas curvas é o IC_{50}, que indica a concentração necessária de um composto para reduzir a atividade de uma proteína alvo em 50%. Essa redução de atividade pode depender de vários fatores, como a concentração do substrato usado no ensaio e a afinidade do substrato pela enzima. Posteriormente então é procedida a investigação do mecanismo de ação que avalia o método que o inibidor interage com a enzima alvo a partir de estudos relacionados à cinética enzimática (SRINIVASAN, 2020).

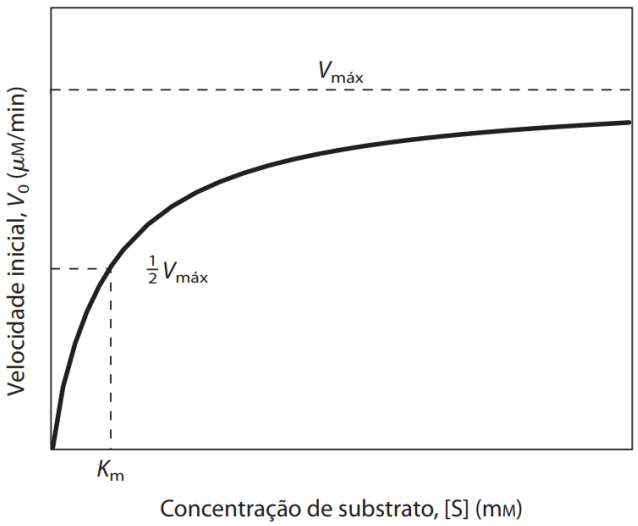
A cinética de Michaelis-Menten fornece uma base fundamental para entender o mecanismo de ação de inibidores em enzimas-alvo. Esta teoria descreve a relação entre a velocidade de uma reação enzimática (V_0) e a concentração de substrato [S], fornecendo informações sobre a afinidade da enzima pelo substrato (K_M) e a velocidade máxima da reação ($V_{máx}$), aplicando a **Equação 1** (NELSON; COX, 2014).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[\text{S}]}{K_{\text{m}} + [\text{S}]}$$

Equação 1

De acordo com a cinética de Michaelis-Menten, a taxa de reação inicial (V_0) aumenta de forma hiperbólica com o aumento da concentração do substrato ([S]), atingindo uma velocidade máxima ($V_{máx}$) quando todas as enzimas estão saturadas com o substrato. A constante de Michaelis-Menten (K_m) representa a concentração de substrato na qual a taxa de reação atinge a metade de $V_{máx}$, refletindo a afinidade da enzima pelo substrato (SCHNELL, 2013) conforme apresentado pela **Figura 11**.

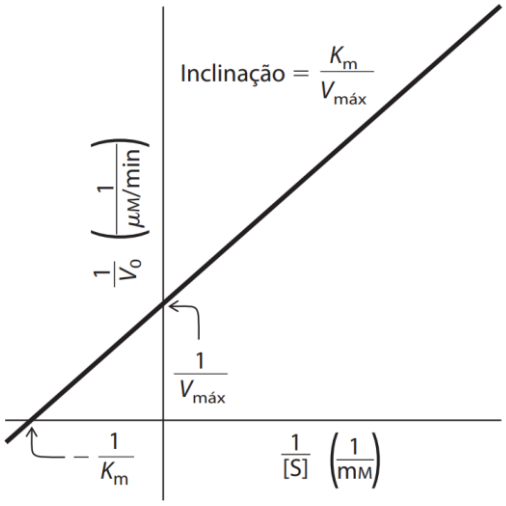
Figura 11: Curva de Michaelis-Menten demonstrando o efeito da concentração do substrato na velocidade inicial de uma reação enzimática



Fonte: Nelson *et al.* (2014)

A equação linearizada de Michaelis-Menten, conhecida como equação de Lineweaver-Burk, é uma ferramenta útil na análise da cinética enzimática a partir de dados experimentais. Por meio do gráfico duplo-recíproco, que representa $1/V_0$ *versus* 1/[S] (**Figura 12**), onde V_0 é a velocidade inicial da reação e [S] é a concentração do substrato, é facilitada a determinação dos parâmetros cinéticos (NELSON; COX, 2014).

Figura 12: Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk



Fonte: Nelson *et al.* (2014)

Neste gráfico, quando as enzimas seguem a relação de Michaelis-Menten, uma linha reta é gerada, com inclinação de $K_m/V_{máx}$ no eixo $1/V_0$ e intersecção de $-1/K_m$ no eixo 1/[S]. Essa configuração auxilia visualmente na determinação de $V_{máx}$ e K_m, tornando a análise dos dados mais precisa e direta, além de possibilitar a distinção entre diferentes mecanismos de reação enzimática e uma avaliação mais aprofundada acerca da resposta a fatores como a presença de inibidores (NELSON; COX, 2014).

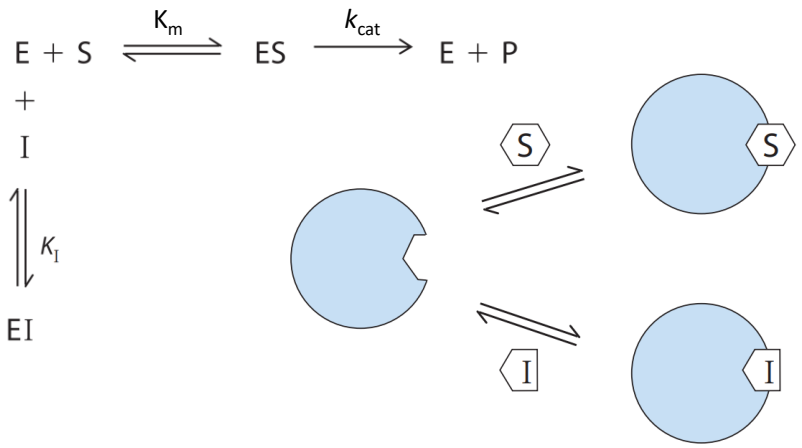
1.2.4 Inibidores Enzimáticos

Diversos tipos de inibidores têm a capacidade de modular a atividade enzimática, influenciando as características da cinética de Michaelis-Menten. Na inibição reversível, a molécula se liga à enzima de maneira reversível, formando o complexo enzima-inibidor [E.I], o que afeta a taxa de formação do complexo enzima-substrato [E.S] e, consequentemente, a velocidade da reação. Essa interação pode ser temporária, permitindo que a atividade enzimática seja recuperada quando o inibidor é removido. Em contraste, na inibição irreversível, ocorre a formação de uma ligação covalente estável entre a enzima e o inibidor, resultando na inativação permanente da enzima (SMITH; SIMONS, 2004; LEMKE; WILLIAMS, 2008). Essas modificações na atividade enzimática podem ser observadas nos parâmetros cinéticos, como a $V_{máx}$ e o K_m, conforme demonstrado na equação de Michaelis-Menten. As principais formas de inibição, que incluem a competitiva, não competitiva

e incompetitiva, são exemplos de interações que afetam a cinética de Michaelis-Menten.

A inibição competitiva ocorre quando um inibidor se liga exclusivamente à enzima livre, competindo diretamente com o substrato pelo mesmo sítio ativo, resultando em um aumento do K_m aparente, enquanto a $V_{máx}$ permanece constante, uma vez que a velocidade da reação não é afetada após a ligação do substrato ao sítio ativo (MARANGONI, 2003; COPELAND, 2005). Na reação enzimática para esse tipo de inibição (**Figura 13**), o k_{cat} representa a constante de catálise, indicando o múmero máximo de reações que uma única molécula de enzima pode catalisar por unidade de tempo quando está saturada com substrato, e o K_i refere-se à constante de dissociação do complexo binário enzima-inibidor (EI), estando relacionado com a afinidade do inibidor por uma enzima (COPELAND, 2005).

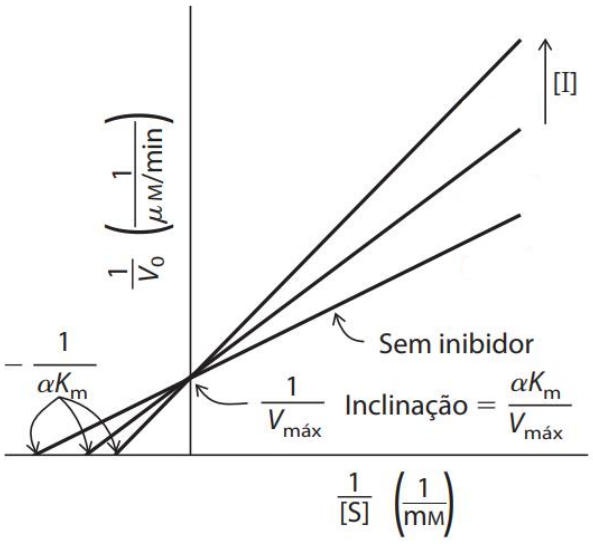
Figura 13: Esquema ilustrativo de inibição competitiva em uma reação enzimática



Fonte: Nelson *et al.* (2014), Adaptado

Graficamente, a inibição competitiva pode ser reconhecida através do inverso do gráfico de Michaelis-Menten (**Figura 14**), empregando o método de Lineweaver-Burk (WONG; WHITESIDES, 2013; COPELAND, 2005).

Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk representando o comportamento da enzima mediante a variação de concentração de um inibidor competitivo

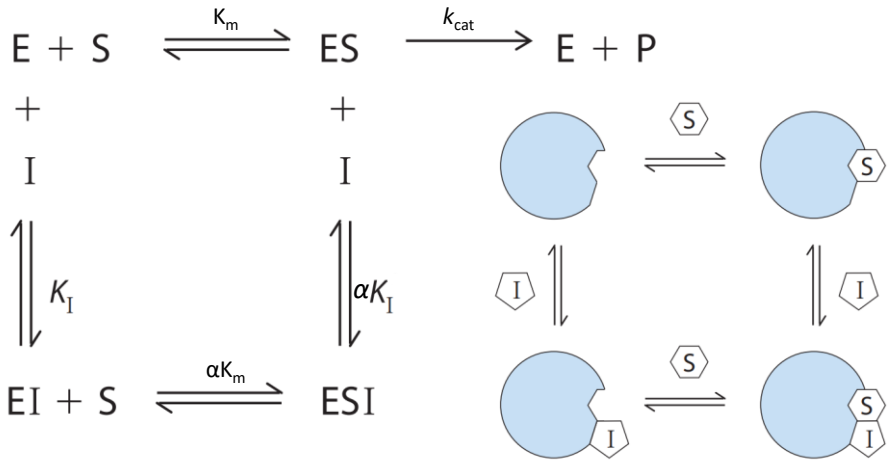


Fonte: Nelson *et al.* (2014), Adaptado

Nesse contexto, a característica distintiva é a intersecção das linhas em um ponto específico do eixo Y, o que caracteriza esse tipo de inibição. Enquanto o valor do intercepto para um inibidor competitivo permanece constante no eixo Y ($1/V_{máx}$), os valores de intercepto ($-1/K_m$) e inclinação ($K_m/V_{máx}$) variam conforme a concentração do inibidor aumenta (COPELAND, 2005).

Referente ao mecanismo de inibição do tipo não competitivo (**Figura 15**), o inibidor possui afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo enzima-substrato (ES), sendo esse tipo de inibição caracterizado por duas constantes de dissociação: uma para o complexo enzima-inibidor (K_i) e outra para o complexo ESI (αK_i). Diferentemente dos inibidores competitivos, os não competitivos afetam tanto a velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) quanto a afinidade aparente do substrato pela enzima (K_m), pois se ligam ao sítio alostérico, induzindo uma alteração conformacional que diminui sua atividade catalítica. Isso resulta em uma redução tanto na $V_{máx}$ quanto no K_m, interferindo na formação do complexo enzima-substrato e na velocidade da reação (COPELAND, 2005; MARANGONI, 2003).

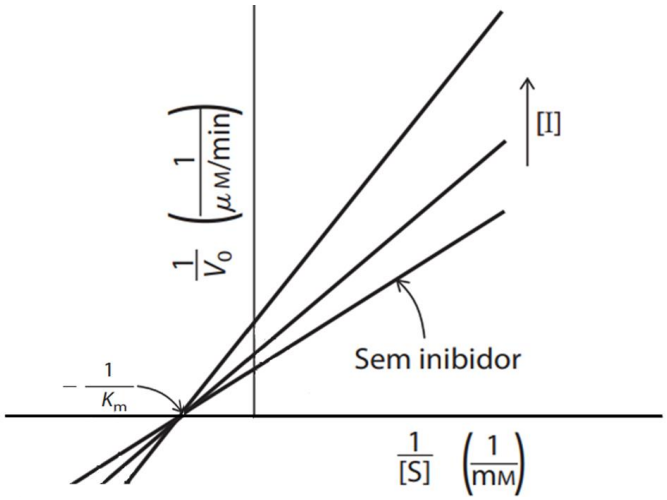
Figura 15: Esquema ilustrativo de inibição não competitiva em uma reação enzimática



Fonte: Nelson *et al.* (2014), Adaptado

No gráfico de duplo-recíproco (**Figura 16**), as linhas se cruzam em um ponto onde o valor de X é negativo e o valor de Y é igual a zero, com a posição desse ponto de cruzamento variando de acordo com o valor de α. Nos casos em que α=1, a afinidade é equivalente para a enzima livre e para o complexo ES; quando α >1, a preferência de ligação é pela enzima livre; e no momento em que o valor de α for menor que 1 (α <1), a afinidade de ligação é maior pelo complexo ES (COPELAND, 2005).

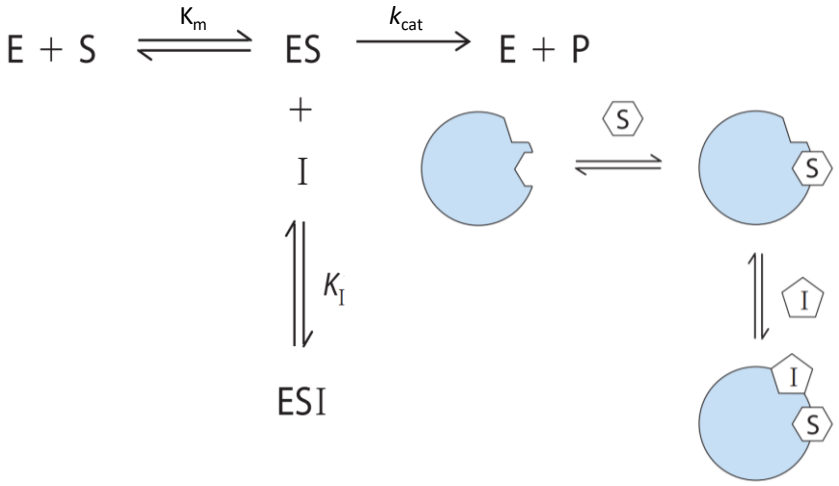
Figura 16: Gráfico de Lineweaver-Burk representando o comportamento da enzima mediante a variação de concentração de um inibido não competitivo



Fonte: Nelson *et al.* (2014), Adaptado

Já na inibição incompetitiva, esquematizado pela **Figura 17**, o inibidor se liga ao complexo enzima-substrato em um local diferente do centro ativo, não compartilhando similaridade estrutural com o substrato. Essa interação ocorre devido à baixa ou nenhuma afinidade do inibidor pela enzima livre, resultando em uma distorção estrutural nos sítios ativos e alostéricos da enzima, o que inativa o processo de catálise. O complexo ternário ESI é formado nesse contexto, representando um ciclo termodinâmico entre os estados ES, EI e ESI. Com a formação desse complexo ternário, há uma diminuição nos valores aparentes de $V_{máx}$ e K_m à medida que a concentração do inibidor aumenta, caracterizando esse tipo específico de inibição (MARANGONI, 2003; COPELAND, 2005; SHARMA, 2012).

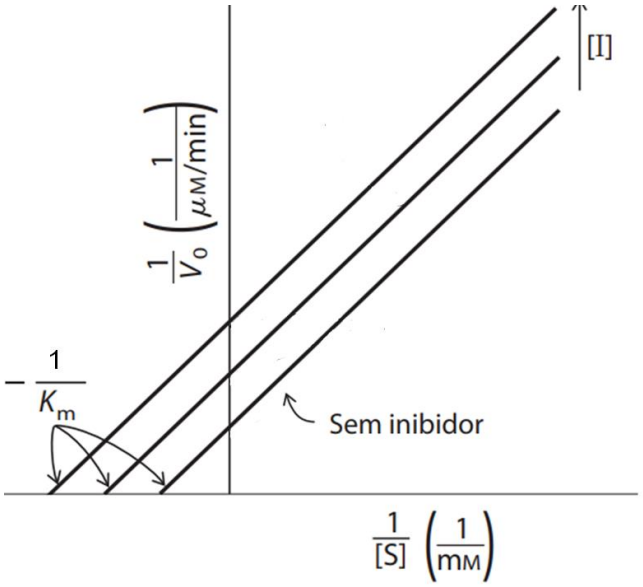
Figura 17: Esquema ilustrativo de inibição incompetitiva em uma reação enzimática



Fonte: Nelson *et al.* (2014), Adaptado

No gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 18**), são observadas linhas paralelas que indicam a influência do inibidor tanto no valor de K_m quanto de $V_{máx}$, com a inclinação mantida constante em todas as concentrações (WONG; WHITESIDES, 2013; SHARMA, 2012; COPELAND, 2005).

Figura 18: Gráfico de Lineweaver-Burk representando o comportamento da enzima mediante a variação de concentração de um inibido incompetitivo



Fonte: Nelson *et al.* (2014), Adaptado

1.3 MEDICAMENTOS SINTÉTICOS COMO POTENCIAIS MODULADORES BIOLÓGICOS NA BUSCA PELO DESENVOLVIMENTO DE TERAPIAS MAIS EFICAZES

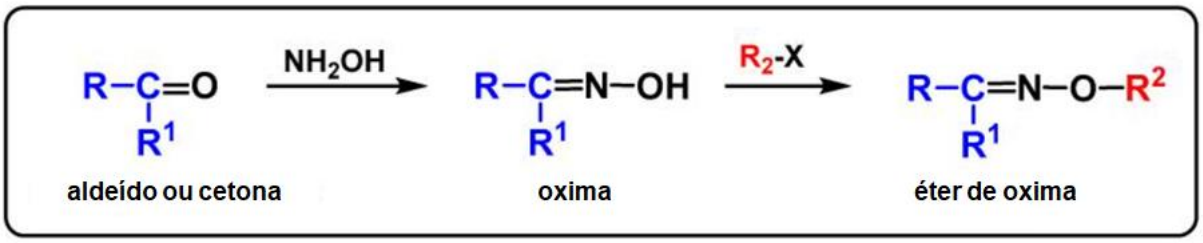
Medicamentos sintéticos são compostos projetados para interagir com alvos moleculares específicos no corpo humano, como enzimas ou receptores, desempenhando um papel importante na modulação de processos biológicos e na restauração da homeostase. Dotados de uma variedade de grupos funcionais, como aminas, grupos carbonila, hidroxilas, ésteres e amidas, esses compostos possuem diferentes formas de interação com os alvos terapêuticos. Por exemplo, as aminas podem estabelecer interações com ácidos nos sítios ativos das proteínas-alvo, enquanto os grupos carbonila têm a capacidade de formar ligações covalentes com essas proteínas. Já as hidroxilas podem influenciar a conformação ou a atividade catalítica das enzimas alvo. Esses grupos funcionais desempenham papéis fundamentais na eficácia e seletividade dos medicamentos, contribuindo significativamente para sua atividade farmacológica e para o desenvolvimento de terapias mais eficientes (BARREIRO; FRAGA, 2015).

1.3.1 Compostos Derivados de Éteres Oxímicos

O grupo oxima éter, derivado do éter oxi-imina, é uma característica proeminente em uma ampla variedade de compostos farmacêuticos e pesticidas. Sua presença em medicamentos destinados a diversas doenças impulsiona a busca por novos compostos contendo esse fragmento estrutural, estimulando também o estudo de suas diversas atividades biológicas. Os éteres de oxima foram extensivamente avaliados por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antidepressivas, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antiparasitárias, destacando seu potencial terapêutico e a importância de sua pesquisa contínua (MIRJAFARY, 2016 e KOSMALSKI 2023).

Esses compostos são formados pela reação de oxima (**Figura 19**), que envolve cetonas ou derivados de aldeídos, com halogênio alquil ou aril, apresentando a estrutura funcional >C=N-O-R (KOSMALSKI, 2023).

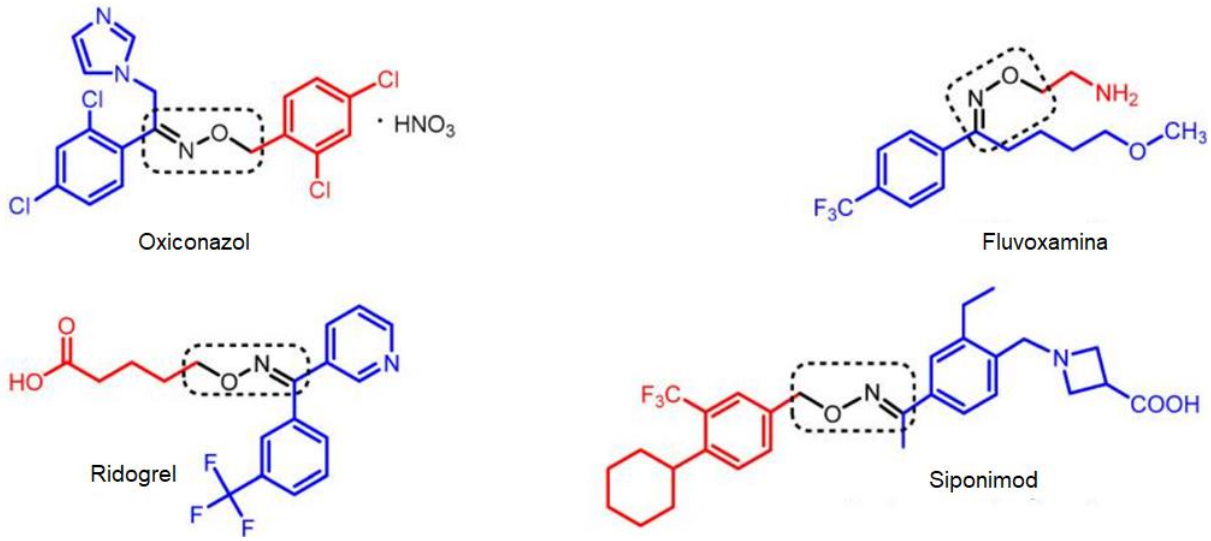
Figura 19: Síntese de éteres de oxima a partir de oximas e halogenetos de alquil(arila).



Fonte: Kosmalski (2023), Adaptado

Além de serem intermediários essenciais na síntese orgânica, permitindo a combinação de diferentes elementos estruturais em uma molécula, sua característica estrutural é um elemento presente em várias moléculas de medicamentos conhecidos, conforme demonstrado na **Figura 20** (KOSMALSKI, 2023).

Figura 20: Exemplos de medicamentos contendo porção éter de oxima



Fonte: Kosmalski (2023), Adaptado

O Oxiconazol é um exemplo de medicamento antifúngico derivado da acetofenona-oxima, sendo aplicado na pele na forma de pomada, creme ou pó. A Fluvoxamina é um antidepressivo que age como inibidor seletivo da recaptação de serotonina, com um derivado de oxima em sua estrutura, recentemente também utilizado no tratamento de COVID-19. Ridogrel é um medicamento de dupla ação que atua como inibidor da tromboxano sintase e antagonista do receptor de tromboxano A2, sendo derivado de éter oxima. O Siponimod é um modulador do receptor de esfingosina 1-fosfato indicado para o tratamento de formas recidivantes de esclerose múltipla, também contendo um grupo éter oxima em sua estrutura (KOSMALSKI 2023).

Estes exemplos representativos mostram que o grupo oxima éter oferece opções muito atraentes para o desenvolvimento de vários agentes farmacológicos, devido à sua relativa facilidade de síntese e às suas aplicações na química medicinal (MIRJAFARY, 2016).

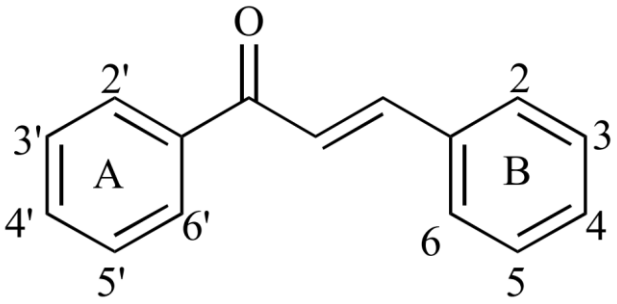
1.3.2 Chalconas

As chalconas são moléculas bioativas presentes na natureza, pertencentes à classe dos flavonoides fenólicos, que exibem propriedades terapêuticas diversas, incluindo ação anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e antiparasitária (JASIM, 2021).

O termo "chalcona" deriva de "Chalcos", do grego, em referência às cores amarela e laranja dos tecidos vegetais que as contêm. Apesar de terem sido mencionadas primeiramente por Stanisław Kostanecki e Josef Tambor, as chalconas têm sido usadas na medicina há muito tempo, especialmente no tratamento de câncer, inflamação e diabetes, através de plantas e ervas medicinais. A compreensão dessas propriedades tem inspirado a síntese de diversos derivados com potencial terapêutico (SAHU, 2012).

Quimicamente, as chalconas são compostos caracterizadas como cetonas α, β-insaturadas, consistindo em dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma unidade alcenona de três carbonos (**Figura 21**). Sua diversidade estrutural, que inclui a presença de grupos hidroxila fenólicos e substituições nos anéis aromáticos, resulta em uma ampla variedade de chalconas naturais, com milhares delas identificadas até o momento. Essa diversidade estrutural reflete-se em suas propriedades terapêuticas e potenciais aplicações clínicas (PEREIRA. 2023; SAHU, 2012, JASIM, 2021).

Figura 21: Estrutura molecular da chalcona



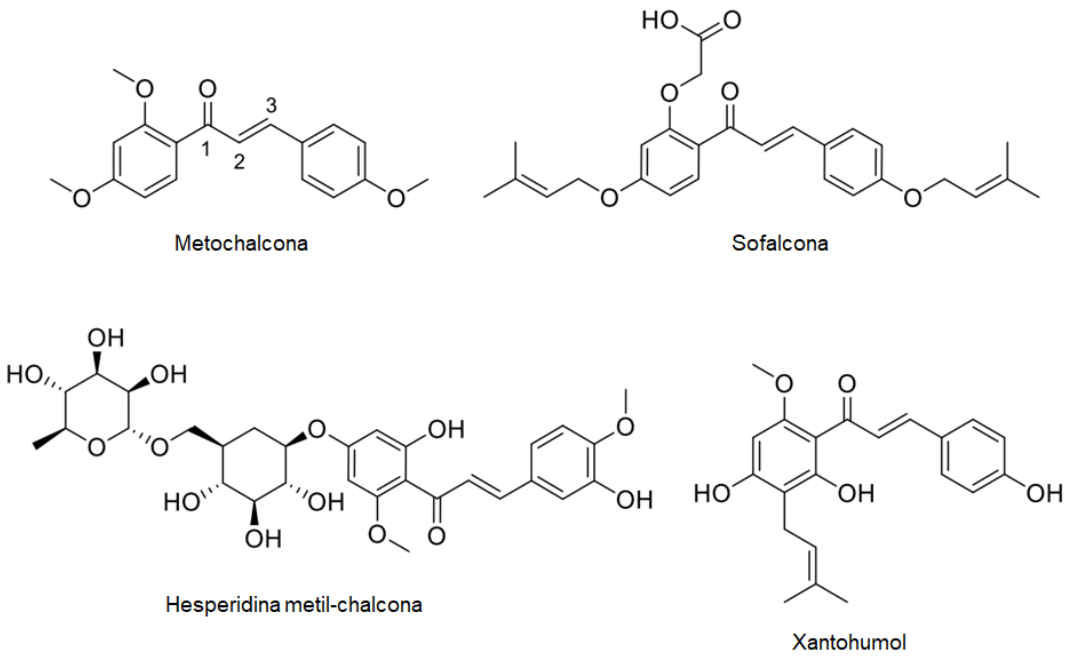
Fonte: Sahu *et al.* (2012)

A estrutura molecular flexível das chalconas permite modificações simples a partir de compostos aromáticos básicos, o que facilita a obtenção de derivados funcionalizados. Estudos têm demonstrado que muitos desses derivados sintéticos conservam ou até mesmo melhoram as propriedades bioativas das chalconas naturais, frequentemente apresentando menor toxicidade. Isso abre novas oportunidades de exploração no desenvolvimento de fármacos, sendo a bioinspiração na síntese de derivados de chalcona um caminho promissor nesse sentido (PEREIRA, 2023; JASIM, 2021).

A síntese de chalconas remonta ao século XIX, com métodos iniciais desenvolvidos por Kostanecki e Tambor. Atualmente, técnicas modernas envolvem o acoplamento de compostos aromáticos utilizando bases alcalinas e solventes polares. Diversos derivados de chalcona têm sido sintetizados a partir de diferentes compostos aromáticos, ampliando o leque de possíveis aplicações terapêuticas (JASIM, 2021).

Além disso, vários agentes terapêuticos derivados de chalconas já foram aprovados para diversas aplicações clínicas (**Figura 22**).

Figura 22: Derivados bioativos de chalcona



Fonte: Pereira (2021), Adaptado

Por exemplo, a Metochalcona foi aprovada como medicamento colerético, enquanto a Sofalcona é utilizada como medicamento antiúlcera para prevenir problemas gastrointestinais. A Hesperidina metil-chalcona foi testada e aprovada para insuficiência linfática venosa crônica, e, outro derivado, o Xantohumol, encontra-se em ensaio clínico para potencial atividade quimiopreventiva e antineoplásica (PEREIRA, 2021).

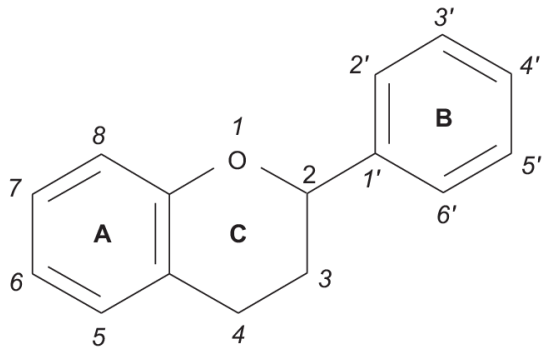
1.3.3 Flavonoides

Os flavonoides, metabólitos secundários encontrados abundantemente em plantas, frutas e sementes, desempenham diversas funções biológicas, como

regulação do crescimento celular, atração de insetos polinizadores e proteção contra estresses ambientais, enquanto que em humanos estão associados a uma ampla gama de benefícios à saúde devido às suas propriedades bioativas, incluindo ação anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antiviral e antiparasitária (DIAS, 2021; BADSHAH, 2021).

A estrutura dos flavonoides (**Figura 23**) é composta por um esqueleto de flavonas formado por 15 átomos de carbono, representado pela configuração C6-C3-C6. Essa estrutura básica é composta pelo núcleo 2-fenil-benzo[α]pirano, denominado flavano, que consiste em dois anéis de benzeno (A e B) conectados por um anel pirano heterocíclico (C) (CUSHNIE, 2005). A posição do anel B do catecol no anel C do pirano, juntamente com o número e a posição dos grupos hidroxila no grupo catecol do anel B, desempenham um papel crucial na determinação da capacidade antioxidante dos flavonoides. Esses grupos hidroxila funcionais têm a capacidade de doar elétrons por meio de ressonância, estabilizando assim os radicais livres e proporcionando proteção antioxidante (DIAS, 2021).

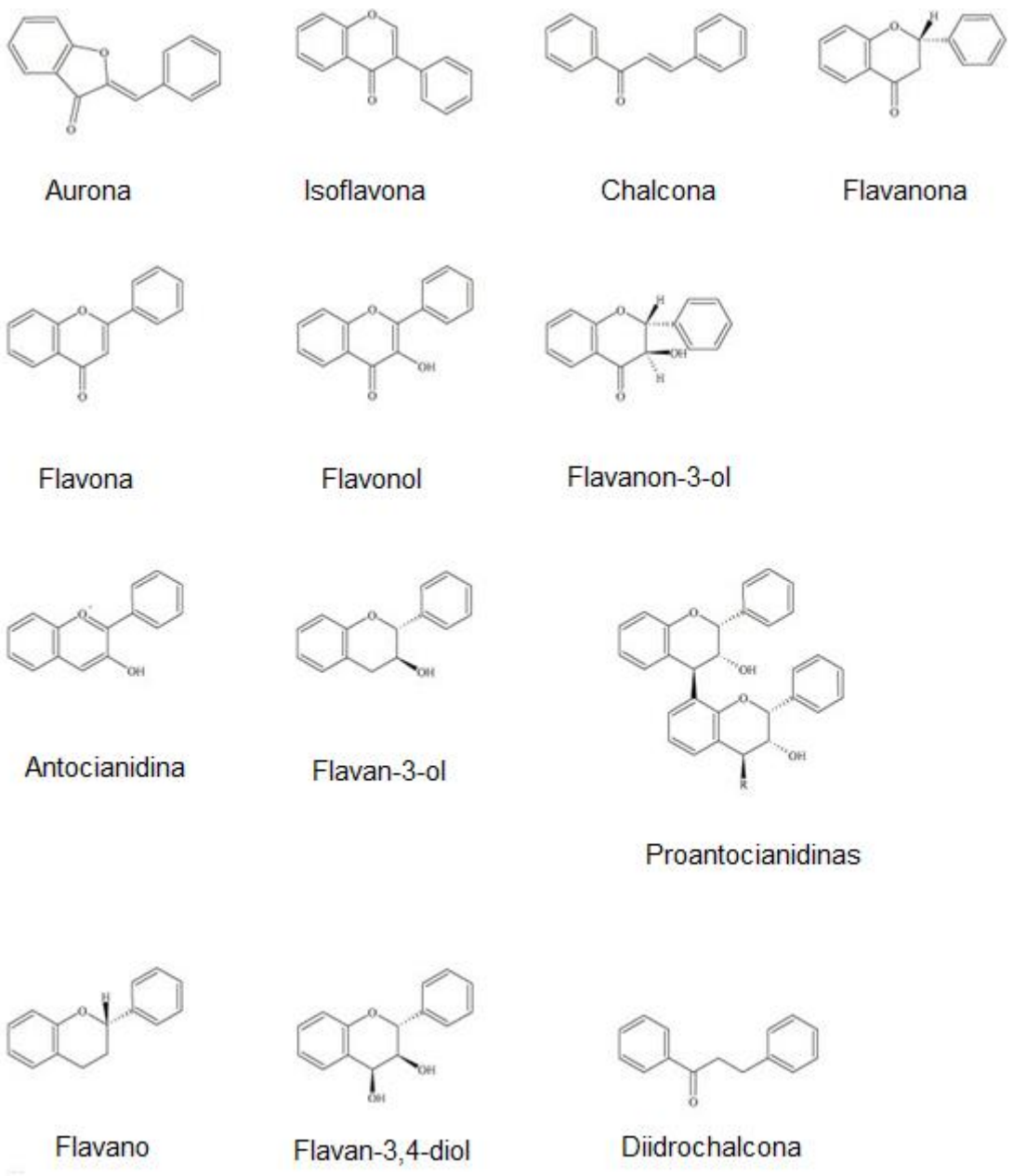
Figura 23: Estrutura molecular do flavonoide



Fonte: Cushnie (2005)

Os flavonoides podem ser classificados em seis classes principais, incluindo flavan-3-ols, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas, sendo categorizados pela sua estrutura e origem biossintética, conforme estrutura dispostas na **Figura 24**.

Figura 24: Estruturas das principais classes de flavonoides



Fonte: Cushnie (2005), Adaptado

Quanto à sua estrutura, os flavonoides podem ser categorizados em duas categorias principais com base no grau de saturação do anel heterocíclico central. Por exemplo, antocianidinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas apresentam insaturação C2 = C3, enquanto flavanonas, diidroflavonóis e flavan-3-óis são exemplos de flavonoides saturados. Esta classificação pode ser complementada pela análise do tamanho molecular e do grau de substituição nos anéis A e B, que incluem hidróxi, alquil e

metoxi (DIAS, 2021). Já com base em sua origem biossintética, algumas classes de flavonoides, como as chalconas, flavanonas, flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis, atuam tanto como intermediários na biossíntese quanto como produtos finais acumulados nos tecidos vegetais. Por outro lado, antocianidinas, proantocianidinas, flavonas e flavonóis são conhecidos apenas como produtos finais da biossíntese. Além disso, existem duas classes adicionais de flavonoides, as isoflavonas e isoflavonoides, formadas pela isomerização da cadeia lateral da flavanona na posição 3, e o neoflavonoide, que se forma por isomerização adicional na posição 4 (CUSHINE, 2005; DIAS, 2021).

Em resumo, os flavonoides representam uma classe diversificada e promissora de compostos naturais com uma ampla gama de atividades biológicas e potencial terapêutico, sendo que seu estudo e desenvolvimento podem levar à descoberta de novos medicamentos e terapias mais eficazes para uma variedade de doenças e condições médicas.

2 JUSTIFICATIVA

A Tripanossomíase Humana Africana (THA) é uma doença negligenciada prevalente na África Subsaariana, que traz consigo desafios consideráveis devido à complexidade da doença e do parasita *Trypanosoma brucei*, aos efeitos adversos dos medicamentos disponíveis e à falta de acesso a tratamentos adequados. À medida que a doença avança para estágios mais críticos, como o meningoencefálico, que afeta o sistema nervoso central e pode ser fatal sem tratamento adequado, torna-se necessária a busca por soluções que sejam tanto eficazes quanto seguras para combater a THA (GAO *et al.*, 2020; LEJON, 2013; ALKHALDI, 2023).

No âmbito do desenvolvimento de novos medicamentos, há um interesse crescente na pesquisa de dois grupos de compostos: as chalconas e os flavonoides, devido à sua atividade contra parasitas. As chalconas destacam-se por suas propriedades bioativas, incluindo a eficácia contra parasitas. Sua estrutura molecular, identificada como 1,3-diaril-2-propen-1-ona, possibilita a síntese de uma ampla gama de derivados com diversas funcionalidades. Por outro lado, os flavonoides, amplamente presentes em várias plantas, também são explorados devido ao seu potencial no combate aos tripanossomas (SAKAGAMI, 2017; GERVASI, 2022; ULLAH, 2020; NDJONKA, 2013).

Além desses grupos, os compostos oxímicos também são relevantes na indústria farmacêutica, demonstrando propriedades antimicrobianas, antitumorais e antiparasitárias. A pesquisa contínua sobre essas moléculas oferece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, especialmente no que se refere a testes em alvos terapêuticos (CORTES, 2018).

As proteases parasitárias, especialmente as metacaspases, surgem como alvos promissores na busca por novas estratégias de combate à THA. Essas enzimas, pertencentes à família das metacaspases, desempenham um papel fundamental na regulação celular dos tripanosomatídeos, como o *Trypanosoma brucei*. Estudos anteriores destacam a importância da metacaspase como uma enzima essencial no parasita, regulando eventos de autoprocessamento e ativação celular. Sua ausência em mamíferos, a baixa similaridade de sequência com as caspases e a dependência de glicose para suas atividades vitais a tornam um alvo promissor para agentes quimioterápicos antiparasitários. Isso sugere a viabilidade de desenvolver um sistema

para selecionar inibidores específicos, oferecendo uma abordagem direcionada e eficaz para o tratamento da THA (MOTTRAM *et al.,* 2003; UREN, 2000).

Dentre as cinco metacaspases codificadas a partir do genoma do *Trypanosoma brucei*, destaca-se a metacaspase-2, pelo fato da mesma ser enzimaticamente ativa. A metacaspase-2 (TbMCA-IIa) do *Trypanosoma brucei* é encontrada nos endossomos positivos RAB11 do parasita, sendo que sua atividade proteolítica é essencial para a função celular. Durante seu funcionamento, a TbMCA-IIa passa por autoprocessamento em dois sítios específicos (Lys^{55} e Lys^{268}), processo que é influenciado pela presença de íons cálcio, afetando tanto sua atividade proteolítica quanto sua especificidade ao substrato. Estudos indicam que essa enzima desempenha papéis importantes na regulação da morte celular programada, influenciando a sobrevivência e a adaptação do *T. brucei* em seu ambiente hospedeiro, o que ressalta sua importância como um alvo terapêutico específico (HELLMS, 2006; GILIO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2013; MCLUSKEY *et al*., 2012).

Para tanto, além dos avanços em genômica e proteômica, que estão impulsionando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras, é importante destacar o papel da triagem fenotípica e das abordagens baseadas em alvos. Essas técnicas possibilitam uma análise mais precisa das características e necessidades específicas dos parasitas, permitindo a identificação mais rápida e eficiente de inibidores seletivos, o que é relevante para a descoberta de terapias mais eficazes, que possam direcionar sua ação de forma mais precisa e minimizar efeitos colaterais indesejados (SIQUEIRA-NETO, 2018; CUDIC, 2009).

Adicionalmente, a enzimologia mecanística oferece valiosas percepções sobre os mecanismos de ação dos inibidores de enzimas. Compreender como esses compostos interagem com as enzimas-alvo a nível molecular permite direcionar a busca por novos compostos terapêuticos de forma mais eficaz. Esse conhecimento é particularmente relevante nas fases iniciais da descoberta de medicamentos, onde a identificação de compostos com potencial terapêutico é fundamental para impulsionar o progresso da pesquisa farmacêutica. Assim, investir em enzimologia mecanística pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras contra doenças como a Tripanossomíase Humana Africana (RUFER, 2021).

Nesse contexto, a luta contra a Tripanossomíase Humana Africana requer uma abordagem mais abrangente e diversificada, envolvendo a exploração de novos compostos terapêuticos, como as chalconas, flavonoides e compostos oxímicos. Além

disso, é essencial conduzir investigações direcionadas à identificação e desenvolvimento de estratégias inovadoras na busca por moduladores cada vez mais específicos da atividade da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avançar na identificação de potenciais inibidores para a TbMCA-IIa, associada ao *Trypanosoma brucei*, agente causador da Doença Do Sono Africana. Além disso, busca-se desenvolver um sistema celular de seleção de inibidores específicos para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem dos compostos derivados de éteres oxímicos, chalconas e flavonoides para análise da atividade inibitória contra a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*;
- Determinar o valor de IC_{50} das moléculas mais efetivas na inibição da TbMCA-IIa;
- Estabelecer o mecanismo de inibição dos compostos com maior potencial inibitório;
- Realizar ensaios de fluorescência intrínseca para avaliar possíveis modificações conformacionais;
- Construir um sistema de seleção de inibidores específicos para a TbMCA-IIa;
- Analisar a influência do crescimento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em resposta à variação da concentração de $CaCl_2$ e adição de glicose no meio

CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1: NOVEL OXIMIC COMPOUNDS ACTING AS *Trypanosoma brucei* METACASPASE-2 (*Tb*MCA-IIA) POTENTIAL INHIBITORS

Laura Helena Araujo[1], Thaynan Aparecida Bueno Chagas[2], Taiz dos Reis Santos[1], João Ricardo Bueno de Morais Borba[2], Mariana Nascimento Romero Trujilho[1], Marcelo Ferreira Marcondes[3], Maria Aparecida Juliano[3], Wagner Alves de Souza Júdice[1], Márcia Paranho Veloso[2], and Maurício Ferreira Marcondes Machado[1,*].

[1]Interdisciplinary Center for Biochemical Research, University of Mogi das Cruzes, Av Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brazil.

[2]Pharmaceutical Sciences Department, Alfenas Federal University, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-001, Alfenas, Brazil.

[3]Department of Biophysics, São Paulo Federal University, Rua Pedro de Toledo, 669, 7º floor, 04039-032, São Paulo. Brazil.

***Corresponding author:**

Maurício Ferreira Marcondes Machado, Ph.D.

Mail address: mauriciomachado@umc.br

Interdisciplinary Center for Biochemical Research

University of Mogi das Cruzes

Av Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200 - 08780-991 - Mogi das Cruzes, Brazil.

Author contributions:

LHA and TR - kinetic experiments and inhibitory tests of oximic compounds on *Tb*MCA-IIa.

MFM and MNRT - expression and purification of *Tb*MCA-IIa.

MPV and TABC – oximic compounds synthesis and molecular docking.

JRBMB – molecular docking and manuscript writing revision.

WASJ - mathematics of oximic compounds inhibition mechanism.

MFMM – design of experimental procedures and manuscript writing.

ABSTRACT

Metacaspases are a class of cysteine proteases prevalent in plants, fungi, and protozoa, implicated in programmed cell death (PCD) regulation. They exhibit unique structural characteristics and differ from caspases in their activation mechanism and substrate specificity. The nomenclature system for metacaspases is reevaluated, emphasizing their preference for basic residues in substrates. Herein are introduces oxymic compounds, particularly vanillin derivatives, to investigates their potential pharmaceutical applications. A series of 19 oxymic compounds were assessed for their inhibitory effects on TbMCA-IIa, a metacaspase found in *Trypanosoma brucei*, revealing three promising inhibitors: AO-7, AO-12, and EO-20. The inhibitory concentration (IC_{50}) values were assessed, with AO-**12** demonstrating significant potential as a non-competitive inhibitor. Molecular docking studies were conducted to further evaluate the affinity of these compounds for TbMCA-IIa. This research addresses the pressing demand for more efficient and less toxic therapies for trypanosomiasis, a parasitic disease caused by trypanosomes. Currently, there are no vaccines available for this disease, and drug toxicity poses significant limitations. The findings represent a significant advancement in the development of therapeutic agents targeting metacaspases in trypanosomatids. The study highlights the importance of understanding metacaspase regulation across different species of trypanosomatids, offering critical insights into inhibitor sensitivity and potential species-specific therapeutic strategies. In conclusion, this research provides promising avenues for the development of novel therapeutic agents targeting metacaspases in trypanosomatids, addressing a crucial gap in the battle against neglected diseases associated with these pathogens. Further research is imperative to refine the efficacy and safety profiles of these compounds, aiming to deliver more accessible and efficacious therapeutic solutions to populations affected by these debilitating diseases.

Keywords: Metacaspase, Inhibition, Oxymic compounds, Inhibition mechanism

Running Title: *Tb*MCA-IIa inhibition by oxymic compounds.

INTRODUCTION

Metacaspases are cysteine proteases belonging to the CD clan of the C14 family. These enzymes are homologous to caspases and are found in plants, fungi, and protozoa. Metacaspases cleave their substrates after basic residues at the P_1 position and are implicated in the regulation of programmed cell death (PCD) in these organisms [1–3]. They are classified into three types based on the arrangement of their p10 and p20 subunits: type I metacaspases are prevalent in plants, fungi, and protozoa, characterized by a proline-rich sequence at the N-terminal, which may also include a preceding zinc-finger motif. Type II metacaspases exhibit a linker region between the p20 and p10 subunits and are found in plants and protozoa. Type III metacaspases are specific to phytoplankton, with the p10 subunit located at the N-terminal [1,2].

Metacaspases differ from caspases in that they do not require dimerization for their activity, and possess a monomeric structure composed of 6 parallel and 2 anti-parallel β-sheets [3]. Activation of metacaspases occurs via an auto-processing event induced by calcium ions. In type II metacaspases, this event transpires within a specific region between the p20 and p10 subunits, analogous to caspase activation [1]. Conversely, type I metacaspases undergo auto-processing events at the N-terminal and/or C-terminal regions, as observed in metacaspase-2 of *T. brucei* [4].

The nomenclature "metacaspase" may lead to a misconception regarding the substrate specificity of these enzymes. While "caspase" denotes "Cysteine-ASpartate-ProteASE," metacaspases exhibit a preference for substrates featuring a basic residue (Arg or Lys) at the P_1 position. Hence, a new classification and nomenclature system has been proposed. The revised nomenclature employs the root symbol MCA, preceded by the abbreviated Latin name of the species, followed by a Latin numeral representing the type of metacaspase, and a small alpha character indicating the homologous number of metacaspase in the genome [2]. For instance, the type I metacaspase-2 of *T. brucei*, once known as TbMCA2, has been officially reclassified as TbMCA-IIa.

In the *T. brucei* genome, five metacaspase genes have been identified, exhibiting sequence identities ranging from 40% to 89%, along with variations in catalytic activity [5,6]. TbMCA1 and TbMCA4 feature a serine residue in lieu of a catalytic cysteine, rendering them catalytically inactive pseudo-peptidases. Despite the absence of

catalytic activity in TbMCA4, this enzyme plays a crucial role in the virulence and proliferation of *T. brucei*. Metacaspases 2, -3, and -5 of *T. brucei* harbor a Cys/His catalytic dyad and are enzymatically active [7].

The activity of TbMCA-IIa is contingent on calcium, with activation triggering auto-processing events at Lys^{55} and Lys^{268}. Following this event, the resulting three peptide chains remain associated in the activated form of TbMCA-IIa [4]. The crystal structure of TbMCA-IIa was elucidated using an inactive mutant (C213A) due to challenges in producing diffraction-quality crystals with the activated form [3]. The three-dimensional structure of TbMCA-IIa reveals its monomeric form, wherein the N-terminal region envelops the protein and extends over the active site, obstructing the S_1 pocket. Despite this hindrance, a TbMCA-IIa mutant (K55/268G) demonstrates activity in the non-processed form [4,8].

The crystallographic analysis of TbMCA-IIa unveils a calcium binding site constituted by four aspartate residues (Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190}, and Asp^{220}). These residues are highly conserved in metacaspases across various organisms, distinguishing them from caspases and accounting for their calcium-dependent nature [3]. Investigations employing a mutant of the calcium binding site, TbMCA-IIa D189/190A, confirm the critical role of these aspartic acid residues in calcium binding and subsequently in TbMCA-IIa activity, as evidenced by the lack of detectable activity against a synthetic substrate (Z-GGR-AMC) and the absence of auto-processing events [3].

Oxymic compounds are widely employed in the pharmaceutical field for their anti-inflammatory, anti-tumoral, and anti-parasitic properties [9–11]. Vanillin finds extensive use in the manufacturing of pharmaceutical products [12,13]. While vanillin is traditionally extracted from vanilla, various synthetic methods, including chemical synthesis via oximation, have been developed for its production [14,15]. Oxime derivatives have been synthesized from vanillin, showing promise as antimicrobial, cytotoxic, and antioxidant agents [16].

In this study, we evaluated a series of 19 oxime compounds as potential modulators of TbMCA-IIa activity. Among these, three compounds, ACIL OXIME (**7)**, ACIL OXIME (**12**), and ETER OXIME (**20**), demonstrated robust enzyme inhibition. Furthermore, we elucidated the inhibition mechanisms, revealing that compounds **7** and **20** exhibited mixed inhibition behavior, while compound **12** displayed non-competitive behavior.

Experiments conducted with the processed form of TbMCA-IIa, monitoring intrinsic fluorescence changes with increasing Ca^{2+} concentration, revealed the presence of two Ca^{2+} binding sites. One site displayed high affinity (K_D in 3 μM), crucial for TbMCA-IIa activity, while the other exhibited low-affinity calcium binding (K_D in 900 μM), influencing the substrate specificity of TbMCA-IIa [17]. The non-processed form of TbMCA-IIa demonstrated the capacity to hydrolyze small synthetic substrates, whereas hydrolysis of larger substrates was contingent on the auto-processing event, which displaced the N-terminal blockage of the active site, facilitating interaction with these substrates [8].

Compound **12** was assessed for its interaction with the calcium binding site of TbMCA-IIa. Intrinsic fluorescence experiments conducted with TbMCA-IIa wild type (TbMCA-IIa WT) and the mutant with the calcium binding site aspartates (Asp^{189} and Asp^{190}) mutated (TbMCA-IIa D189/190A) demonstrated that compound **12** induced changes in intrinsic fluorescence in TbMCA-IIa WT as its concentration increased. The dissociation constant (K_D = 2.6 ± 0.2 μM) corresponded closely to the K_i observed for this compound (K_i = 2.6 ± 0.1 μM). Interestingly, no such changes were observed in the intrinsic fluorescence of TbMCA-IIa D189/190A.

In summary, these findings present compound **12** as a promising molecule for inhibiting TbMCA-IIa activity. Compound **12** exerts its inhibitory effect by impeding the interaction with calcium, a pivotal element for TbMCA-IIa activity.

1. EXPERIMENTAL PROCEDURES

1.1 PRODUCTION OF RECOMBINANT *Tb*MCA-IIA

TbMCA-IIa clone are kindly donated by Prof. Dr. Jeremy C. Mottram of York University. Expression of TbMCA-IIa contained a N-terminal His-tag has been described previously [4].

Plasmids contained a *Tb*MCA-IIa gene was transformed into chemically competent *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS cells (Novagen, Darmstat, Germany) and initially grown in 20 mL of Luria broth medium with 50 μg. mL^{-1} of kanamycin (supplemented LB, sLB) and incubated at 37ºC around 16 hours with shaking at 1,500 x*g*. Pre-inoculums were transferred to 1 L of sLB medium at 37ºC and grown until the culture density reached an OD_{600} of 0.4. The temperature was reduced to 20ºC, and at this point isopropryl-β-D-1-thiogalactopyanoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.5 mM and the cells were incubated for 16 hours before being harvested by

centrifugation at 3,000 *g* for 20 min at 4ºC. The pellet was subsequently store at -80ºC as required.

1.2 PURIFICATION OF RECOMBINANT *Tb*MCA-IIA

The cell pellet was resuspended in a 20 mL of PBS (50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0, 150 mM NaCl) supplemented with 20 mM imidazole and 1 $mg.mL^{-1}$ lysozyme and incubated on ice for 30 min before the addition of 5 $\mu g.mL^{-1}$ RNase, 5 $\mu g.mL^{-1}$ DNase and 0.02% Triton X-100. This solution was further incubated for 30 min on ice before centrifugation at 15,000 *g* for 20 min at 4ºC and supernatant was recovered.

The supernatant from cell lysis was loaded into a 1 mL HisTrap Ni^{2+} Sepharose (GE Healthcare, Armesham, UK) column on Akta Start system (GE Healthcare, Armesham, UK) previously equilibrated in a binding buffer that are compost by 20 mM NaH_2PO_4 at pH 8.0, 150 mM NaCl, imidazole 20 mM using a flow rate of 1.0 $mL.min^{-1}$. The column was then washed with 5 mL of binding buffer and a recombinant *Tb*MCA-IIa was purified and eluted using a step gradient consisting of 5 mL of 50, 150, 300 and 500 mM of imidazole in the same buffer. *Tb*MCA-IIa was eluate with 300 mM imidazole (as confirmed by SDS-PAGE analyses) and the collect fractions were pooled. To desalt and further purity the same, the pooled protein was loaded directly into a Sephadex G-75 size-exclusion column, prepacked with 100 mL of resin (GE Healthcare, Armesham, UK) and equilibrated in TBS buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl). Elution fractions were analyze using SDS-PAGE and the fractions containing recombinant *Tb*MCA-IIa were collected. The pure *Tb*MCA-IIa was store in TBS buffer containing 30% glycerol and stores at -80ºC.

1.3 PEPTIDE SYNTHESIS

FRET peptides of the Abz-peptidyl-Gln-EDDnp, where Abz is the fluorescent group *ortho*-aminobenzoic acid and EDDnp is the C-terminal quencher moiety *N*-(2,4-dinitrophenyl)-ethylenediamide, were synthesized by solid-phase synthesis (as described in [18]) using a bench-top automated solid-phase peptide synthesizer PSSM-8 (Shimadzu, Tokyo, Japan). The molecular mass and purity of the peptides were checked by analytical Shimadzu HPLC 10AVP system (Shimadzu, Tokyo, Japan) and by MALDI-TOF MS using a microflex LT system (Brucker Daltonics, Bremen, Germany). Stock solutions of the peptide substrates were prepared in distilled water and the concentration was measured spectrophotometrically at 365 nm using the molar extinction coefficient of the Dnp group of 17,300 $M^{-1}.cm^{-1}$.

1.4 COMPOUNDS SYNTHESIS

1.4.1 Synthesis of (E)-3,4-dimethoxylbenzaldehyde oxime (2)

1.8 g (13 mmol) of potassium carbonate was added to a solution of 2 g (13 mmol) of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde in acetone. After 20 minutes, 1.62 mL of iodomethane (26 mmol) was added to the resulting suspension, which was stirred at room temperature for 6 hours, when it was observed by TLC that the chemical reaction had reached its completion. Onward, the acetone was removed, and water (30 mL) was added to the mixture, which was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). Its resulting organic layer was dried by adding sodium sulfate anhydrous, and then concentrated to obtain 2 g of 3,4-dimethoxybenzaldehyde. Then, 2 g ($1.2x10^{-2}$ mol) of 3,4-dimethoxybenzaldehyde, 16.3 g ($1.2x10^{-1}$ mol) of sodium acetate, and 8.3 g ($1.2x10^{-1}$ mol) of hydroxylamine hydrochloride were added to a mixture of methanol/water (8:2, 30 mL), which was stirred at 80ºC for 24 hours. Following this time frame, water (40 mL) was added to the mixture, which was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The resulting organic layer was then washed with saturated sodium chloride solution (2 x 60 mL), dried by adding anhydrous sodium sulfate, and finally concentrated to a point that 1.8 g (82% yield) of **2** was obtained.

1.5 GENERAL PROCEDURE FOR SYNTHESIS OF ACYL OXIMES 3-12

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC, 1.5 equiv.) as well as the corresponding (1.5 equiv.) carboxylic acid were solubilized in dichloromethane (15 mL), and this mixture was stirred at room temperature during 15 minutes. After this time frame, the solution was cooled at 0ºC, and the derivative **2** (1.0 equiv.) along with 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 0.1 equiv.) were added to it, and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Subsequently, the mixture was washed with HCl 1M (3 x 30 mL) as well as saturated with $NaHCO_3$ (3 x 20 mL) and water (2 x 50 mL), and its organic layer was concentrated to obtain the acyl oximes **3-7,** which were purified by column chromatography.

1.5.1 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-(O-benzoyl)oxime (AO-3)

This product was obtained in 51% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80: 20); m.p. 116-117ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3066, 3029, 2972, 2936, 2842, 1734, 1595, 1570, 1510. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.47 (1H, s, oxime), 8.11 (2H, dd, Ar-H, J^3 = 8.4 Hz, J^4 = 1.3 Hz), 7.63-7.57 (1H, m, Ar-H), 7.50-7.45 (3H, m, Ar-H), 7.18 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 7.39 (1H, d,

Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 3.95 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.92 (3H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 164.1 (1C, C=O), 156.6 (1C, C=N), 152.3 (1C, ar.), 149.4 (1C, ar.), 133.3 (1C, ar.), 129.6 (2C, ar.), 128.7 (1C, ar.), 128.5 (2C, ar.), 124.1 (1C, ar.), 122.7 (1C, ar.), 110.5 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, O$\underline{C}H_3$), 55.9 (1C, O$\underline{C}H_3$).

1.5.2 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[O-(4-chloro)benzoyl]oxime (AO-4)

This product was obtained in 50% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 130-132ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3090, 3006, 2922, 2848, 1736, 1589, 1573, 1509. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.46 (1H, s, oxime), 8.06 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.8 Hz), 7.48-7.45 (3H, m, Ar-H), 7.18 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.6 Hz), 6.90 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 3.96 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.93 (3H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 163.3 (1C, C=O), 156.9 (1C, C=N), 152.4 (1C, ar.), 149.5 (1C, ar.), 139.8 (1C, ar.), 131.0 (2C, ar.), 128.9 (2C, ar.), 127.1 (1C, ar.), 124.2 (1C, ar.), 122.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, O$\underline{C}H_3$), 55.9 (1C, O$\underline{C}H_3$).

1.5.3 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-nitro)benzoyl]oxime (AO-5)

This product was obtained in 58% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 151-152ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3078, 2940, 2847, 1730, 1593, 1569, 1512. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.49 (1H, s, oxime), 8.35-8.27 (4H, m, Ar-H), 7.47 (1H, d, Ar-H, J^4 = 1.9 Hz), 7.19 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.6 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 6.91 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 3.95 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.93 (3H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 162.2 (1C, C=O), 157.5 (1C, C=N), 152.6 (1C, ar.), 150.6 (1C, ar.), 149.5 (1C, ar.), 134.2 (1C, ar.), 130.7 (2C, ar.), 124.4 (1C, ar.), 123.6 (2C, ar.), 122.2 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, O$\underline{C}H_3$), 55.9 (1C, O$\underline{C}H_3$).

1.5.4 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-trifluoromethyl)benzoyl]oxime (AO-6)

This product was obtained in 55% yield as white crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 121-122ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3051, 2943, 2916, 1754, 1735, 1599, 1574, 1513. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.49 (1H, s, oxime), 8.23 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.8 Hz), 7.75 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.8 Hz), 7.48 (1H, d, Ar-H, J^4 = 1.9Hz), 7.19 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 6.90 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 3.96 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.93 (3H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 162.9 (1C, C=O), 157.2 (1C, C=N), 152.5 (1C, ar.), 149.5 (1C, ar.), 132.0 (1C, ar.),

130.0 (3C, ar.), 125.6 (1C, ar.), 125.5 (2C, ar.), 124.3 (1C, ar.), 122.4 (1C, CF_3), 110.6 (1C, ar.), 108.7 (1C, ar.), 56.1 (1C, O<u>C</u>H_3), 55.9 (1C, O<u>C</u>H_3).

***1.5.5 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(3,5-dinitro)benzoyl]oxime (AO-7)**

This product was obtained in 48% yield as yellow crystals; m.p. 138-139ºC; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 3113, 3096, 3013, 2920, 2848, 1760, 1598, 1575, 1534. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.28-9.24 (3H, m, Ar-H); 8.57 (1H, s, oxime), 7.47 (1H, d, Ar-H, J^4 = 1.9 Hz), 6.93 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 3.97 (3H, s, OC<u>H</u>$_3$), 3.95 (3H, s, OC<u>H</u>$_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 160.1 (1C, C=O), 158.2 (1C, C=N), 153.0 (1C, ar.), 149.6 (1C, ar.), 148.7 (2C, ar.), 132.6 (1C, ar.), 129.4 (2C, ar.), 124.7 (1C, ar.), 122.7 (1C, ar.), 121.7 (1C, ar.), 110.7 (1C, ar.), 108.8 (1C, ar.), 56.2 (1C, O<u>C</u>H_3), 56.0 (1C, O<u>C</u>H_3).

***1.5.6 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methyl)benzoyl]oxime (AO-9)**

This product was obtained in 56% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (dichloromethane/hexane 70:30); m.p. 139-141ºC; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 2955, 2921, 2849, 2839, 1735, 1607, 1598, 1574, 1508. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.36 (3H, s, Ar-C<u>H</u>$_3$), 3.85 (3H, s, O<u>C</u>H_3), 3.88 (3H, s, OC<u>H</u>$_3$), 6.82 (1H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.3 Hz), 7.11 (1H, dd, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.2, ^4J = 1.8 Hz), 7.21 (2H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.4 Hz), 7.42 (1H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 1.7 Hz), 7.94 (2H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.2 Hz), 8.39 (1H, s, -C<u>H</u>=N-). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 21.8 (1C, Ar-<u>C</u>H_3), 56.1 (1C, -O<u>C</u>H_3), 56.3 (1C, -O<u>C</u>H_3), 108.9 (1C, ar.), 110.8 (1C, ar.), 123.1 (1C, ar.), 124.2 (2C, ar.), 126.1 (2C, ar.), 129.4 (1C, ar.), 129.8 (1C, ar.), 144.3 (1C, ar.), 149.6 (1C, ar.), 152.4 (1C, ar.), 156.7 (1C, <u>C</u>=N), 164.4 (1C, <u>C</u>=O).

***1.5.7 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methoxy)benzoyl]oxime (AO-10)**

This product was obtained in 72% yield as brown crystals after being purified by chromatography (dichloromethane/hexane 70:30 and 80:20); m.p. 112-114ºC; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 2953, 2924, 2843, 1738, 1683, 1601, 1575, 1509. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.87 (3H, s, Ar-OC<u>H</u>$_3$), 3.92 (3H, s, O<u>C</u>H_3), 3.95 (3H, s, OC<u>H</u>$_3$), 6.89 (1H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.3 Hz), 6.96 (2H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.9 Hz), 7.17 (1H, dd, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.3, ^4J = 1.9 Hz), 7.49 (1H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 1.8 Hz), 8.08 (2H, d, Ar-<u>H</u>, ^3J = 8.9 Hz), 8.45 (1H, s, -C<u>H</u>=N-). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 55.6 (1C, Ar-O<u>C</u>H_3), 56.1 (1C, -O<u>C</u>H_3), 56.3 (1C, -O<u>C</u>H_3), 108.9 (1C, ar.), 110.7 (1C, ar.), 113.9 (2C, ar.), 121.1 (1C, ar.), 123.1 (2C, ar.), 124.2 (1C, ar.), 131.9 (1C, ar.), 149.6 (1C, ar.), 152.4 (1C, ar.), 156.5 (1C, <u>C</u>=N), 163.8 (1C, Ar-O<u>C</u>H_3), 164.1 (1C, <u>C</u>=O).

1.5.8 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-fluoro)benzoyl]oxime (AO-11)

This product was obtained in 38% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (dichloromethane/hexane 50:50 and 70:30); m.p. 120-124ºC; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 2954, 2917, 2848, 1599, 1573,1509. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.83 (3H, s, O$\underline{C}H_3$), 3.86 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 6.83 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.01 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 1.9 Hz), 7.07 (2H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.5 Hz), 7.10 (2H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.14 – 7.30 (2H, m, Ar-$\underline{H}$), 8.08 (1H, s, -C$\underline{H}$=N-). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 56.3 (2C, -O$\underline{C}H_3$), 111.4 (1C, ar.), 114.1 (1C, ar.), 115.7 (2C, ar.), 116.0 (1C, ar.), 125.7 (2C, ar.), 126.6 (1C, ar.), 132.9 (1C, ar.), 133.1 (1C, ar.), 149.4 (1C, ar.), 153.0 (1C, $\underline{C}$=N), 164.8 (1C, $\underline{C}$=O), 168.2 (1C, ar.).

1.5.9 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-*tert*-butil)benzoyl]oxime (AO-12)

This product was obtained in 28% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (dichloromethane/hexane 70:30); m.p. 121-123ºC; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 2951, 2921, 2876, 2844, 1598, 1571, 1508.^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 1.35 (9H, s, C(C$\underline{H}_3$)$_3$), 3.93 (3H, s, O$\underline{C}H_3$), 3.96 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 6.90 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 7.18 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 7.26 - 7.50 (3H, m, Ar-H), 8.05 (2H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 8.47 (1H, s, oxime). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 31.1 (3C, C($\underline{C}H_3$)$_3$, 35.2 (1C, $\underline{C}$(CH$_3$)$_3$), 56.0 (1C, O$\underline{C}H_3$), 56.2 (1C, O$\underline{C}H_3$), 108.8 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 122.9 (1C, ar.), 124.1 (1C, ar.), 125.6 (2C, ar), 125.9 (1C, ar.), 129.6 (2C, ar), 149.5 (1C, ar.), 152.0 (1C, ar.), 156.5 (1C, $\underline{C}$=N), 157.1 (1C, ar.), 164.2 (1C, $\underline{C}$=O).

1.6 GENERAL PROCEDURE FOR SYNTHESIS OF OXIME ETHERS 14-21

Sodium hydroxide (13 equiv.) as well as the oxime **2** (1 equiv.) were added to a solution of dimethyl sulfoxide/water (8:2), and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Following this time frame, corresponding (6 equiv.) benzyl chloride was added, and the resulting mixture was maintained under stirring at room temperature for 30 minutes, when it was noticed by TLC that the reaction had reached its completion. Onward, water (30 mL) was added to the mixture, which was extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). Its organic layer was washed with water (2 x 20 mL), dried by adding anhydrous sodium sulfate, and then concentrated to obtain the oxime ethers **14-21** that were lastly purified by column chromatography.

1.6.1 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-chloro)benzyl]oxime (EO-14)

This product was obtained in 41% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5 to 90:10); m.p. 72-73ºC; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 3068,

3000, 2990, 2968, 2931, 2855, 2833, 1605, 1575, 1511. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.06 (1H, s, oxime), 7.33 (4H, s, Ar-H), 7.21 (1H, d, Ar-H, J^3 = 1.9 Hz), 7.00 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 5.14 (2H, s, methylene), 3.91 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.89 (3H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 150.7 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 149.1 (1C, ar.), 136.1 (1C, ar.), 133.6 (1C, ar.), 129.5 (2C, ar.), 128.5 (2C, ar.), 124.8 (1C, ar.), 121.7 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 75.2 (methylene), 55.8 (2C, O$\underline{C}H_3$).

1.6.2 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methyl)benzyl]oxime (EO-15)

This product was obtained in 64% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5 to 90:10); m.p. 53-54ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3057, 3008, 2962, 2928, 2861, 2835, 1595, 1571, 1512. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.06 (1H, s, oxime), 7.32 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.0 Hz), 7.24 (1H, d, Ar-H, J^4 = 1.9 Hz), 7.17 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.0 Hz), 7.00 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.4 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.4 Hz), 5.16 (2H, s, methylene), 3.92 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.89 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 2.35 (3H, s, methyl). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 150.6 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 148.7 (1C, ar.), 136.7 (1C, ar.), 134.4 (1C, ar.), 129.0 (2C, ar.), 128.4 (2C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 76.1 (methylene), 55.8 (2C, O$\underline{C}H_3$), 21.1 (1C, Ar-$\underline{C}H_3$).

1.6.3 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-*tert*-butil)benzyl]oxime (EO-16)

This product was obtained in 51% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 95:5 to 90:10); m.p. 69-71ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3078, 3029, 2998, 2947, 2901, 2877, 2840, 1599, 1573, 1508. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.07 (1H, s, oxime), 7.42-7.37 (4H, m, Ar-H), 7.25 (1H, s, Ar-H), 7.01 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 5.17 (2H, s, methylene), 3.92 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.89 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 1.32 (9H, s, C(C$\underline{H}_3$)$_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 150.9 (1C, C=N), 150.6 (1C, ar.), 149.2 (1C, ar.), 148.7 (1C, ar.), 134.4 (1C, ar.), 128.2 (2C, ar.), 125.3 (2C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 76.1 (methylene), 55.8 (2C, O$\underline{C}H_3$), 34.5 (1C, $\underline{C}$(CH$_3$)$_3$), 31.3 (3C, C($\underline{C}$H$_3$)$_3$).

1.6.4 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-methoxy)benzyl]oxime (EO-17)

This product was obtained in 82% yield as yellow crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 80:20); m.p. 79-80ºC; IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 3042, 3011, 2960, 2916, 2876, 2845, 1612, 1601, 1510. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.05 (1H, s, oxime), 7.36 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.7 Hz), 7.24 (1H, d, Ar-H, J^4 = 1.9 Hz),

7.00 (1H, dd, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz, J^4 = 1.9 Hz), 6.90 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.7 Hz), 6.83 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.3 Hz), 5.13 (2H, s, methylene), 3.92 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.89 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 3.81 (3H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.4 (1C, ar.), 150.6 (1C, C=N), 149.2 (1C, ar.), 148.7 (1C, ar.), 130.0 (2C, ar.), 129.5 (1C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 121.6 (1C, ar.), 113.8 (2C, ar.), 110.6 (1C, ar.), 108.0 (1C, ar.), 75.9 (methylene), 55.8 (2C, O$\underline{C}H_3$), 55.2 (1C, O$\underline{C}H_3$).

***1.6.5 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-nitro)benzyl]oxime (EO-18)**

This product was obtained in 54% yield as brown crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10); m.p. 87-90 ^{o}C; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 3040, 3008, 2951, 2845, 1730, 1602, 1511. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.22 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.0 Hz), 8.22 (1H, s, oxime), 7.55 (2H, d, Ar-H, J^3 = 8.0 Hz), 7.21 (1H, m, Ar-H), 7.00 (1H, d, Ar-H, J^4 = 8.2 Hz), 6.84 (1H, d, Ar-H, J^3 = 8.2 Hz), 5.27 (2H, s, methylene), 3.90 (6H, s, OC$\underline{H}_3$). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 151.0 (1C, ar.), 149.8 (1C, C=N), 149.3 (1C, ar.), 145.6 (1C, ar.), 128.3 (2C, ar.), 124,6 (1C, ar.), 123.7 (2C, ar.), 121.9 (1C, ar.), 110.8 (1C, ar.), 108.2 (1C, ar.), 74.6 (methylene), 55.9 (2C, O$\underline{C}H_3$).

***1.6.6 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-bromo)benzyl]oxime (EO-19)**

This product was obtained in 62% yield as white crystals after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10); m.p. 93-95^{o}C; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 2989, 2965, 2933, 2832, 1607, 1575, 1511. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.90 (3H, s, -OC$\underline{H}_3$), 3.91 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 5.13 (2H, s, -O-C$\underline{H}_2$-Ar), 6.84 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^3J = 8.3 Hz), 7.01 (1H, dd, Ar-$\underline{H}$, ^3J = 8.3, ^4J = 1.9 Hz), 7.22 (1H, d, Ar-H, ^3J = 1.8 Hz), 7.29 (2H, d, Ar-H, ^3J = 8.4 Hz), 7.49 (2H, d, Ar-$\underline{H}$, ^3J = 8.4 Hz), 8.06 (1H, s, C$\underline{H}$=N). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 56.1 (2C, -O$\underline{C}H_3$), 75.5 (1C, -O$\underline{C}H_2$-Ar), 108.3 (1C, ar.), 110.9 (1C, ar.), 121.9 (1C, ar.), 121.9 (1C, ar.), 125.0 (1C, ar.), 130.0 (2C, ar.), 131.7 (2C, ar.), 136.9 (1C, ar.), 149,3 (1C, $\underline{C}$=N), 159,4 (1C, ar.), 150,9 (1C, ar.).

***1.6.7 (E)*-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-trifluoromethyl)benzyl]oxime (EO-20)**

This product was obtained in 64% yield as yellow oil after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 80:20); m.p. 88-91^{o}C; IR ($\bar{u}$/cm^{-1}): 3032, 3001, 2954, 2914, 2868, 2840, 1606, 1599. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.90 (3H, s, -OC$\underline{H}_3$), 3.91 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 5.24 (2H, s, -O-C$\underline{H}_2$-Ar), 6.83 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^3J = 8.2 Hz), 7.02 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^3J = 8.2), 7.24 (1H, d, Ar-H, ^3J = 1.7 Hz), 7.52 (2H, d, Ar-H, ^3J = 8.2 Hz), 7.62 (2H, d, Ar-$\underline{H}$, ^3J = 8.2 Hz), 8.09 (1H, s, C$\underline{H}$=N). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 55.9 (2C, -O$\underline{C}H_3$), 75.2 (1C, -O$\underline{C}H_2$-Ar), 108.2 (1C, ar.), 110.7 (1C, ar.), 121.8 (2C, ar.),

124.8 (1C, ar.), 125.3 (1C, ar.), 128.1 (2C, ar.), 141.9 (1C, ar.), 149.4 (1C, C=N), 150,9 (1C, ar.).

1.6.8 (E)-3,4-dimethoxyphenyl-[*O*-(4-fluoro)benzyl]oxime (EO-21)

This product was obtained in 59% yield as yellow oil after being purified by chromatography (hexane/ethyl acetate 90:10 to 90:10); IR ($\bar{\upsilon}$/cm^{-1}): 2956, 2931, 2872, 2839, 1600, 1577, 1508. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.90 (3H, s, -OC$\underline{H}_3$), 3.92 (3H, s, OC$\underline{H}_3$), 5.15 (2H, s, -O-C$\underline{H}_2$-Ar), 6.84 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.01 (1H, dd, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.9 Hz), 7.05 (2H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.7 Hz), 7.23 (1H, d, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 1.9 Hz), 7.39 (2H, dd, Ar-$\underline{H}$, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 5.5 Hz), 8.06 (1H, s, -C$\underline{H}$=N-). ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 56.1 (2C, -O$\underline{C}H_3$), 75.6 (1C, -O$\underline{C}H_2$-Ar), 108.3 (1C, ar.), 110.9 (1C, ar.), 115.3 (2C, ar.), 115.6 (2C, ar.), 121.9 (1C, ar.), 125.1 (1C, ar.), 130.4 (1C, ar.), 148.2 (1C, C=N), 149.4 (1C, ar.), 150.9 (1C, ar.), 164.3 (1C, ar.).

1.7 SCREENING OF OXYMIC COMPOUNDS AS A *Tb*MCA-IIA MODULATOR

The screening of compounds where performed in a Hitachi F-2700 spectrofluorometer (Tokyo, Japan), using a cuvette with a 1 cm path-length containing final volume of 1 mL of 50mM Tris/HCl buffer, pH 7.4 with 100 mM NaCl and 1 mM $CaCl_2$ placed in a temperature-controlled chamber for 5 minutes. Following this, TbMCA-IIa was pre-incubated with 2.5 mM dithiothreitol (DTT) and 10 µM of the compound for 5 minutes. Afterwards, the FRET substrate Abz-KARSSAQ-EDDnp was added (5 µM final concentration), and hydrolysis was monitored with excitation and emission wavelengths set at 320 nm and 420 nm, respectively. The increase in fluorescence was recorded as arbitrary fluorescence units per minute (UAF/min). The rate of substrate hydrolysis without the compound was considered 100%, and the effect of the oxymic compounds was expressed as a percentage of this reference rate.

1.8 DETERMINATION OF IC_{50} VALUES FOR INHIBITOR

TbMCA-IIa was assayed in the standard reaction buffer containing 50 mM Tris/HCl at pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$. The enzyme was incubated in the presence of 2.5 mM DTT for 5 minutes at 25°C, in a final volume of 1 mL with constant stirring. Enzyme activity was monitored using the FRET substrate Abz-KARSSAQ-EDDnp as a probe, and the increase in fluorescence was measured.

Selected compounds, namely AO-7 (acyl oxime 7), AO-12 (acyl oxime 12) and EO-20 (ether oxime 20) were assessed for their inhibitory potential on TbMCA-IIa through a spectrofluorometric method, with excitation and emission wavelengths set at

320 nm and 420 nm, respectively. Enzyme inhibition was expressed as the compound concentration causing a 50% decrease in enzyme activity, represented as IC_{50} values.

The IC_{50} values were determined using non-linear regression analysis, based on dose-response curves obtained by testing inhibitors at different concentrations. The data were analyzed using Grafit 5.0 software (Erithacus, UK) with the following equation: [$y = Range / (1 + (x / IC_{50})^{s})$], where "Range" is the fitted uninhibited value, and "s" is a slope factor. This equation assumes that y decreases with increasing x.

1.9 ENZYME KINETICS AND MECHANISM DETERMINATION

Studies of *Tb*MCA-IIa inhibition kinetics were carried out at various concentrations of Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp ranging from 0 to 20 μM in an absence and presence of oxymic compounds (1, 2, 3 and 4 μM, respectively), in a spectrofluorometer Hitachi F-2700 (Hitachi, Tokyo, Japan) with the excitation and emission wavelengths set at 320 and 420 nm, respectively. For all kinetic measurements, the compound was pre-incubated with *Tb*MCA-IIa for 10 min before the addition of substrate. All assays were performed in triplicates. Inhibition constants were determined using different equations, depending on the inhibition mechanism. The data of activity rate and substrate concentration generate rectangular hyperbolic profiles which were linearized using Lineweaver-Burk/double reciprocal plot. The replot profiles of the slope vs [inhibitor] and intercept vs [inhibitor] provided the K_i and αK_i parameters, respectively.

1.10 THE EFFECT OF ACIL OXIME 12 ON THE INTRINSIC FLUORESCENCE OF *TB*MCA-IIA WT AND *TB*MCA-IIA D189/190A

Structural changes in both TbMCA-IIa WT and TbMCA-IIa were investigated by monitoring intrinsic fluorescence. The experiments were conducted in a buffer containing 50 mM Tris/HCl at pH 8.5, with the addition of varying concentrations of compound **12** (ranging from 0.3 to 10 μM), and a final protein concentration of 2 μM. Emission spectra were recorded in the 300-400 nm range at 25°C, with a fixed excitation wavelength of 280 nm. Both excitation and emission used a 2.5-nm slit width. The obtained data were analyzed using the 1-site interaction equation, which characterizes the binding of ligands to a single site on a receptor. The analysis was performed with Grafit 5.0 software.

1.11 MOLECULAR DOCKING METHODOLOGY

The three-dimensional (3D) structures of all ligands (compounds **7**, **12**, and **20**) were drawn and optimized using MarvinSketch v21.20 software. Subsequently, ionization states at pH 7.4 were generated using the OpenBabel v3.1.1 tool, which was also employed to convert all files from *.mol2 to *.pdbqt format.

The three-dimensional structure of *Trypanosoma brucei* metacaspase-2 (TbMCA-IIa) was obtained from the RCSB Protein Data Bank website (PDB ID: 4AF8). Subsequently, using AutoDock Tools v1.5.7 software, water molecules and other unwanted molecular entities in TbMCA-IIa were removed to avoid bias from the presence of these chemical entities at the binding site. Kollman charges and polar hydrogen atoms were added, and the protein target was saved in *.pdbqt format.

Molecular docking assays were performed using AutoDock Vina software (Trott; Olson, 2010). To ensure that ligands would interact with the desired region of TbMCA-IIa, molecular docking calculations were confined by a 3D space referred to as a grid box. Vina's search algorithms tested different ligand conformations to find the most favorable one for binding to the given protein target. The grid box parameters were defined based on the center values and sizes of x, y, and z coordinates (center values: x = 58.306, y = 44.611, z = -36.549; sizes: x – 25.0 Å, y – 25.0 Å, z – 25.0 Å), encompassing the TbMCA-IIa Ca^{2+} binding site, specifically amino acid residues Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190}, and Asp^{220} [3,8,17].

Results were analyzed from a binding affinity energy perspective, provided in -Kcal.mol^{-1}, which considers variations in rotational, translational, conformational positions, and movements to identify the most stable protein-ligand complex. Results were sorted in increasing energy order (from most negative to most positive) to determine the best interaction profiles. Subsequently, the top-ranked conformations of each ligand were associated with the TbMCA-IIa protein using PyMOL v2.5.2 software (Schrödinger, LLC, San Diego, CA, USA). To dissect the interaction profiles, Discovery Studio Client v21.1.0.20298 software was employed, which allowed the determination of intermolecular forces, including hydrogen bonds (H-bonds), using 2D ligand-protein interaction diagrams as well as 3D representations.

2. RESULTS

2.1 SCREENING FOR THE INHIBITORY ACTIVITY OF OXIME COMPOUNDS

TbMCA-IIa are completely processing after the purification processes, as described previous studies of our group [17]. All compounds tested in this screening were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and TbMCA-IIa activity was tested at different concentrations of DMSO, it was observed that this solvent does not affect TbMCA-IIa activity (data not shown). The screening of the effect of 19 oxymic compounds on TbMCA-IIa activity was evaluated at a concentration of 10 µM for each compound. It was observed that at concentrations higher than 30 µM, oxymic compounds precipitated, for this reason the screening was evaluate only with 10 mM of oxymic compounds, this experiment was realized in triplicate. All compounds were capable of inhibiting TbMCA-IIa activity (Figure 1), and compounds that could inhibit 65% of TbMCA-IIa activity were selected for more detailed analysis. Compounds **AO-7** (65% of inhibition), (**AO-12** (88% inhibition), and **EO-20** (75% inhibition) were chosen to determine the IC_{50} values and inhibition mechanism.

2.2 INHIBITORY CONCENTRATION (IC_{50})

The inhibitory concentration (IC_{50}) of compounds **AO-7**, **AO-12**, and **EO-20** were evaluated using different concentrations. The decrease in TbMCA-IIa activity was calculated using a spectrofluorimeter, specifically the HITACHI F-2700. Each concentration of compounds was pre-incubated with TbMCA-IIa for 10 minutes at 25°C, and the measurement of activity was evaluated point by point. The IC_{50} values for compounds **AO-7**, **AO-12**, and **EO-20** were 3.31±0.25 µM, 2.52±0.19 µM, and 5.3±0.83 µM, respectively (Table 1).

2.3 INHIBITION MECHANISM OF *Tb*MCA-IIA BY OXYMIC COMPOUNDS

Because of the lower IC_{50} values observed for compounds **AO-7**, **AO-12**, and **EO-20**, we investigated the inhibition mechanism for these compounds, as well as determined the values of K_i and αK_i.

Screening and IC_{50} experiments were performed with FRET peptide Abz-KARSSAQ-EDDnp (K_M = 0.5 µM and k_{cat} 0.5 s^{-1}, [17]), inhibition mechanism experiments were conducted with the enzymatic kinetic with FRET peptide Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp (K_M = 5.5 µM and k_{cat} = 0.1 s^{-1}), this peptide were used cause

the higher K_M and slower k_{cat} what allowed a better comparison between the kinetic parameters at TbMCA-IIa performed with different compounds.

The Michaelis-Menten plot for compound **AO-7** is depicted in Figure 2A, and according to Figure 2B (Lineweaver-Burk plot), this compound alters both kinetic parameters K_M and k_{cat}, as evidenced by the intersection of the lines occurring in the second quadrant. Upon re-evaluating the intercept and slope parameters obtained from the Lineweaver-Burk plot, it became evident that the replot of both slope vs. [inhibitor] and intercept vs. [inhibitor] displayed linear behavior, allowing the determination of the K_i and αK_i values through linear regression, and the calculated values were K_i = 2.45±0.14 µM and αKi = 6.72±0.21 µM, with α=2.74. A parallel pattern was observed with compound **20**, where the inhibition kinetics yielded K_i = 1.51±0.25 µM and αKi = 8.02±0.27 µM, with α being 5.31. Both compounds **AO-7** and **EO-20** exhibited a non-competitive mixed inhibition mechanism (Figure 4), and the α parameters demonstrate that compounds **AO-7** and **EO-20** have a significantly higher affinity, approximately 3 to 5 times greater, for the free enzyme E compared to the ES complex, respectively.

The compound **AO-12** displayed a distinctive behavior in comparison to the compounds **AO-7** and **EO-20**. An examination of the Michaelis-Menten plot reveals that compound **AO-12** exclusively impacts Vmax (Figure 5A). This observation is reinforced by the Lineweaver-Burk plot, which indicates that the plots converge on the X-axis, affirming that the compound **AO-12** specifically affects the k_{cat} of TbMCA-IIa (Figure 5B). Upon replotting the intercept vs. [inhibitor] and slope vs. [inhibitor], we observed a linear pattern, allowing us to calculate K_i = 2.53±0.18 µM and αK_i = 2.44±0.14 µM (Figure 5C and 5D). These data emphasize that the $K_i/\alpha K_i$ relationship is close to 1.0, leading to the conclusion that the inhibition mechanism of compound **AO-2** is non-competitive and the compound binds with the same affinity to the free enzyme E and the ES complex (Figure 4).

2.4 INTERACTION AT ACIL OXIME 12 WITH CALCIUM BINDING SITE OF *Tb*MCA-IIA

To evaluate whether compound **AO-12** interacts allosterically with the calcium-binding site of TbMCA-IIa, which is composed of residues Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190}, and Asp^{220}, we conducted an experiment to examine its impact of **AO-**12 on the intrinsic

fluorescence of TbMCA-IIa. This analysis was carried out using both TbMCA-IIa WT and the catalytically inactive TbMCA-IIa D189A/D190A mutant, which lacks the calcium-binding site. Intriguingly, compound **AO-12** modulates the intrinsic fluorescence of TbMCA-IIa WT in a dose-dependent manner, and the dissociation constant (K_D) closely approximates the K_i value, at approximately 2.6 ± 0.21 µM (Figure 6A). However, compound **AO-12** does not elicit any change in the intrinsic fluorescence of the TbMCA-IIa D189A/D190A mutant, in which is lacking the calcium-binding site (Figure 6B).

2.5 MOLECULAR DOCKING STUDIES

To verify the affinity of Oxymic derivatives that showed good inhibitory potential for metacaspase-2 of *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa), molecular docking studies were performed for compound **AO-12**, and the results of affinity energy are presented in Table 2. Compound **AO-7** presented the best affinity energy value of -7.0 kcal.mol^{-1}, and the main intermolecular interactions (Figure 7) observed between the ligand and TbMCA-IIa were two hydrogen bond interactions with residues Arg^{44} and Arg^{243}, and salt bridge interactions with the residues Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190}, and Asp^{220}, as well as a Pi-Alkyl interaction with the residue His^{193}. Compound **AO-12** presented an affinity energy value of -6.3 kcal/mol, and four hydrogen bond interactions with the amino acid residues Ile^{218}, Met^{219}, Asp^{220}, and Arg^{243} were observed, in addition to a Pi-Alkyl interaction with the residue Ile^{218} and an Alkyl interaction with the residue Ile^{242}. Compound 20 exhibited a binding energy of -6.1 kcal/mol and formed two hydrogen bond interactions with the residues Ile^{218} and Asp^{220}. Furthermore, it demonstrated a Pi-anion interaction with residue Asp^{220} and an Alkyl interaction with residue Ile^{242}, illustrating a diverse and robust binding profile. Figure 7 illustrates the principal ligand-enzyme interactions in TbMCA-IIa, underscoring how the observed affinity could potentially translate into inhibitory activity.

3. DISCUSSION

Trypanosomatids belong to the Kinetoplastid order, with some species acting as pathogens responsible for neglected diseases like Chagas disease, sleeping sickness, and different forms of leishmaniasis. Despite the existence of chemotherapies for these diseases over many years, there are no vaccines available against these protozoa. However, these drugs have drawbacks, as they can be toxic and may lead to unpleasant side effects [19–22].

Numerous endeavors have been undertaken to identify novel therapeutic targets, with proteolytic enzymes emerging as potential candidates for developing new drugs aimed at treating trypanosomiasis [23,24]. In recent years, metacaspases have demonstrated their significance in various cellular processes within trypanosomatid parasites. These enzymes play crucial roles in cell cycle progression, differentiation, and homeostasis, all of which are vital for cell survival and development [4,6,25–28]. The initial evidence highlighting the involvement of metacaspases in a programmed cell death pathway was observed in yeast [23]. Given their role in cell death pathways, metacaspases are an appealing target in the realm of medically significant trypanosomatids.

It has been reported that Trypanosoma brucei harbors five metacaspase genes (TbMCA-Ia – TbMCA-Va), and three of these metacaspases are indispensable for the survival of the bloodstream form of the parasite [6].

A set of 17 synthetic oxymic compounds (at 10 µM) was subjected to an assay with TbMCA-IIa. All these compounds demonstrated the ability to inhibit TbMCA-IIa activity (Figure 1), with compounds AO-7, AO-12 and EO-20 exhibiting an inhibition of over 75% of enzyme activity. All three compounds were assessed and displayed similar IC_{50} values (Table 1), measuring 3.31 ± 0.25 µM, 2.52 ± 0.19 µM, and 5.3 ± 0.83 µM, respectively. Notably, these values were lower than those reported by Pérez et al., whose study indicated an IC_{50} of 49.2 µM for HTS01959 [24].

Herein, we are the first to describe micromolar inhibitors for *T. brucei* metacaspase, and the inhibition mechanism was tested for these three compounds. AO- 7 and EO-20 present a mixed inhibition mechanism, with an αKi value higher than that observed for K_i. This effect suggests that TbMCA-IIa prefers to interact with the enzyme-substrate complex. Curiously, TbMCA-IIa is a cytosolic metacaspase in *T. brucei*, and it has been reported that its activity is calcium-dependent, and that calcium activation could lead to TbMCA2 processing after two lysine residues (Lys^{55} and Lys^{268}) and the residues formed during the processing event remain associated in the autoprocessed form of TbMCA-IIa [4,8]. The structure of TbMCA-IIa demonstrates that its N-terminal region encircles the protein and crosses over the active site, blocking the S_1 pocket [3]. Therefore, our data suggest that AO-7 and EO-20 interact with the processed form of TbMCA-IIa. There is no data demonstrating that *T. cruzi* metacaspases undergo any autoprocessing *in vivo* or *in vitro* [24]. TbMCA-IIa, as observed in *T. cruzi* metacaspases, was not detected to undergo any processing *in*

vivo. This is curious because, as cited above, *in vitro*, the autoprocessing of TbMCA-IIa is readily detected [4].

On the other hand, AO-12 compound shows a non-competitive inhibition mechanism, and the αK_i value was equal to the observed K_i, suggesting that this compound prefers to interact with a free enzyme form in an allosteric way. In a study using the processed form of TbMCA-IIa, we were able to follow intrinsic fluorescence changes based on the added concentration of Ca^{2+} [17], and in this titration assay, it was clear that there are at least two Ca^{2+} binding sites present at the TbMCA-IIa: a high-affinity calcium binding site (K_D µM) that is essential for TbMCA-IIa activity and a low-affinity calcium binding site (K_D mM) that appears to modulate TbMCA-IIa substrate specificity .

Herein, we assayed the effect of AO-12 on intrinsic fluorescence at TbMCA-IIa WT, and it was observed that AO-12 affects TbMCA-IIa, presenting a $K_D = 2.6 \pm 0.2$ µM, which is very similar to the K_i (Figure 6A). To analyze if this compound interacts with a calcium binding site, an effect of AO-12 on intrinsic fluorescence at TbMCA-IIa D189/190A mutant was examined. This mutant was inactive because metacaspases are highly dependent on calcium [3]. AO-12 doesn't affect the intrinsic fluorescence of this mutant, showing that this compound interacts with the free enzyme, preventing calcium from interacting with TbMCA-IIa and activating this enzyme (Figure 6B), these data was corroborated with the molecular docking where the AO-12 interact with the four aspartates of the calcium binding site (Figure 7).

4. CONCLUSIONS

In conclusion, this research represents a significant stride in the quest for potential inhibitors targeting TbMCA-IIa, a metacaspase identified in *Trypanosoma brucei*, the etiological agent of African sleeping sickness. Compounds AO-7, AO-12, and EO-20 have demonstrated substantial inhibitory potential against TbMCA-IIa, exhibiting IC_{50} values lower than those previously reported in the literature. Particularly noteworthy is AO-12, which displayed a non-competitive inhibition mechanism, indicating a preference for allosteric interactions with the free enzyme.

Moreover, these findings shed valuable light on the regulation of TbMCA-IIa activity by calcium ions, providing deeper insights into the fundamental interactions crucial for metacaspase activation. The identification and characterization of these compounds mark pivotal milestones in the pursuit of more effective therapies with

fewer adverse effects for trypanosomiasis treatment. This approach holds promise as a therapeutic strategy in a field bereft of viable options, where available treatments often face limitations due to toxicity and undesirable side effects.

Furthermore, this study elucidates the intricacies of metacaspase regulation across different species of trypanosomatids, such as *Trypanosoma cruzi*, underscoring significant distinctions in autoproteolytic processing compared to TbMCA-IIa. This distinction is pivotal in comprehending variations in inhibitor sensitivity and may inform species-specific therapeutic strategies.

Collectively, the findings presented herein provide promising perspectives for the development of novel therapeutic agents targeting metacaspases in trypanosomatids, representing a critical advancement in the battle against neglected diseases associated with these pathogens. Continued research in this domain is imperative to refine the efficacy and safety profiles of these compounds, with the goal of delivering more accessible and efficacious therapeutic solutions to populations affected by these debilitating diseases.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP grant 2022/06394-0 to MFMM, FAPESP grant 2019/ 27813-8 to MFM and FAPESP grant 2021/01503-2 to WASJ. LHA, TRS and MNRT was supported by CAPES scholar fellowship. We would like to acknowledge Prof. Jeremy C. Mottram of The Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology for sending us the TbMCA2 WT and TbMCA2 D189/190A clones.

REFERENCES

[1] D. Vercammen, B. Van De Cotte, G. De Jaeger, D. Eeckhout, P. Casteels, K. Vandepoele, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, D. Inzé, F. Van Breusegem, Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine, Journal of Biological Chemistry (2004). https://doi.org/10.1074/jbc.M406329200.

[2] E.A. Minina, J. Staal, V.E. Alvarez, J.A. Berges, I. Berman-Frank, R. Beyaert, K.D. Bidle, F. Bornancin, M. Casanova, J.J. Cazzulo, C.J. Choi, N.S. Coll, V.M. Dixit, M. Dolinar, N. Fasel, C. Funk, P. Gallois, K. Gevaert, E. Gutierrez-Beltran, S. Hailfinger, M. Klemenčič, E. V. Koonin, D. Krappmann, A. Linusson, M.F.M. Machado, F. Madeo, L.A. Megeney, P.N. Moschou, J.C. Mottram, T. Nyström, H.D. Osiewacz, C.M. Overall, K.C. Pandey, J. Ruland, G.S. Salvesen, Y. Shi, A. Smertenko, S. Stael, J. Ståhlberg, M.F. Suárez, M. Thome, H. Tuominen, F. Van Breusegem, R.A.L. van der Hoorn, A. Vardi, B. Zhivotovsky, E. Lam, P. V. Bozhkov, Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases, Mol Cell (2020). https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.020.

[3] K. McLuskey, J. Rudolf, W.R. Proto, N.W. Isaacs, G.H. Coombs, C.X. Moss, J.C. Mottram, Crystal structure of a Trypanosoma brucei metacaspase, Proc Natl Acad Sci U S A (2012). https://doi.org/10.1073/pnas.1200885109.

[4] C.X. Moss, G.D. Westrop, L. Juliano, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing, FEBS Lett (2007). https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.009.

[5] J.C. Mottram, M.J. Helms, G.H. Coombs, M. Sajid, Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa, Trends Parasitol (2003). https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00038-2.

[6] M.J. Helms, A. Ambit, P. Appleton, L. Tetley, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Bloodstream form Trypanosoma brucei depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes, J Cell Sci (2006). https://doi.org/10.1242/jcs.02809.

[7] W.R. Proto, E. Castanys-Munoz, A. Black, L. Tetley, C.X. Moss, L. Juliano, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Trypanosoma brucei metacaspase 4 is a pseudopeptidase and a virulence factor, Journal of Biological Chemistry (2011). https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292334.

[8] J.M. Gilio, M.F. Marcondes, D. Ferrari, M.A. Juliano, L. Juliano, V. Oliveira, M.F.M. Machado, Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity, Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1865 (2017). https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.002.

[9] R. Prichard, C. Ménez, A. Lespine, Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity, Int J Parasitol Drugs Drug Resist (2012). https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.04.001.

[10] C.M. Coelho, T. Dos Santos, P.G. Freitas, J.B. Nunes, M.J. Marques, C.G.D. Padovani, W.A.S. Júdice, I. Camps, N.J.F. Da Silveira, D.T. Carvalho, M.P. Veloso, Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of novel eugenol esters as leishmanicidal agents, J Braz Chem Soc (2018). https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170192.

[11] I. Cortés, T.S. Kaufman, A.B.J. Bracca, A convenient and eco-friendly cerium(III) chloride-catalysed synthesis of methoxime derivatives of aromatic aldehydes and ketones, R Soc Open Sci (2018). https://doi.org/10.1098/rsos.180279.

[12] J.D.P. Araújo, C.A. Grande, A.E. Rodrigues, Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor, Chemical Engineering Research and Design (2010). https://doi.org/10.1016/j.cherd.2010.01.021.

[13] A.F.M. Cláudio, M.G. Freire, C.S.R. Freire, A.J.D. Silvestre, J.A.P. Coutinho, Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, Sep Purif Technol (2010). https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.07.007.

[14] D. Jadhav, R. B.N., P.R. Gogate, V.K. Rathod, Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction, J Food Eng (2009). https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.007.

[15] B.R. Torres, B. Aliakbarian, P. Torre, P. Perego, J.M. Domínguez, M. Zilli, A. Converti, Vanillin bioproduction from alkaline hydrolyzate of corn cob by Escherichia coli JM109/pBB1, Enzyme Microb Technol (2009). https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.003.

[16] M. Sirajuddin, S. Ali, F.A. Shah, M. Ahmad, M.N. Tahir, Potential bioactive Vanillin-Schiff base di- and tri-organotin(IV) complexes of 4-((3,5-dimethylphenylimino)methyl)-2-methoxyphenol: Synthesis, characterization and biological screenings, Journal of the Iranian Chemical Society (2014). https://doi.org/10.1007/s13738-013-0301-x.

[17] M.F.M. Machado, M.F. Marcondes, M.A. Juliano, K. McLuskey, J.C. Mottram, C.X. Moss, L. Juliano, V. Oliveira, Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2, FEBS Journal 280 (2013). https://doi.org/10.1111/febs.12248.

[18] I.Y. Hirata, M.H. Sedenho Cezari, C.R. Nakaie, P. Boschcov, A.S. Ito, M.A. Juliano, L. Juliano, Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs, Letters in Peptide Science (1995). https://doi.org/10.1007/BF00119771.

[19] E. Schwartz, Tropical Diseases in Travelers, J Travel Med 17 (2010) 432–432. https://doi.org/10.1111/J.1708-8305.2010.00459.X.

[20] M.P. Barrett, R.J.S. Burchmore, A. Stich, J.O. Lazzari, A.C. Frasch, J.J. Cazzulo, S. Krishna, The trypanosomiases, Lancet 362 (2003) 1469–1480. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6.

[21] B.L. Herwaldt, Leishmaniasis, Lancet 354 (1999) 1191–1199. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2.

[22] W.A.S. Judice, L.S. Ferraz, R. de M. Lopes, L. dos S. Vianna, F. da S. Siqueira, J.F. Di Iorio, L. de A.M. Dalzoto, M.N.R. Trujilho, T. dos R. Santos, M.F.M. Machado, T. Rodrigues, Cysteine proteases as potential targets for anti-trypanosomatid drug discovery, Bioorg Med Chem 46 (2021) 116365. https://doi.org/10.1016/J.BMC.2021.116365.

[23] F. Madeo, E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg, K.U. Fröhlich, A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast, Mol Cell (2002). https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00501-4.

[24] B. Pérez, L.A. Bouvier, J.J. Cazzulo, F. Agüero, E. Salas-Sarduy, V.E. Alvarez, Screening and Identification of Metacaspase Inhibitors: Evaluation of Inhibition Mechanism and

Trypanocidal Activity, Antimicrob Agents Chemother 65 (2021). https://doi.org/10.1128/AAC.01330-20.

[25] M. Laverrière, J.J. Cazzulo, V.E. Alvarez, Antagonic activities of Trypanosoma cruzi metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation, Cell Death Differ (2012). https://doi.org/10.1038/cdd.2012.12.

[26] N. Watanabe, E. Lam, Calcium-dependent activation and autolysis of arabidopsis metacaspase 2d, Journal of Biological Chemistry (2011). https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194340.

[27] G. Kosec, V.E. Alvarez, F. Agüero, D. Sánchez, M. Dolinar, B. Turk, V. Turk, J.J. Cazzulo, Metacaspases of Trypanosoma cruzi: Possible candidates for programmed cell death mediators, Mol Biochem Parasitol 145 (2006). https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.001.

[28] Vandana, R. Dixit, R. Tiwari, A. Katyal, K.C. Pandey, Metacaspases: Potential Drug Target Against Protozoan Parasites, Front Pharmacol 10 (2019). https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00790.

Table 1: Inhibitory potential (IC50) values for AO-7, AO-12, and EO-20

COMPOUND	IC_{50} (μM)
AO-7	3.31 ± 0.25
AO-12	2.52 ± 0.19
EO-20	5.23 ± 0.83

Table 2: Binding affinity energy values (Affinity) of AO-7, AO-12, and EO-20 ligands interacting with TbMCA-IIa, number of H-bonds, and other intermolecular interactions established between them.

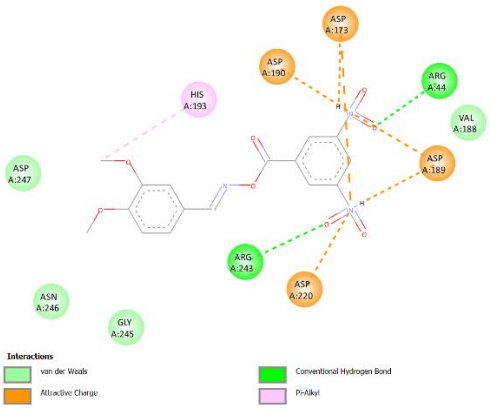
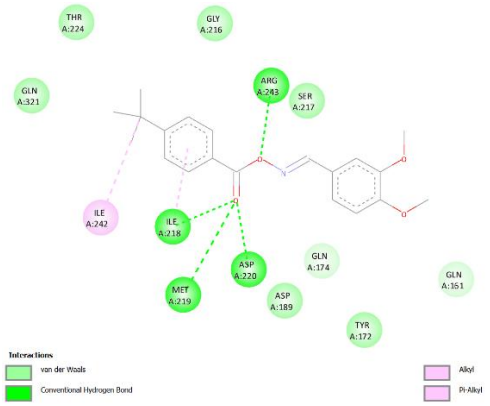
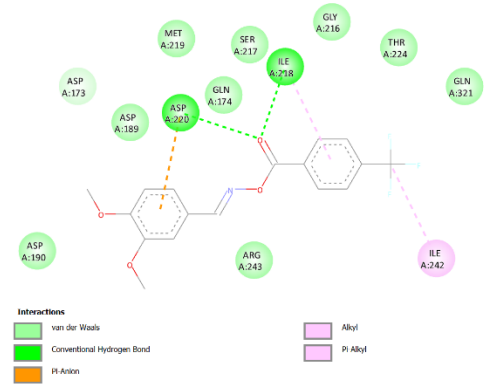
Ligand	Affinity (Kcal.mol^{-1})	H-bonds (number/ residues)	Other intermolecular interactions
AO-7 	-7,0	2/ Arg^{44}; Arg^{243}	Attractive charge Pi-Alkyl van der Waals
AO-12 	-6,3	4/ Ile^{218}; Met^{219}; Asp^{220}; Arg^{243}	Alkyl Pi-Alkyl van der Waals
EO-20 	-6,1	2/ Ile^{218}; Asp^{220}	Pi-Anion Alkyl Pi-Alkyl van der Waals

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Screening of oximic compounds against TbMCA-IIa. Remaining activity of 10 μM of acyl oximes (A) and ether oxime (B) compounds incubated with *Tb*MCA-IIa after 10 minutes of incubation.

Figure 2: Inhibitory kinetics profiles of the AO-7 effect against TbMCA-IIa. (A) Hyperbolic rectangular plot, (B) Lineweaver Burk plot showing mixed inhibition, (C) Slope replot, and (D) Intercept replot.

Figure 3: Inhibitory kinetics profiles of the EO-20 effect against TbMCA-IIa. (A) Hyperbolic rectangular plot, (B) Lineweaver Burk plot showing mixed inhibition, (C) Slope replot, and (D) Intercept replot.

Figure 4: Proposed mechanism of the TbMCA-IIa mixed inhibition. Mixed inhibition mechanism of TB-10 and EO-20 against TbMCA-IIa. The parameter α defines the degree to which inhibitor binding affects the affinity to the enzyme substrate. If $\alpha > 1$, the inhibition mechanism is mixed. Non-competitive inhibition mechanism of AO-12 against *Tb*MCA-IIa. The parameter α defines the degree to which inhibitor binding affects the affinity to the enzyme substrate. If $\alpha = 1$, the inhibition is non-competitive.

Figure 5: Inhibitory kinetics profiles of the AO-12 effect against TbMCA-IIa. (A) Hyperbolic rectangular plot, (B) Lineweaver Burk plot showing non-competitive inhibition, (C) Slope replot, and (D) Intercept replot.

Figure 6: AO-12 effects on the TbMCA-IIa structure. (A) effect of AO-12 on the structure of *Tb*MCA-IIa WT, where (•) without compound, (0) with 2 μM of AO-12 and (•) with 10 μM of AO-12; (B) effect of AO-12 on the structure of TbMCA2 D189/190A, where (•) without compound, (0) with 2 μM of AO-12 and (•) with 10 μM of AO-12 and (C) Evident based on changes in the maximum fluorescence intensity at an emission wavelength of 330 nm upon increased AO-12 concentration.

Figure 7: Molecular docking of AO-12 against TbMCA-IIa. (A) 3D representation of the AO-12 proximity to the TbMCA-IIa calcium-binding site, comprised by Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190}, and Asp^{220} amino acid residues, (B) 3D representation of the amino acid residues involved in the four H-bonds established with AO-12.

Figure 1

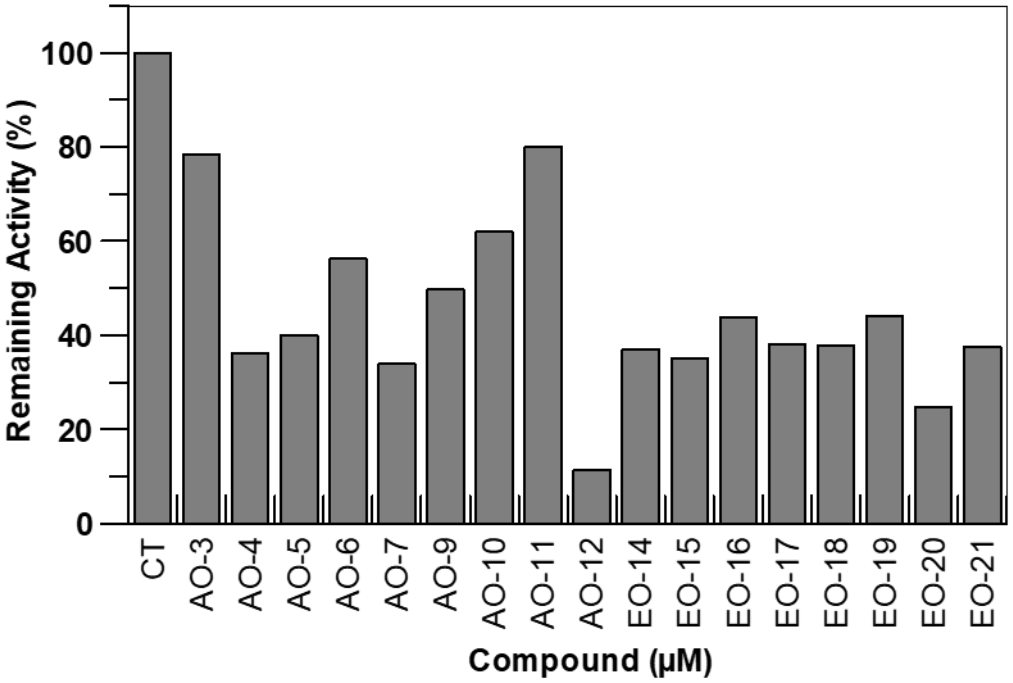

Remaining Activity (%)
100
80
60
40
20
0
CT
AO-3
AO-4
AO-5
AO-6
AO-7
AO-9
AO-10
AO-11
AO-12
EO-14
EO-15
EO-16
EO-17
EO-18
EO-19
EO-20
EO-21
Compound (μM)

Figure 2

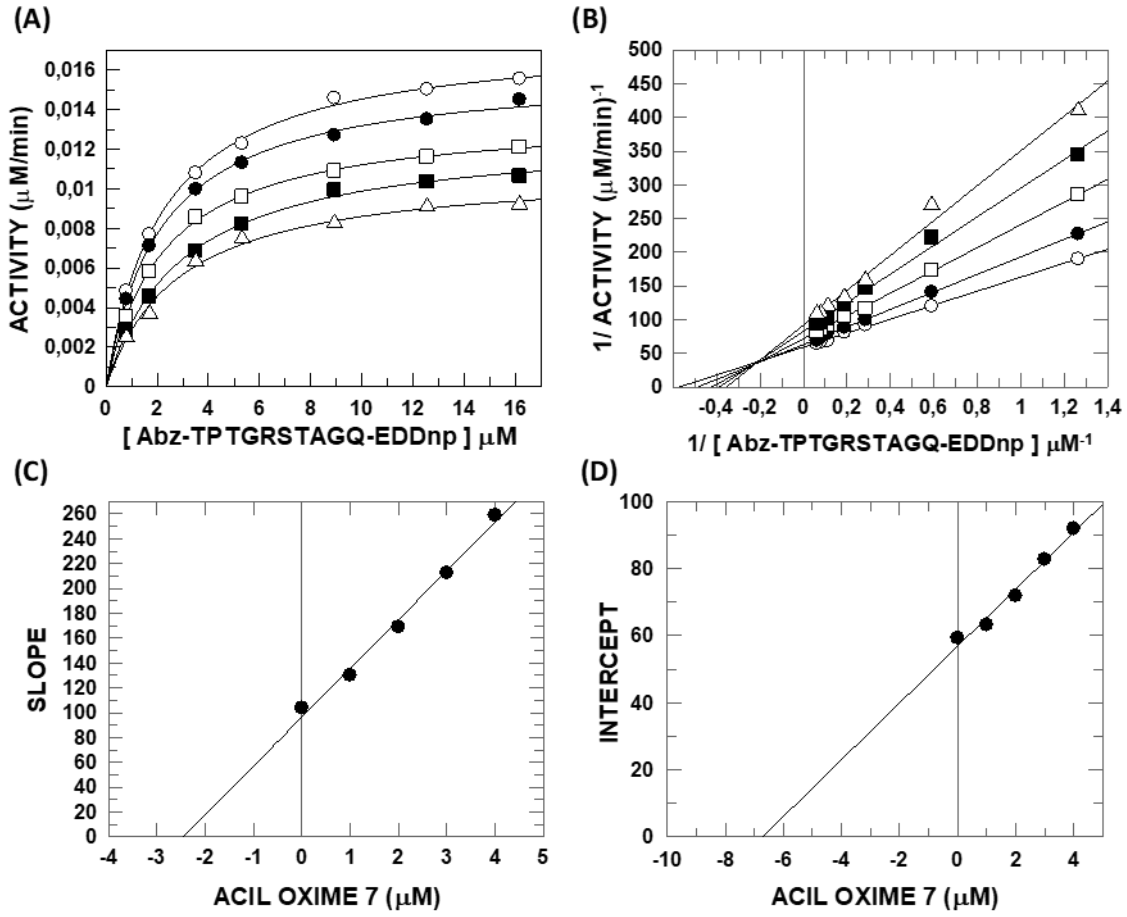

(A)
ACTIVITY (μM/min)
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] μM
(B)
1/ ACTIVITY (μM/min)-1
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-0,4 -0,2 0 0,2 0,4 0,6 0,8 1 1,2 1,4
1/ [Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] μM-1
(C)
SLOPE
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5
ACIL OXIME 7 (μM)
(D)
INTERCEPT
100
80
60
40
20
0
-10 -8 -6 -4 -2 0 2 4
ACIL OXIME 7 (μM)

Figure 3

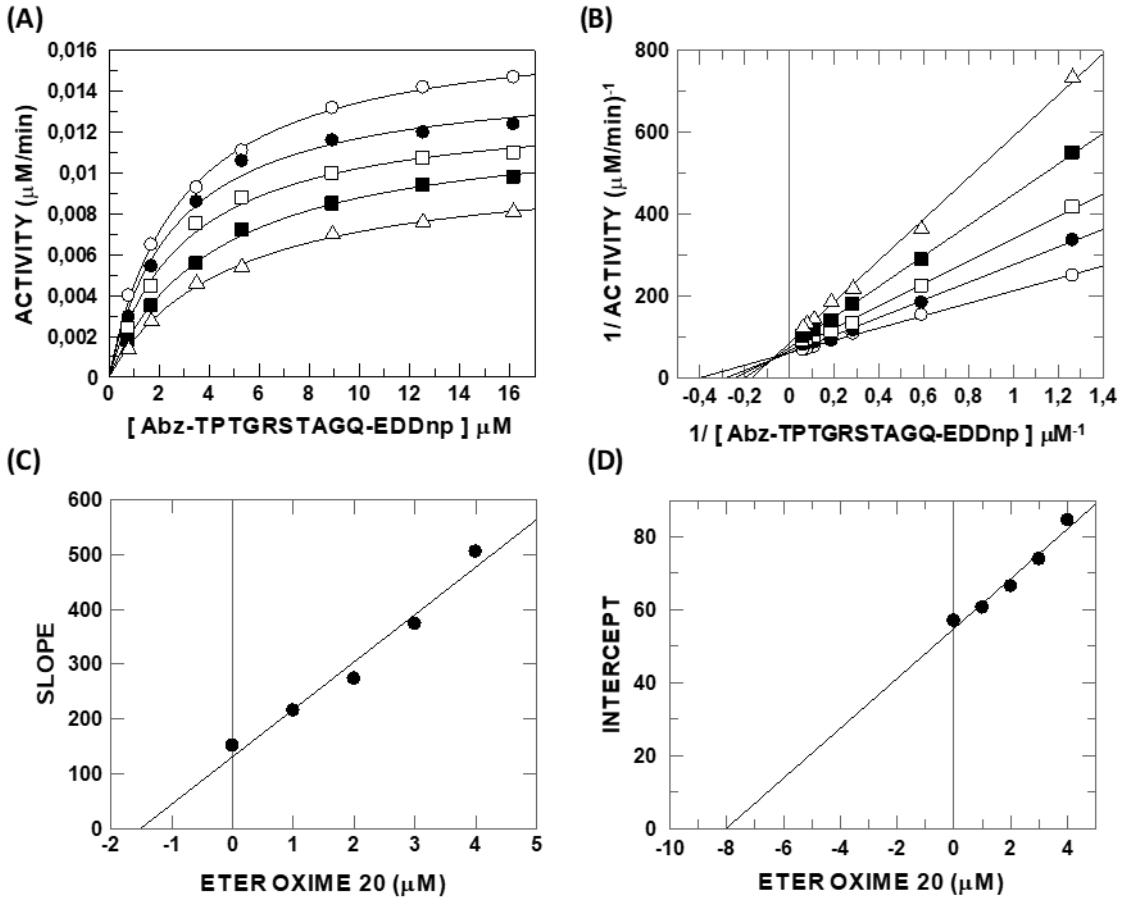

(A)
ACTIVITY (μM/min)
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] μM
(B)
1/ ACTIVITY (μM/min)-1
800
600
400
200
0
-0,4 -0,2 0 0,2 0,4 0,6 0,8 1 1,2 1,4
1/ [Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] μM-1
(C)
SLOPE
600
500
400
300
200
100
0
-2 -1 0 1 2 3 4 5
ETER OXIME 20 (μM)
(D)
INTERCEPT
80
60
40
20
0
-10 -8 -6 -4 -2 0 2 4
ETER OXIME 20 (μM)

Figure 4

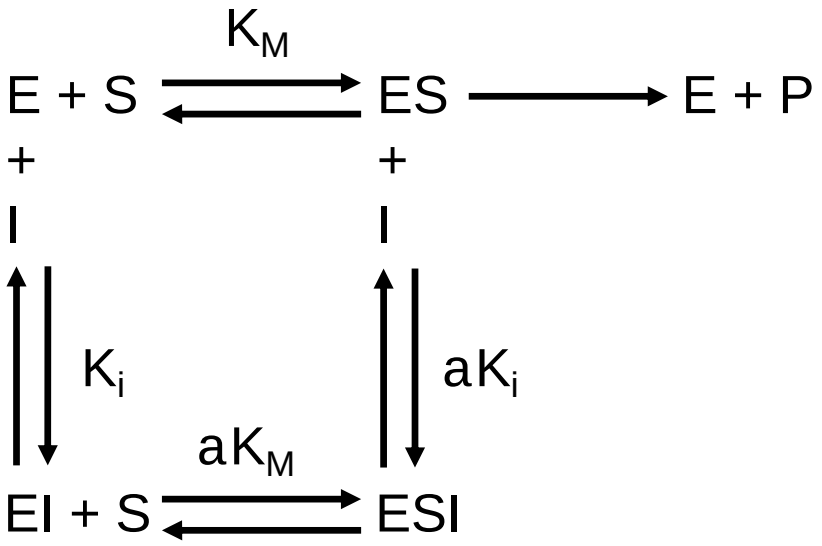


Figure 5

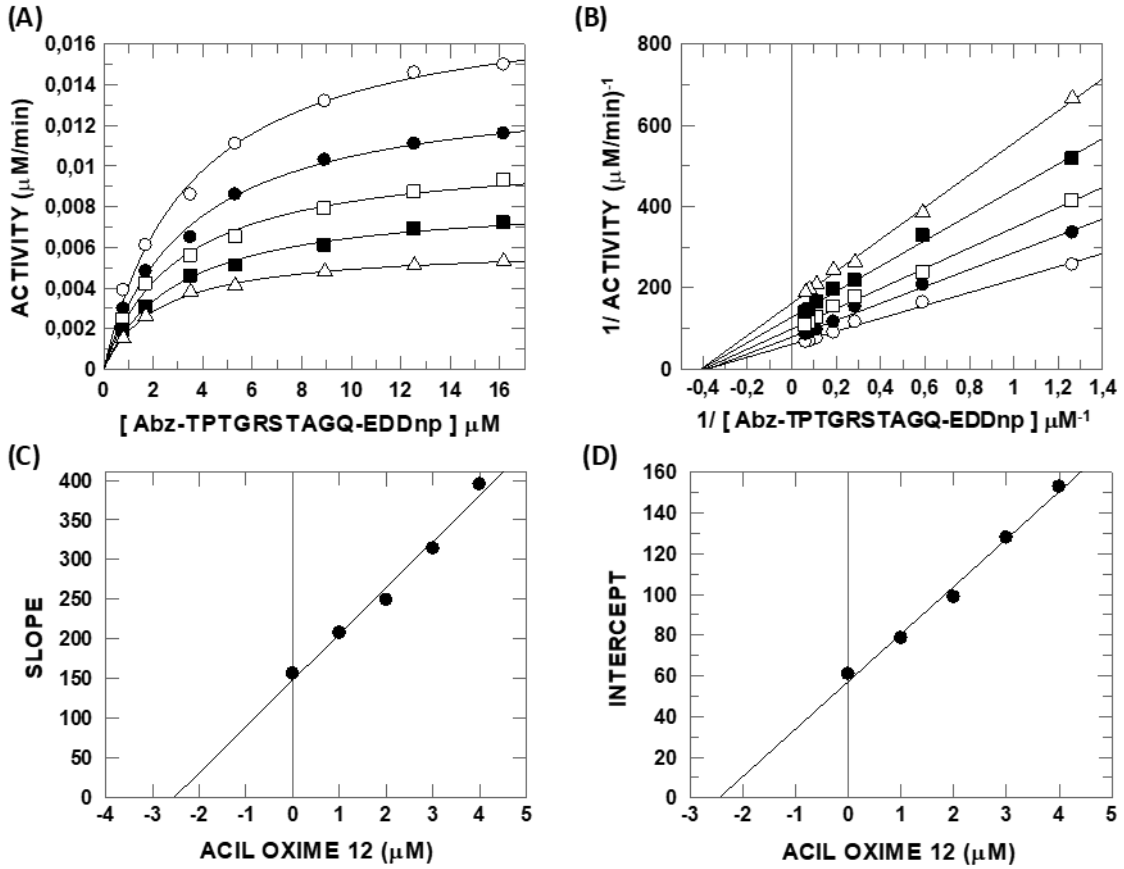

(A)
ACTIVITY (μM/min)
[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] μM
(B)
1/ ACTIVITY (μM/min)-1
1/ [Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] μM-1
(C)
SLOPE
ACIL OXIME 12 (μM)
(D)
INTERCEPT
ACIL OXIME 12 (μM)

Figure 6

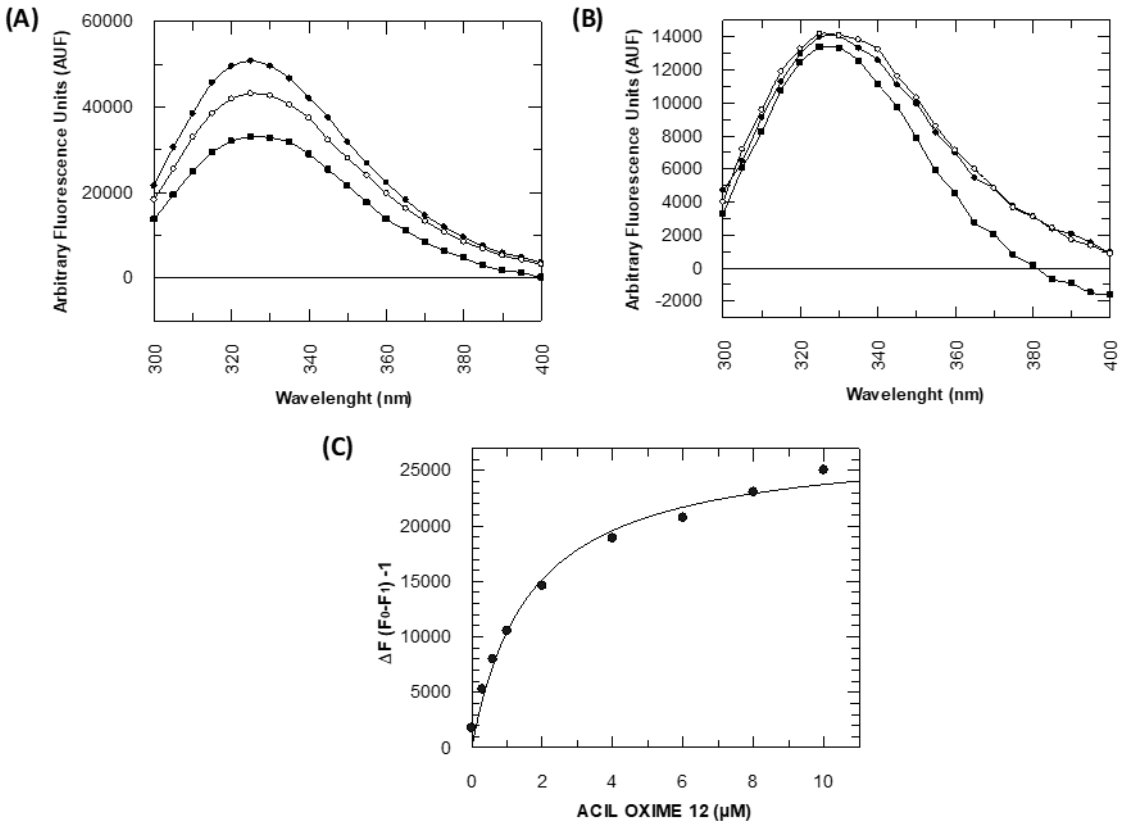
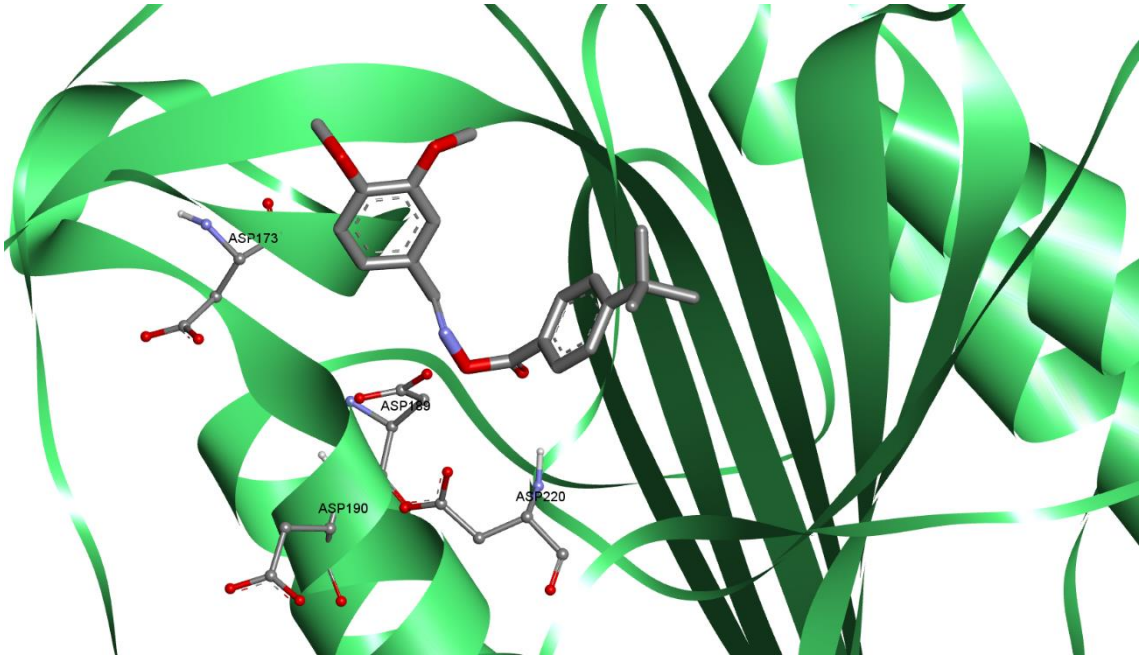
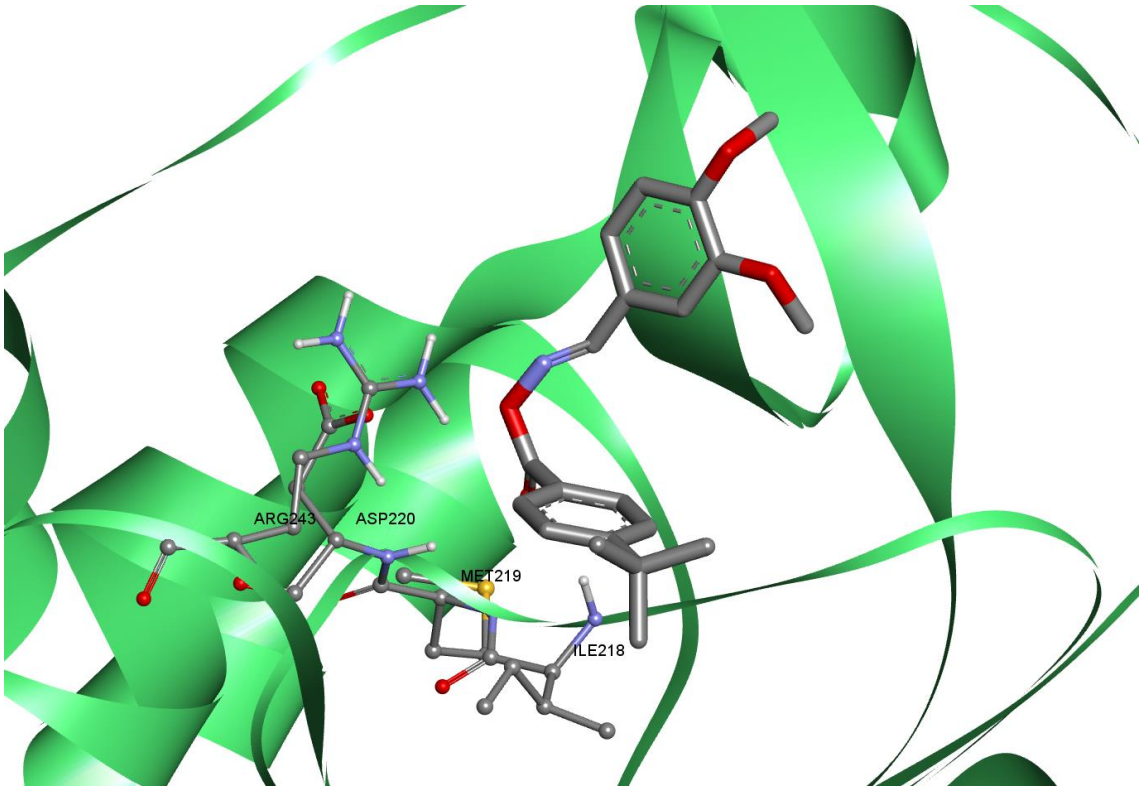

(A)
Arbitrary Fluorescence Units (AUF)
60000
40000
20000
0
300
320
340
360
380
400
Wavelenght (nm)
(B)
Arbitrary Fluorescence Units (AUF)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
300
320
340
360
380
400
Wavelenght (nm)
(C)
ΔF (F0-F1) -1
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
ACIL OXIME 12 (μM)

Figure 7

(A)



(B)



CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2: COMPOSTOS DERIVADOS DE CHALCONAS E FLAVONOIDES COMO AGENTES MODULADORES DA METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa)

Laura Helena Araujo[1], Marcelo Ferreira Marcondes[2], Maria Aparecida Juliano[2], Wagner Alves de Souza Júdice[1], Denis Pires de Lima[3], and Maurício Ferreira Marcondes Machado[1,*].

[1]Centro Interdisciplinar de Pesquisa Bioquímica, Universidade de Mogi das Cruzes, Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brasil.

[2]Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669, 7º andar, 04039-032, São Paulo, Brasil.

[3]Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Av. Filinto Müller, 1555, 79074460 - Campo Grande, MS - Brasil

***Autor correspondente:**
Maurício Ferreira Marcondes Machado, Ph.D.
E-mail: mauriciomachado@umc.br
Centro Interdisciplinar de Pesquisa Bioquímica
Universidade de Mogi das Cruzes
Av Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200 - 08780-991 - Mogi das Cruzes, Brasil.

Contribuições do autor:
LHA - experimentos cinéticos e testes inibitórios de compostos oxímicos em TbMCA-IIa.
MFM - expressão e purificação de TbMCA-IIa.
DPL – síntese de compostos oxímicos e docagem molecular.
WASJ – cálculos referentes ao mecanismo de inibição dos compostos oxímicos.

RESUMO

A Tripanossomíase Humana Africana (THA) é uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Trypanosoma.* Sua terapia medicamentosa continua sendo um grande desafio devido à eficácia limitada, complexidade da doença, potenciais efeitos colaterais e inacessibilidade, se fazendo necessário desenvolver novas abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras para o tratamento da enfermidade. Compostos naturais têm despertado interesse na pesquisa científica, uma vez que representam uma fonte em potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e diversas aplicações farmacêuticas, como no caso das chalconas e flavonoides, que já demonstraram atividade antitripanosomatídica. No presente trabalho foram estudados 9 compostos, sendo 6 derivados de chalconas e 3 pertencentes à classe dos flavonoides, com o intuito identificar moduladores da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*. Para tanto, realizou-se a triagem de todas essas moléculas nas concentrações de 1 e 6 µM e, posteriormente, foi determinado o potencial inibitório de cada uma delas. Os resultados indicaram que a capacidade de inibição ficou na faixa de 2,2 e 7,6 µM, com destaque para os compostos EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C, por apresentarem os menores valores de IC_{50} (EM-1A = 2,14 ± 0,07 µM, EM-1B = 3,09 ± 0,09 µM, EM-1C = 3,02 ± 0,09 µM e EM-F12C = 2,52 ± 0,13 µM). Assim sendo, foram determinados os mecanismos de inibição dessas 4 moléculas, das quais 3 delas exibiram um perfil de inibição do tipo competitivo (EM-1A, EM-1C e EM-F12C), e uma apresentou um mecanismo característico de inibição não-competitivo linear simples (EM-1B). Tendo em vista os resultados apresentados neste estudo, verifica-se que as moléculas derivadas de chalconas e flavonoides são candidatas promissoras no tratamento da Tripanossomíase Humana Africana, uma vez que essas moléculas apresentaram resultados satisfatórios de inibição da atividade da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* em escala micromolar, sendo fundamental conduzir investigações mais abrangentes a fim de avaliar tanto a eficácia quanto a segurança desses compostos.

Palavras-chave: chalconas; flavonoideS; metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*; mecanismo de inibição.

ABSTRACT

African Human Trypanosomiasis (AHT) is a parasitic disease caused by the protozoan of the genus Trypanosoma. Its drug therapy remains a major challenge due to limited efficacy, disease complexity, potential side effects, and inaccessibility, necessitating the development of more effective and safer therapeutic approaches for treating the disease. Natural compounds have garnered interest in scientific research as they represent a potential source for developing new drugs and various pharmaceutical applications, such as chalcones and flavonoids, which have demonstrated anti-trypanosomal activity. In the present study, 9 compounds were evaluated, including 6 chalcone derivatives and 3 flavonoids, aiming to identify modulators of Trypanosoma brucei metacaspase-2. Screening of these molecules was performed at concentrations of 1 and 6 µM, followed by determination of their inhibitory potential. The results indicated inhibition capacity ranging from 2.2 to 7.6 µM, with notable IC50 values observed for compounds EM-1A, EM-1B, EM-1C, and EM-F12C (EM-1A = 2.14 ± 0.07 µM, EM-1B = 3.09 ± 0.09 µM, EM-1C = 3.02 ± 0.09 µM, and EM-F12C = 2.52 ± 0.13 µM). Mechanisms of inhibition were determined for these 4 molecules, revealing that 3 exhibited competitive inhibition profiles (EM-1A, EM-1C, and EM-F12C), while one showed a characteristic mechanism of non-competitive linear simple inhibition (EM-1B). Based on the findings of this study, chalcone and flavonoid derivatives are promising candidates for African Human Trypanosomiasis treatment, showing satisfactory inhibition of Trypanosoma brucei metacaspase-2 activity at micromolar scale. Further comprehensive investigations are crucial to assess both the efficacy and safety of these compounds..

Keywords: chalcones; flavonoids; *Trypanosoma brucei* metacaspase-2; inhibition mechanism.

1 INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase Humana Africana (THA), também conhecida como doença do sono, é uma enfermidade tropical negligenciada presente em 36 países da África Subsariana, causada por subespécies do protozoário parasita *Trypanosoma brucei* e transmitida pela picada da mosca tsé-tsé [1]. A doença progride para os estágios hemolinfático e meningoencefálico, sendo este último caracterizado por uma infecção do sistema nervoso central após a passagem do parasita pela barreira hematoencefálica. Isso resulta em uma neuroinflamação intensa e, sem tratamento, esse estágio é fatal. Porém, os medicamentos disponíveis são tóxicos e apresentam complexidades na administração [2], o que evidencia a necessidade de se realizar investigações para o desenvolvimento de novos fármacos que não sejam apenas eficientes, mas também isentos de riscos [3].

A família das chalconas, metabólitos intermediários de flavonoides e isoflavonoides, destaca-se como um extenso grupo de produtos naturais bioativos, apresentando propriedades anticancerígenas, antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antiparasitárias [4]. A pesquisa tem se concentrado tanto nas abordagens sintéticas e biossintéticas quanto nas amplas atividades biológicas dessas substâncias. Quimicamente, as chalconas são estruturadas como 1,3-diaril-2-propen-1-ona, na qual os dois anéis aromáticos são conectados por um sistema carbonil de três carbonos α,β-insaturados [5], o que permite a síntese de diversos derivados. Estudos indicam que análogos sintéticos dessas moléculas podem apresentar atividades semelhantes ou até melhores do que seus homólogos naturais, com potencial aplicação terapêutica em diversas doenças [4].

Já os flavonoides, subclasse de flavonoides naturais, são amplamente distribuídos em frutas, ervas, caules, cereais, nozes, vegetais, flores e sementes [6]. Com propriedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatórias e antivirais, esses compostos fitoquímicos são considerados metabólitos secundários e apresentam uma variedade de estruturas químicas que consistem principalmente em um anel de benzopirona contendo grupos fenólicos ou polifenólicos em diferentes posições, sendo classificados em diversos tipos dependendo de sua estrutura química, grau de insaturação e oxidação do anel de carbono [7]. Os flavonoides são valiosos por serem amplamente distribuídos na natureza, sendo alvo de pesquisas

devido à sua eficácia comprovada para uma variedade de doenças, incluindo atividade antitripanosomatídica [8].

As proteases parasitárias representam um vasto e diversificado grupo de enzimas que oferecem grande potencial para atuarem como alvos terapêuticos para o desenvolvimento de medicamentos. Nos últimos anos, foram conduzidas diversas pesquisas acerca das metacaspases (MCAs), que são cisteíno proteases pertencentes ao clã CD, possuem uma díade catalítica His-Cys e realizam a hidrólise de ligações peptídicas após resíduos básicos localizados na posição P_1 do substrato, estando presentes em plantas, fungos e protozoários [9-10]. Dentre as metacaspases mais estudadas, destacam-se aquelas encontradas nos tripanosomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas na América do Sul, e o *Trypanosoma brucei*, causador da Doença do Sono Africana [11].

No genoma do *Trypanosoma brucei* são codificados 5 tipos de metacaspases que se diferenciam quanto à atividade catalítica, sendo a TbMCA-IIa uma das variantes enzimaticamente ativa que desempenha um papel importante na regulação de eventos de autoprocessamento e ativação celular [12]. Essa metacaspase específica é dependente de íons de cálcio para iniciar os processos de clivagem [13], uma vez que, por meio de análise cristalográfica [14], foi possível visualizar um sítio de ligação de cálcio que se mostra fundamental para a atividade funcional da TbMCA-IIa [12-14].

Considerando estudos promissores documentados na literatura sobre as chalconas e flavonoides, especialmente no contexto da ação antiparasitária, o presente trabalho teve como objetivo avaliar compostos derivados dessas duas classes de moléculas para identificar potenciais moduladores da atividade da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*.

2 RESULTADOS

2.1 TRIAGEM DE COMPOSTOS

Por meio do plote dos valores encontrados de atividade controle e remanescente da TbMCA-IIa com relação às 9 moléculas derivadas de chalconas e flavonoides testadas (**Tabela 1**), todas inibiram a atividade da metacaspase, conforme apresentado na **Figura 1**, sendo possível visualizar um decaimento de atividade mais significativo nos dados referentes à concentração de 6 µM.

Dos seis compostos da classe das chalconas (EM-1A, EM-1B, EM-1C, EM-2A, EM-2B e EM-2C), a molécula EM-2B mostrou a maior diminuição na atividade da TbMCA-IIa quando testada na concentração de 1 µM, com uma redução de 17,4%. Já na concentração de 6 µM, o composto EM-1A foi o mais eficaz, reduzindo a atividade enzimática em 87%, o que corresponde a uma atividade remanescente de 13%.

Já as moléculas derivadas de flavonoides (EM-F12A, EM-F12B e EM-F12C) resultaram em uma porcentagem de atividade remanescente variando de 74-87% na concentração de 1 µM e de 24% a 58% na concentração de 6 µM. Isso representa uma redução de atividade de 13% a 26% para 1 µM e de 42% a 76% para 6 µM, com destaque para o composto EM-F12C, que proporcionou a maior redução de atividade da TbMCA-IIa (76%), estando a remenescente em torno de 24%.

2.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO (IC_{50})

Tendo em vista que todos os compostos inibiram a atividade da TbMCA-IIa, as 9 moléculas foram submetidas a ensaios de inibição para avaliar a capacidade inibitória de cada uma delas.

Para tanto, a enzima foi incubada pelo período de 10 min a 25ºC, e acrescido, posteriormente, concentrações crescentes de composto. A avaliação da atividade foi verificada por meio do espectrofluorímetro HITACHI F-2700 (Hitachi, Tokyo, Japan).

Após a realização dos ensaios de inibição, os valores de IC_{50} encontrados para todas as moléculas testadas ficou na faixa de 2,14 e 7,55 µM, conforme **Tabela 2**, sendo que o composto EM-1A apresentou a menor concentração para uma redução de 50% na atividade da TbMCA-IIa, com 2,14 µM, e, em contrapartida, para a molécula EM-F12B, esta redução só foi verificada com uma concentração igual a 7,55 µM, apresentando o maior valor de IC_{50}.

Com relação aos compostos derivados de chalconas, a molécula que apresentou melhor potencial inibitório foi a EM-1A, com IC_{50} igual a 2,14 ± 0,07 µM, seguido da EM-1C, com 3,02 ± 0,09 µM, EM-1B (3,09 ± 0,09 µM), EM-2A (3,54 ± 0,19 µM), EM-2C (3,81 ± 0,13) e EM-2B (4,06 ± 0,10 µM).

Já no que diz respeito aos derivados de flavonoides, o composto com a maior capacidade inibitória foi o EM-F12C, exibindo um valor de IC_{50} igual a 2,52 ± 0,13 µM,

e o menor potencial inibitório foi verificado na molécula EM-F12B, com 7,55 ± 0,41 µM.

2.3 MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA TbMCA-IIa PELAS MOLÉCULAS DERIVADAS DA CLASSE DAS CHALCONAS E DOS FLAVONOIDES

Subsequente aos ensaios de inibição, três moléculas derivadas de chalconas (EM-1A, EM-1B, EM-1C) e uma derivada da classe dos flavonoides (EM-F12C) foram selecionadas para o estudo do mecanismo de inibição, juntamente com a determinação dos parâmetros cinéticos K_i e αK_i.

Após a realização das cinéticas micaelianas, tanto na presença quanto na ausência do composto, o plote da linearização, e os replotes de inclinação e intercepto, foi analisado o perfil inibitório de cada uma delas.

A molécula EM-1A (**Figura 2**) apresentou um mecanismo de inibição do tipo competitivo, com um valor de K_i de 1,27 ± 0,06 µM. Isso significa que, ao aumentar a concentração do inibidor, o valor aparente da constante de Michaelis-Menten (K_m) aumenta, indicando competição direta com o substrato pelo mesmo sítio ativo na enzima. Esse tipo de inibição não afeta o parâmetro $V_{máx}$, conforme indicado pela intersecção das retas no eixo Y na linearização do duplo-recíproco.

Já a molécula EM-1B mostrou um padrão de inibição não competitivo linear simples, com valores de K_i e αK_i iguais a 2,69 ± 0,56 µM e 2,55 ± 0,36 µM, respectivamente. Esse tipo de inibição afeta principalmente o parâmetro $V_{máx}$, como ilustrado na curva de Michaelis-Menten (**Figura 3A**) e confirmado pela convergência das retas no eixo X no gráfico de duplo-recíproco (**Figura 3B**), usando a equação da reta (y = ax + b). A análise de Inclinação (**Figura 3C**) e Intercepto (**Figura 3D**) permitiu calcular os parâmetros K_i e αK_i. A razão $K_i/\alpha K_i$ igual a 1,0 indica que o mecanismo de inibição é não competitivo linear simples, sugerindo que o inibidor pode se ligar a um sítio alostérico da enzima, não competindo diretamente com o substrato pelo sítio ativo.

Os compostos EM-1C (**Figura 4**) e EM-F12C (**Figura 5**) mostraram inibição competitiva semelhante ao EM-1A. Os valores de K_i foram 1,56 ± 0,07 µM para EM-1C e 0,74 ± 0,18 µM para EM-F12C. Esses inibidores não afetam o parâmetro $V_{máx}$, conforme evidenciado pela convergência das retas no eixo Y no gráfico de duplo-recíproco, onde foi possível determinar o valor de K_i. Isso indica que tanto EM-1C

quanto EM-F12C competem diretamente com o substrato pelo mesmo sítio ativo da enzima TbMCA-IIa.

Os perfis reacionais de inibição competitiva dos compostos EM-1A, EM-1C e EM-F12C e inibição não competitiva linear simples referente a molécula EM-1B estão apresentados, respectivamente, nas **Figuras 6 e 7**. A **Tabela 3** sumariza os resultados dos mecanismos encontrados para todos os 4 inibidores testados, bem como as estruturas de cada composto avaliado.

3 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a triagem dos 9 compostos derivados das chalconas e flavonoides demonstrou que todas as moléculas de ambas as classes conseguiram reduzir a atividade da TbMCA-IIa com baixas concentrações, sendo que dentre esses 9 compostos, 3 pertencentes à classe das chalconas (EM-1A, EM-1B e EM-1C) e um pertencente aos flavonoides (EM-F12C) se destacaram por apresentarem maior eficácia de inibição, chegando ao patamar de redução de até 87% da atividade enzimática na concentração de 6 µM.

Os testes de potencial inibitório realizado para as 9 moléculas avaliadas revelaram valores de IC_{50} variando entre 2,14 e 7,55 µM. Dentre elas, 4 reduziram a atividade da TbMCA-IIa pela metade, com destaque para os compostos EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C que apresentaram valores de IC_{50} iguais a 2,14 ± 0,07 µM, 3,09 ± 0,09 µM, 3,02 ± 0,09 µM e 2,52 ± 0,13, respectivamente. Dessas moléculas, três são derivadas de chalconas e uma é pertencente a classe dos flavonoides.

Destaca-se que, ao analisar a estrutura química, a introdução do elemento cloro no carbono 3' dos compostos derivados das chalconas (EM-1A, EM-1B e EM-1C) resultou em um aumento significativo no potencial de inibição da atividade enzimática, uma vez que essas moléculas apresentaram os menores valores de IC_{50} encontrados nessa classe em questão, indicando um impacto positivo na eficácia inibitória.

A literatura já registrou testes conduzidos nas cisteíno proteases de *Leishmania mexicana* (rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y) utilizando os mesmos compostos avaliados no presente trabalho. No trabalho de Lourenço *et al*., as moléculas que se destacaram com bons potenciais inibitórios contra essas enzimas foram EM-F12A e EM-F12B, ambas derivadas de flavonoides, com valores de potencial inibitório de 3,85 µM e 5,23 µM, respectivamente [15]. Ao comparar esses resultados com os obtidos para a inibição da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*, observa-se que os valores foram

ainda menores do que os encontrados por Lourenço *et al*., uma vez que o menor IC_{50} para a TbMCA-IIa foi de 2,14 µM, em comparação com 3,85 µM obtido para as cisteíno proteases de *Leishmania mexicana*. Além disso, a capacidade inibitória do composto EM-F12B contra a TbMCA-IIa foi ligeiramente superior ao teste nas cisteíno proteases de *Leishmania mexicana*, visto que o IC_{50} foi de 4,45 contra 5,23 µM [15].

No contexto dos tripanossomatídeos, a literatura apresenta testes conduzidos no *Trypanosoma brucei brucei*, nos quais foram utilizadas bibliotecas de chalconas baseadas em indanona. Os experimentos realizados por Betteck *et al*. revelaram valores de IC_{50} situados entre 0,5 e 8,9 µM. Essa faixa de IC_{50} é semelhante à encontrada nos testes realizados neste estudo, indicando que a classe das chalconas possui potencial para inibir os tripanossomas em concentrações relativamente baixas de compostos.

Dentre os quatro compostos selecionados para se determinar o mecanismo de inibição (EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C), observou-se que as moléculas EM-1A, EM-1C e EM-F12C exibiram um perfil semelhante de inibição competitiva, e o EM-1B apresentou um mecanismo de caráter não competitivo linear simples.

No caso do mecanismo competitivo, o inibidor tende a competir com o substrato pelo sítio ativo da enzima, resultando na obtenção do valor de K_i. Entre as três moléculas testadas que seguem esse mecanismo, os valores de afinidade foram: 1,27 ± 0,06 µM para EM-1A, 1,56 ± 0,07 µM para EM-1C, e 0,74 ± 0,18 µM para EM-F12C. Esses resultados indicam que EM-F12C possui o menor K_i, seguido por EM-1A e depois EM-1C, sugerindo que o inibidor derivado dos flavonoides possui maior afinidade pelo sítio ativo da enzima em comparação com os inibidores da classe das chalconas.

No que diz respeito ao composto EM-1B, em virtude dos parâmetros K_i e αK_i apresentarem valores iguais a 2,69 ± 0,56 µM e 2,55 ± 0,36 µM, respectivamente, e a razão desses dados ser equivalente a uma unidade, é possível verificar que o mecanismo de atuação dessa molécula para inibição da TbMCA-IIa é categorizado como não competitivo linear simples, o que demonstra uma preferência equivalente de ligação com a enzima livre e/ou com o complexo enzima-substrato.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo demonstrou que os compostos derivados de chalconas e flavonoides foram eficazes na inibição da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* em baixas concentrações.

No processo de triagem das 9 moléculas testadas, as chalconas apresentaram maior efetividade na redução da atividade enzimática em concentração de 6 µM, se comparado com os compostos pertencentes a classe dos flavonoides na mesma concentração, visto que a atividade remanescente gerada pelo composto EM-1A derivado das chalconas foi em torno de 13% contra 24% para a molécula derivada dos flavonoides (EM-F12C).

A capacidade de inibição dos compostos testados foi satisfatória em ambas as classes, estando o potencial inibitório na faixa de 2,14 – 7,55 µM, com destaque para as moléculas EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C, por apresentarem os valores de IC_{50} mais baixos.

Acerca dos mecanismos inibitórios, três compostos exibiram um perfil competitivo de inibição (EM-1A, EM-1C e EM-F12C), o qual o inibidor tende a competir com o substrato na ligação do sitio ativo da enzima, e um deles (EM-1B) apresentou um perfil característico de inibição não competitiva linear simples, com valores semelhantes de K_i e αK_i, demonstrando preferência equivalente de ligação dessa molécula com a enzima livre e/ou com o complexo enzima-substrato.

Como perspectivas futuras, serão realizadas modelagens moleculares com o intuito de avaliar, por meio de simulações computacionais, as interações intermoleculares existentes entre os compostos derivados de chalconas e flavonoides e a TbMCA-IIa.

5 METODOLOGIA

5.1 TRIAGEM DE COMPOSTOS

A triagem foi realizada com 9 compostos, sendo 6 deles pertencentes a classe das chalconas e 3 derivados da classe dos flavonoides.

Inicialmente a TbMCA-IIa foi incubada durante 5 min em 1 mL de tampão Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 contendo $CaCl_2$ 1mM e DTT 2,5 mM, no espectrofluorímetro Hitachi F-2700, configurado em λ_{ex} = 320 nm e λ_{em} = 420 nm, fenda de excitação e emissão 5 e 5 nm (700V) respectivamente. Logo após, a

atividade controle foi mensurada por meio da adição de 10 µM do substrato FRET Abz- KARSSAQ-EDDnp, realizando a leitura no tempo de 300s.

O mesmo procedimento foi seguido para a análise da atividade de cada um dos 9 compostos, realizando leituras nas concentrações 1 µM e 6 µM, estas adicionados junto ao tempo de incubação com a enzima.

Os dados obtidos foram plotados no gráfico de barras utilizando o programa Grafit 5.0 (Erithacus, UK), sendo a atividade remanescente posteriormente analisada em comparativo com a atividade da TbMCA-IIa sem a influência dos compostos (controle).

5.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO

Para a análise do potencial inibitório das moléculas derivadas de chalconas e flavonoides, a TbMCA-IIa foi previamente incubada em volume final de 1 mL de tampão Tris 50 mM, NaCl 100 mM - pH 7,4 contendo $CaCl_2$ 1 mM, DTT 2,5 mM, durante 5 min a 25ºC, sob agitação constante, em cubeta de quartzo. Posteriormente foram adicionadas concentrações crescentes dos compostos.

A redução da atividade enzimática foi mensurada com o auxílio do espectrofluorímetro HITACHI F-2700 (Hitachi, Tokyo, Japan), configurado nos comprimentos de onda de excitação e emissão 320 e 420 nm, respectivamente, e fenda de excitação e emissão 5 e 5 nm (700 V), utilizando o substrato FRET Abz-KARSSAQ-EDDnp.

O cálculo do IC_{50} foi executado mediante regressão não linear, sendo o plote realizado por meio do programa Grafit 5.0 (Erithacus, UK), empregando a equação [$y = Range/1+ (x/IC_{50})^s$].

5.3 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS INIBITÓRIOS

Estudos referentes aos mecanismos de inibição das moléculas que apresentaram melhor valor de IC_{50} frente a TbMCA-IIa foram realizados através de cinéticas micaelianas, na ausência (curva controle) e na presença dos compostos, em suas concentrações 1, 2, 3 e 4 µM.

Para tanto, a TbMCA-IIa foi incubada com o composto durante 10 min em volume final de 1 mL de tampão Tris 50 mM, NaCl 100 mM - pH 7,4 contendo $CaCl_2$

1 mM, DTT 2,5 mM. Em seguida, concentrações crescentes do substrato FRET Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp foram adicionadas a cada 5 min. O espectrofluorímetro HITACHI F-2700 (Hitachi, Tokyo, Japan) foi ajustado para valores de comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 e 420 nm, respectivamente, e fenda de excitação e emissão 5 e 5 nm (700 V).

Os dados encontrados foram tratados utilizando o programa Grafit 5.0 (Erithacus, UK) e linearizados mediante plote do duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) pelo inverso tanto da atividade encontrada quanto da concentração do substrato. Já para determinar os parâmetros de K_i e αK_i foram utilizados os replotes de Inclinação *versus* [inibidor] e Intercepto *versus* [inibidor], respectivamente.

REFERENCIAS

1 Gao J-M, Qian Z-Y, Hide G, Lai, D-H, Lun Z-R, Wu Z-D (2020). Human African trypanosomiasis: the current situation in endemic regions and the risks for non-endemic regions from imported cases. Parasitology 147,922–931. https://doi.org/10.1017/S0031182020000645

2 Lejon V, Bentivoglio M, Franco JR. Human African trypanosomiasis. Handb Clin Neurol. 2013;114:169-81. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00011-X. PMID: 23829907.

3 Alkhaldi, A.A.M. Effects of Synthetic Ligustrazine-Based Chalcone Derivatives on Trypanosoma brucei brucei and Leishmania spp. Promastigotes. Molecules 2023, 28, 4652. https://doi.org/10.3390/molecules28124652.

4 Jasim, H.A.; Nahar, L.; Jasim, M.A.; Moore, S.A.; Ritchie, K.J.; Sarker, S.D. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Lea https://doi.org/10.3390/biom110812036

5 Sakagami H, Masuda Y, Tomomura M, Yokose S, Uesawa Y, Ikezoe N, Asahara D, Takao K, Kanamoto T, Terakubo S, Kagaya H, Nakashima H, Sugita Y. Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of Chalcones. Anticancer Res. 2017 Mar;37(3):1091-1098. doi: 10.21873/anticanres.11421. PMID: 28314269.

6 Gervasi, T.; Calderaro, A.; Barreca, D.; Tellone, E.; Trombetta, D.; Ficarra, S.; Smeriglio, A.; Mandalari, G.; Gattuso, G. BiotechnologicalApplications and Health-Promoting Properties of Flavonols: An Updated View. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1710. https://doi.org/10.3390/ijms23031710

7 Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. Molecules. 2020 Nov 11;25(22):5243. doi: 10.3390/molecules25225243. PMID: 33187049; PMCID: PMC7697716.

8 Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. Int J Mol Sci. 2013 Feb 6;14(2):3395-439. doi: 10.3390/ijms14023395. PMID: 23389040; PMCID: PMC3588050.

9 Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. Mol Cell. 2000 Oct;6(4):961-7. doi: 10.1016/s1097-2765(00)00094-0. PMID: 11090634.

10 Klemenčič M, Funk C. Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain. New Phytol. 2018 May;218(3):1179-1191. doi: 10.1111/nph.14660. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28643870..

11 Pérez, B., Bouvier, L. A., Cazzulo, J. J., Agüero, F., Salas-Sarduy, E. and Alvarez, V. E. (2021) Screening and Identification of Metacaspase Inhibitors: Evaluation of Inhibition Mechanism and Trypanocidal Activity. Antimicrob Agents Chemother, Antimicrob Agents Chemother **65.**

12 Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. Trends Parasitol. 2003

13 C.X. Moss, G.D. Westrop, L. Juliano, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing, FEBS Lett.

14 K. McLuskey, J. Rudolf, W.R. Proto, N.W. Isaacs, G.H. Coombs, C.X. Moss, J.C. Mottram, Crystal structure of a Trypanosoma brucei metacaspase, Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (2012) 7469-7474

15 Lourenço, E.M.G.; Di Iório, J.F.; da Silva, F.; Fialho, F.L.B.; Monteiro, M.M.; Beatriz, A.; Perdomo, R.T.; Barbosa, E.G.; Oses, J.P.; de Arruda, C.C.P.; et al. Flavonoid Derivatives as New Potent Inhibitors of Cysteine Proteases: An Important Step toward the Design of New Compounds for the Treatment of Leishmaniasis. Microorganisms 2023, 11, 225. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010225

16 Beteck RM, Legoabe LJ, Isaacs M, Hoppe HC. In vitro Anti-Trypanosomal Activities of Indanone-Based Chalcones. Drug Res (Stuttg). 2019 Jun;69(6):337-341. doi: 10.1055/a-0775-0737. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30452077..

17 Machado, M. F. M., Marcondes, M. F., Juliano, M. A., McLuskey, K., Mottram, J. C., Moss, C. X., Juliano, L. and Oliveira, V. (2013) Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2. FEBS Journal.

18 Gilio, J. M., Marcondes, M. F., Ferrari, D., Juliano, M. A., Juliano, L., Oliveira, V. and Machado, M. F. M. (2017) Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.

LEGENDAS DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Estrutura molecular dos compostos derivados chalconas e flavonoides.

Figura 1: Triagem das moléculas sobre a atividade da metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*. Atividade remanescente da TbMCA-IIa com (■) 1 µM e (□) 6 µM dos compostos das classes chalconas e flavonoides..

Tabela 2: Potencial inibitório (IC50) dos compostos derivados de chalconas e flavonois na modulação da atividade enzimática da TbMCA-IIa.

Figura 2: Cinética de inibição do composto EM-1A frente a TbMCA-IIa. (○) Controle; (●) 1 µM; (□) 2 µM; (■) 3 µM; (△) 4 µM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto.

Figura 3: Cinética de inibição do composto EM-1B frente a TbMCA-IIa. (○) Controle; (●) 1 µM; (□) 2 µM; (■) 3 µM; (△) 4 µM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto.

Figura 4: Cinética de inibição do composto EM-1C frente a TbMCA-IIa (○) Controle; (●) 1 µM; (□) 2 µM; (■) 3 µM; (△) 4 µM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto.

Figura 5: Cinética de inibição do composto EM-F12C frente a TbMCA-IIa (○) Controle; (●) 1 µM; (□) 2 µM; (■) 3 µM; (△) 4 µM. A) Plote de Michaelis-Menten, (B) Lineweaver-Burk, (C) Replote da Inclinação, e (D) Replote do Intercepto.

Figura 6: Perfil do mecanismo de inibição competitivo da TbMCA-IIa pelos compostos EM-1A, EM-1C e EM-F12C.

Figura 7: Perfil do mecanismo de inibição não competitivo da TbMCA-IIa pelo composto EM-1B.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos mecanismos de inibição e valores de afinidade dos compostos EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C.

Figura 8: Variação de pH e a interação do inibidor competitivo EM-1A no sítio ativo da TbMCA-IIa.

Tabela 1

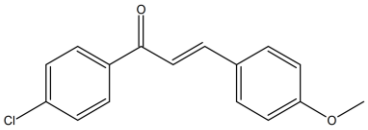
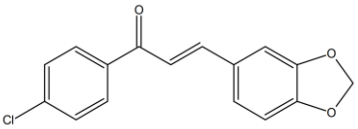
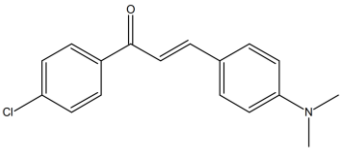
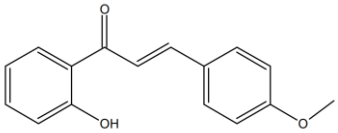
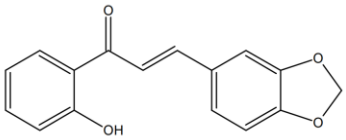
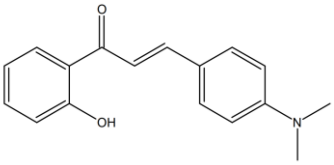
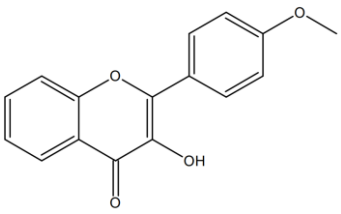
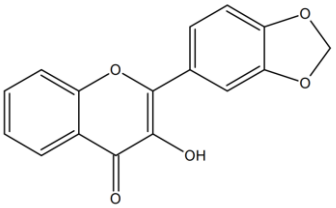
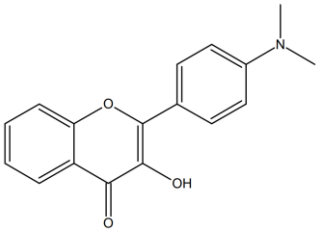
CHALCONAS		
EM-1A	**EM-1B**	**EM-1C**
		
EM-2A	**EM-2B**	**EM-2C**
		
FLAVONOIDES		
EM-F12A	**EM-F12B**	**EM-F12C**
		

Figura 1

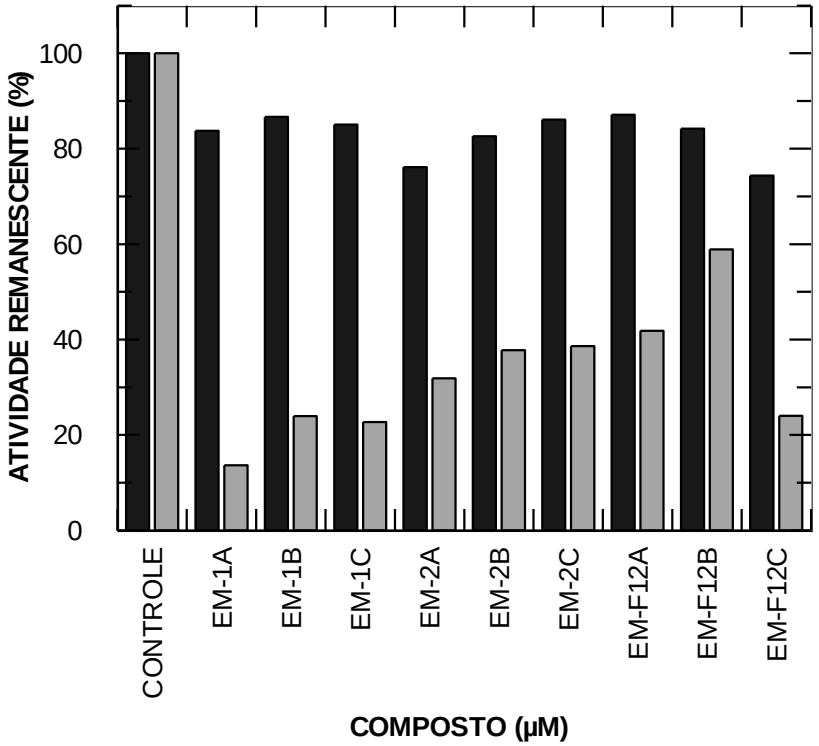


Tabela 2

COMPOSTO	IC_{50} (µM)
EM-1A	2,14 ± 0,07
EM-1B	3,09 ± 0,09
EM-1C	3,02 ± 0,09
EM-2A	3,54 ± 0,19
EM-2B	4,06 ± 0,10
EM-2C	3,81 ± 0,13
EM-F12A	4,45 ± 0,17
EM-F12B	7,55 ± 0,41
EM-F12C	2,52 ± 0,13

Figura 2

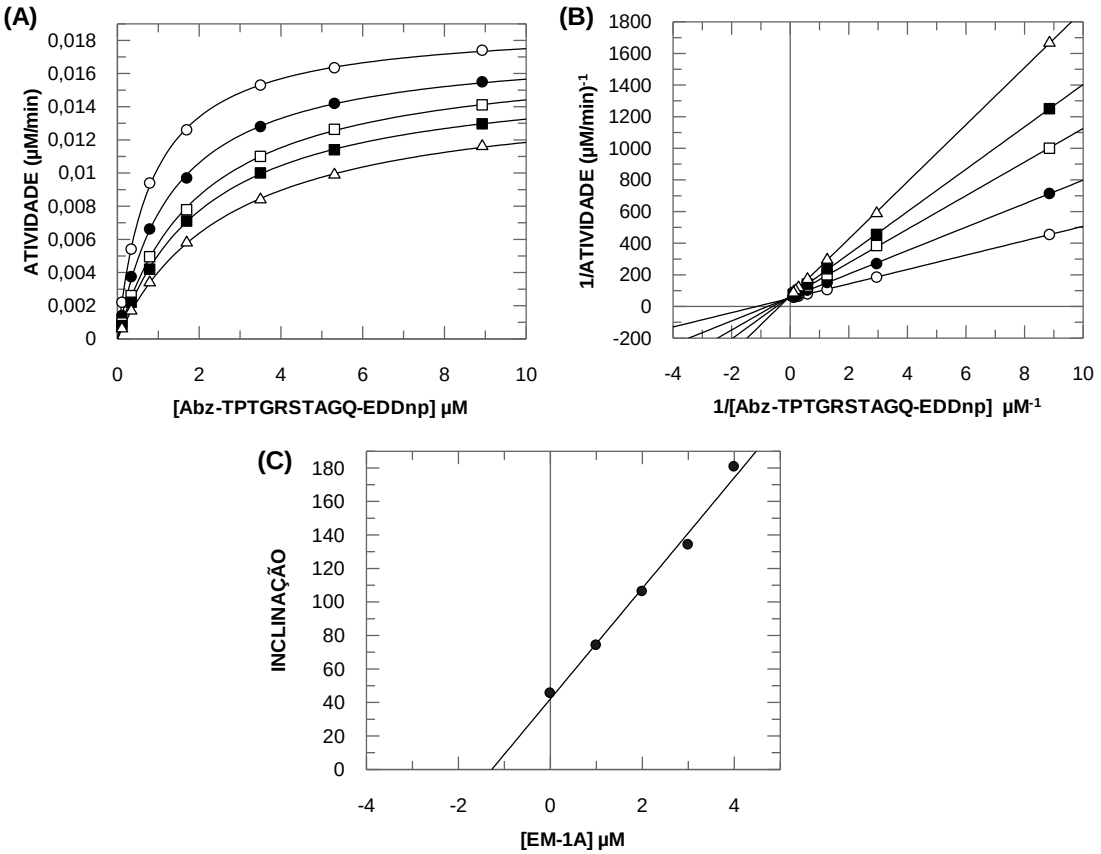

(A)
ATIVIDADE (µM/min)
0,018
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
2
4
6
8
10
[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] µM
(B)
1/ATIVIDADE (µM/min)-1
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
-4
-2
0
2
4
6
8
10
1/[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] µM-1
(C)
INCLINAÇÃO
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-4
-2
0
2
4
[EM-1A] µM

Figura 3

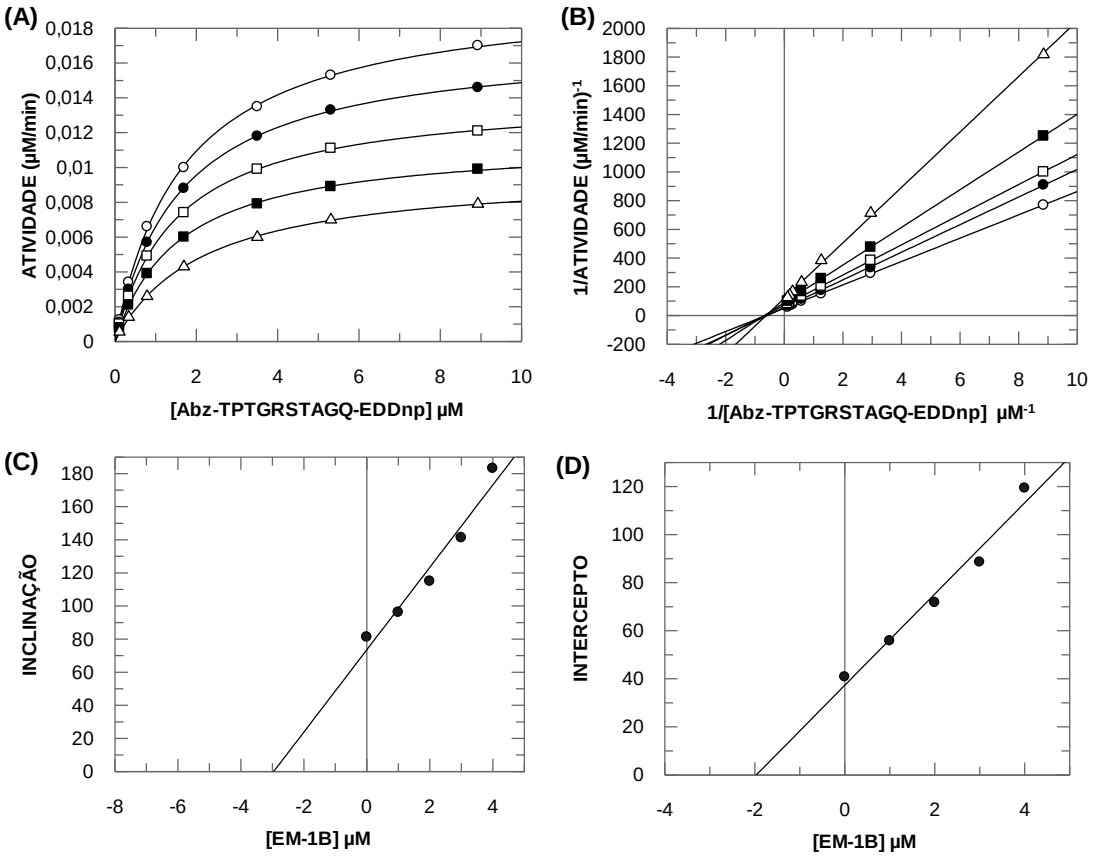

(A)
ATIVIDADE (µM/min)
0,018
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
2
4
6
8
10
[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] µM
(B)
1/ATIVIDADE (µM/min)-1
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
-4
-2
0
2
4
6
8
10
1/[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] µM-1
(C)
INCLINAÇÃO
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-8
-6
-4
-2
0
2
4
[EM-1B] µM
(D)
INTERCEPTO
120
100
80
60
40
20
0
-4
-2
0
2
4
[EM-1B] µM

Figura 4

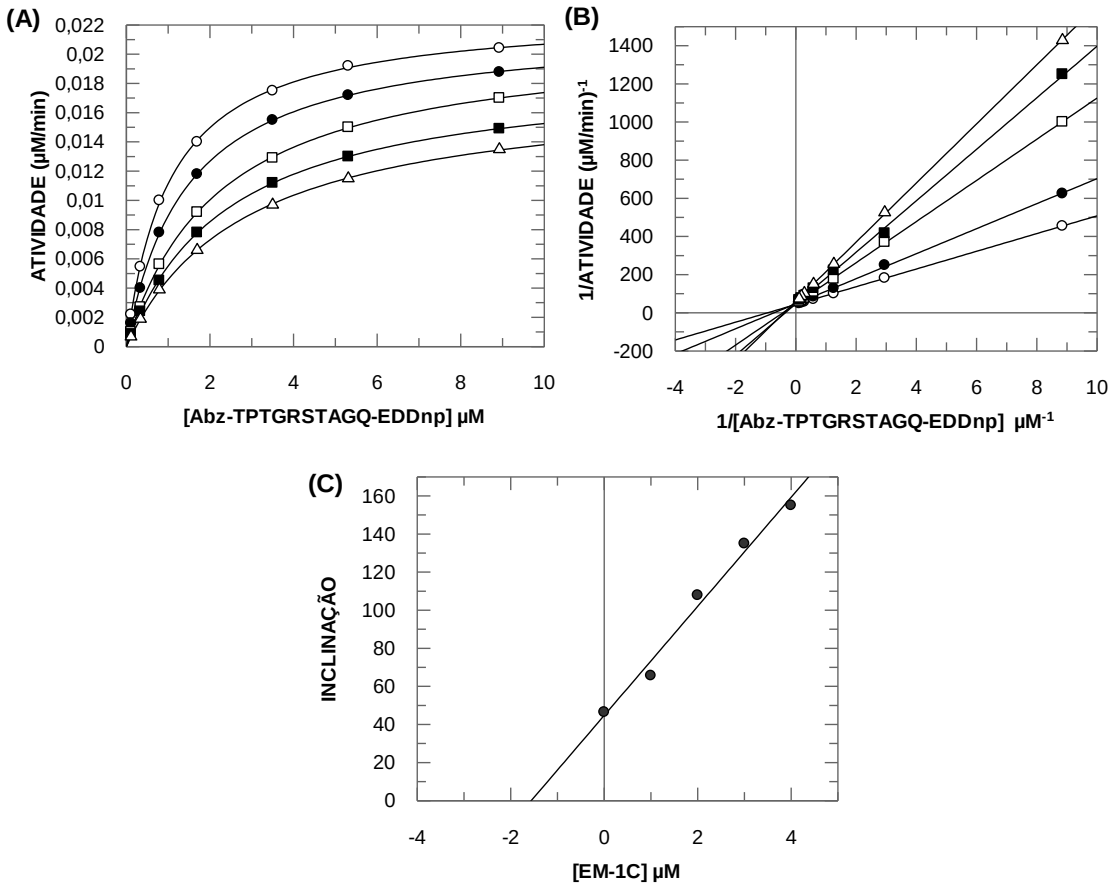

(A)
ATIVIDADE (µM/min)
0,022
0,02
0,018
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
2
4
6
8
10
[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] µM
(B)
1/ATIVIDADE (µM/min)-1
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
-4
-2
0
2
4
6
8
10
1/[Abz-TPTGRSTAGQ-EDDnp] µM-1
(C)
INCLINAÇÃO
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-4
-2
0
2
4
[EM-1C] µM

Figura 5

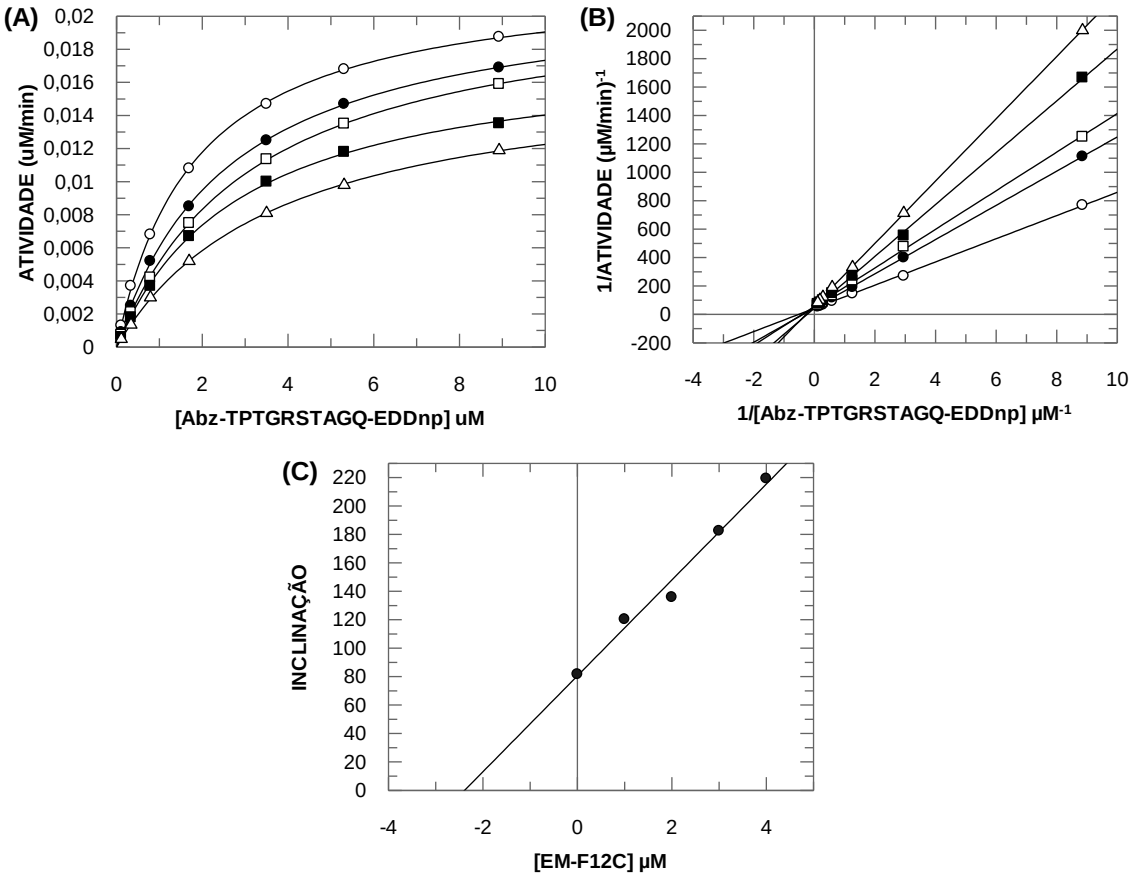


Figura 6

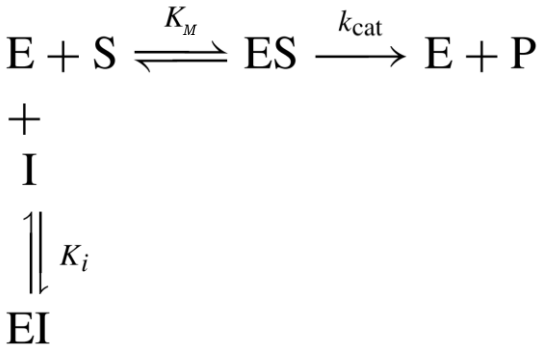


Figura 7

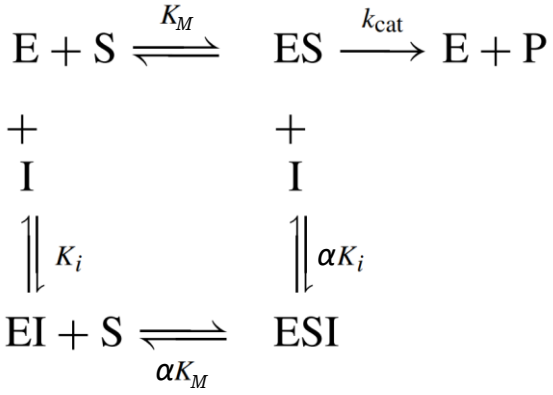
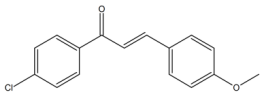
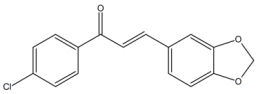
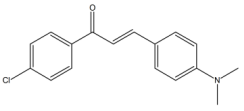
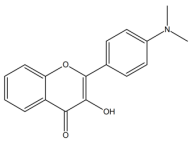


Tabela 3

	EM-1A	**EM-1B**	**EM-1C**	**EM-F12C**
				
Inibidor	C	NCLS	C	C
K_i (μM)	1,27 ± 0,06	2,69 ± 0,21	1,56 ± 0,07	0,74 ± 0,18
αK_i (μM)	-	0,417 ± 0,08	-	-
α	-	0,017	-	-

C: Competitivo**; NCLS**: Não Competitivo Linear Simples

CAPÍTULO 3 – CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR DE SELEÇÃO DE INIBIDORES PARA A METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei*

RESUMO

As proteases representam alvos terapêuticos promissores para impulsionar o desenvolvimento de tratamentos antitripanossoma. Estratégias inovadoras, como triagens fenotípicas e abordagens baseadas em alvos para desenvolvimento de inibidores seletivos e utilização da tecnologia de bibliotecas de peptídeos são fundamentais para otimizar esses tratamentos. O *Trypanosoma brucei*, causador da Tripanossomíase Humana Africana, adapta-se aos diferentes ambientes do hospedeiro e vetor, alternando entre eles em seu ciclo de vida. Em seu estágio na corrente sanguínea, suas formas cobertas por glicoproteína de superfície variante (GSV) evitam a detecção pelo sistema imunológico, enquanto a glicose é sua principal fonte de energia. Estudos sugerem que a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa) desempenha um papel importante nesse ambiente e pode ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento da tripanossomíase. Neste estudo, foi desenvolvimento um sistema de seleção celular de inibidores específico para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*. A clonagem utilizando o plasmídeo com origem de replicação de baixa cópia (pColA) foi bem-sucedida, possibilitando realizar testes com diferentes concentrações de $CaCl_2$ para avaliar o crescimento celular. Os resultados revelaram que a expressão da metacaspase, induzida pelo promotor de arabinose, impactou significativamente o crescimento celular, com a concentração de 1 mM de $CaCl_2$ resultando em menor crescimento após 24 horas. Por outro lado, o clone contendo o gene da TbMCA-IIa inserido no plasmídeo pET-28a(+) demonstrou uma maior eficiência nos testes com $CaCl_2$, evidenciado pela redução significativa no crescimento celular com uma concentração menor (1 mM) após 24 horas. Além disso, no experimento realizado com o gene da TbMCA-IIa em pET-28a(+) foi observado que a adição de glicose influenciou o crescimento celular. Esses testes validam a construção do sistema celular de seleção de inibidores, permitindo futuros testes com bibliotecas de inibidores.

Palavras-chave: Proteases. Metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*. Sistema de seleção de inibidores

ABSTRACT

Proteases represent promising therapeutic targets for advancing the development of antitrypanosomal treatments. Innovative strategies, such as phenotypic screenings, target-based approaches for the development of selective inhibitors, and the use of peptide library technology, are fundamental for optimizing these treatments. Trypanosoma brucei, the causative agent of Human African Trypanosomiasis, adapts to different environments within the host and vector, alternating between them in its life cycle. In its bloodstream stage, its VSG-covered forms evade detection by the immune system, while glucose is its primary energy source. Studies suggest that Trypanosoma brucei metacaspase-2 (TbMCA-IIa) plays an important role in this environment and may be a promising therapeutic target for treating trypanosomiasis. In this study, a specific cellular selection system for Trypanosoma brucei metacaspase-2 inhibitors was developed. Cloning using the low-copy origin of replication plasmid (pColA) was successful, allowing tests with different concentrations of CaCl2 to evaluate cell growth. The results revealed that metacaspase expression, induced by the arabinose promoter, significantly impacted cell growth, with 1 mM CaCl2 concentration resulting in less growth after 24 hours. On the other hand, the clone containing the TbMCA-IIa gene inserted into the pET-28a(+) plasmid demonstrated greater efficiency in tests with CaCl2, as evidenced by a significant reduction in cell growth with a lower concentration (1 mM) after 24 hours. Additionally, in the experiment with the TbMCA-IIa gene in pET-28a(+), the addition of glucose was observed to influence cell growth. These tests validate the construction of the cellular inhibitor selection system, enabling future tests with inhibitor libraries.

Keywords: proteases. *Trypanosoma brucei* metacaspase-2. inhibitor selection system

1 INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e desempenham um papel fundamental em processos biológicos como replicação do DNA, ciclo celular e apoptose. Sua capacidade de modular funções celulares faz delas ferramentas importantes na natureza, além de serem essenciais em aplicações industriais e pesquisas biomédicas. Com os avanços em genômica e proteômica, as proteases se tornam alvos terapêuticos importantes na busca por novos medicamentos [1,2].

A otimização de tratamentos não apenas envolve a combinação de medicamentos existentes, mas também se beneficia do aprimoramento na compreensão dos genomas e proteomas. Estratégias como triagens fenotípicas e abordagens baseadas em alvos aceleram a identificação e desenvolvimento de inibidores seletivos, impulsionando a descoberta de terapias mais eficazes [3].

Nesse contexto, ao longo da última década, diversos métodos baseados em bibliotecas foram desenvolvidos para triagem e identificação de interações ligante-alvo com propriedades funcionais específicas. Um exemplo é a biblioteca de phage display, uma tecnologia que permite a seleção e identificação de proteínas ou peptídeos com alta afinidade por alvos específicos. Descrita pela primeira vez há mais de duas décadas, essa metodologia de genômica possibilita a apresentação de grandes coleções de peptídeos e proteínas na superfície de fagos filamentares, permitindo a seleção de novos componentes biológicos com alta afinidade e especificidade para quase qualquer alvo, o que pode ser aplicado na descoberta de novos medicamentos [4].

Nos casos de tratamentos antitripanossoma, a utilização de técnicas avançadas de análise, aliada a um maior entendimento dos genomas e vias biológicas, abre perspectivas promissoras que envolvem triagens fenotípicas para identificar compostos antitripanossômicos e uma estratégia baseada em alvos, selecionando-os com base em sua essencialidade para a sobrevivência do parasita, ausência em humanos e diferenças suficientes dos ortólogos humanos para permitir a inibição enzimática. O processo de desenvolvimento de ensaios de triagem de alto rendimento para testar grandes bibliotecas de compostos químicos em busca de atividade inibitória contra alvos específicos é uma ferramenta na descoberta de medicamentos. Esses ensaios podem incluir testes enzimáticos, testes de ligação a

receptores ou testes celulares para avaliar o efeito dos compostos na sobrevivência ou crescimento do parasita [5].

O *Trypanosoma brucei*, agente causador da Tripanossomíase Humana Africana, é um parasita extracelular que passa por diversas mudanças morfológicas para se adaptar aos diferentes ambientes dentro do hospedeiro mamífero e do inseto vetor, a mosca tsé-tsé. Com um ciclo de vida digenético, ele alterna entre o hospedeiro mamífero e o vetor [6]. Na corrente sanguínea do mamífero, apresenta formas cobertas por uma camada de glicoproteína de superfície variante, que permite ao parasita evitar a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, promovendo sua sobrevivência e propagação. Além disso, a glicose é a principal fonte de energia para o *T. brucei* nesse ambiente, sendo convertida em piruvato pela via glicolítica para sustentar suas atividades vitais [7,8].

Estudos com a metacaspase-2 do *Trypanosoma brucei* revelaram sua expressão apenas na forma sanguínea do parasita, sendo essencial para sua sobrevivência nesse ambiente. Por meio de análise de RNAi foi demonstrado que essa metacaspase, assim como a MCA3 e MCA5, são cruciais nessa fase, sugerindo uma função associada às vesículas RAB11 que é independente dos processos de reciclagem endossômica [8].

Diante dos mecanismos adaptativos e metabólicos do *Trypanosoma brucei*, essenciais para sua sobrevivência e patogenicidade, e considerando a relevância da metacaspase-2 nesse contexto sanguíneo, abre-se um caminho promissor para o desenvolvimento de sistemas seletivos de inibidores por meio da identificação de alvos terapêuticos específicos, visando a criação de estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas para o tratamento da tripanossomíase.

2 METODOLOGIA

2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA TbMCA-IIa

A amplificação do gene da TbMCA-IIa foi conduzida com os seguintes primers específicos: primer forward dengue (FW) 5’-GCTAACAGGAGGAATTAACCATGT-3’ e primer reverse dengue (RV) 5’-TGCGGGTGGCTCCACTCGAGCTAT-3’. Para a reação de PCR utilizou-se 1 µL do gene da TbMCA-IIa, 10 µL de Phusion Buffer, 0,5 µL de Phusion DNA Polymerase, 1 µL de cada primer (FW e RV), 1 µL de dNTP, e água deionizada autoclavada para alcançar um volume final de 50 µL.

A amplificação do gene foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler) seguindo as condições detalhadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Condições da PCR para amplificação do gene da TbMCA-IIa

TEMPERATURA	TEMPO	
98ºC	30 segundos	
98ºC	10 segundos	35 ciclos
62ºC	15 segundos	
72ºC	30 segundos	
72ºC	10 minutos	

2.2 AMPLIFICAÇÃO DO VETOR

Os primers utilizados para a amplificação do plasmídeo Den Trx pColA foram o primer ARABINOSE Aratermsrteptag FW TEDA pA e o primer ArapromREV TEDA Pask. A composição da reação de PCR incluiu 2 µL do plasmídeo diluído 1:10, 10 µL de 5x PCRBIO Verifi Buffer, 0,5 µL de PCR BIOHS Verifi polimerase, 2 µL de cada primer (FW e RV), 5 µL de 10x VeriMax Enhancer, e água deionizada autoclavada para atingir um volume final de 50 µL.

A amplificação do plasmídeo Den Trx pColA foi conduzida em um termociclador (Eppendorf Mastercycler), seguindo as condições detalhadas na **Tabela 2.**

Tabela 2: Condições da PCR para amplificação do plasmídeo

TEMPERATURA	TEMPO	
98ºC	30 segundos	
98ºC	10 segundos	35 ciclos
62ºC	15 segundos	
72ºC	90 segundos	
72ºC	10 minutos	

2.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a eletroforese, preparou-se um gel de agarose a 1% (m/v) dissolvendo 0,5g de agarose em 50 mL de tampão TAE (TRIS 80 mM, Ácido Acético glacial 40 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Adicionou-se 2 µL de brometo de etídio e, após a

solidificação, as amostras foram misturadas com tampão de amostra e inseridas nos poços do gel, utilizando 1 Kb DNA Ladder (Thermofisher) como marcador molecular. A corrida eletroforética foi submetida a uma tensão de 80V por 30 minutos em cuba horizontal e, ao final, o gel foi analisado sob luz UV.

2.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

Os fragmentos amplificados do inserto e do vetor foram purificados utilizando o Gel DNA Purification Kit da Ludwig para a extração do DNA plasmidial, seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante, e posteriormente quantificados no NanoDrop (Thermo Scientific).

2.5 CLONAGEM DA TbMCA-IIA UTILIZANDO A TÉCNICA T5 EXONUCLEASE DNA ASSEMBLY (TEDA)

A clonagem da TbMCA-IIa foi realizada empregando a técnica *T5 exonuclease DNA assembly*, também conhecida como TEDA. Essa abordagem utiliza exclusivamente a T5 exonuclease 5'-3' para tratar os fragmentos de DNA com extremidades homólogas, os quais são posteriormente introduzidos em *Escherichia coli* por transformação, resultando na formação de clones [9].

A reação realizada neste estudo seguiu as proporções de vetor/inserto de 1:1 e 1:4, utilizando 100 ng do vetor e determinando a concentração de inserto pela equação apresentada abaixo.

$$ng\ inserto = \frac{ng\ vetor\ .\ pb\ inserto}{pb\ vetor}$$

Em seguida, foram adicionados em um tubo volumes de vetor e inserto para cada proporção (1:1 e 1:4), ajustando o volume para 16 µL com água autoclavada. Posteriormente, acrescentou-se ao tudo 4 µL da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, e a mistura foi homogeneizada e incubada a 30°C na estufa por 40 minutos antes da subsequente etapa de transformação.

2.6 TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS *Escherichia coli* DH5α COMPETENTES

Para a transformação, as bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e descongeladas em um banho de gelo por 15

minutos. Em seguida, 7 µL de TEDA de cada proporção (1:1 e 1:4) foram adicionados a 100 µL dessas células, seguido por uma incubação no gelo por 30 minutos.

Imediatamente após esse período, elas foram submetidas a uma rápida exposição à temperatura de 42ºC por 90 segundos, seguida por um resfriamento rápido em um banho de gelo por 2 minutos.

Após essas etapas, adicionou-se 800 µL de meio LB Broth + glicose (2%), totalizando um volume final de 900 µL, e as células foram incubadas por uma hora a 37ºC. Em seguida, foram semeados 100 µL da solução resultante em uma placa contendo LB ágar + penicilina (100 µg/mL) + glicose (2%), que foi incubada na estufa por 16 horas.

Posteriormente, centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm por 3 minutos e descartou-se 700 µL do sobrenadante, sendo o sedimento resultante ressuspenso.

Por fim, 100 µL da solução ressuspendida foram semeadas em uma nova placa contendo LB ágar + penicilina (100 $\mu g.mL^{-1}$) + glicose (2%), sendo incubada na estufa a 37ºC por 16h.

2.7 TRIAGEM DE CLONES POSITIVOS

No estágio subsequente à obtenção de colônias nas placas de transformação, algumas foram selecionadas para conduzir uma PCR de colônia, utilizando primers FW 5’-GCTAACAGGAGGAATTAACCATGT-3’ e RV 5’-TGCGGGTGGCTCCACTCGAGCTAT-3’.

A reação de PCR foi composta por 20 µL de tampão 10x, 8 µL de Taq DNA polimerase (Thermofisher), 2 µL de cada primer (FW e RV), 16 µL de dNTP, 6 µL de $MgCl_2$ e água deionizada autoclavada em quantidade suficiente para alcançar um volume final de 200 µL. Em seguida, foram preparadas 20 alíquotas de 10 µL cada, com a inserção de uma colônia em cada alíquota. Dessas, 10 alíquotas foram destinadas às colônias referentes ao TEDA na proporção 1:1, e as outras 10 para as colônias do TEDA na proporção 1:4.

A amplificação do gene TbMCA-IIa foi conduzida em termociclador, seguindo as condições detalhadas na **Tabela 3.**

Tabela 3: Parâmetros utilizados na PCR para a confirmação da clonagem

TEMPERATURA	TEMPO	
94ºC	2 minutos	
94ºC	45 segundos	35 ciclos
60ºC	30 segundos	
72ºC	90 segundos	
72ºC	10 minutos	

As colônias selecionadas para a PCR foram inicialmente semeadas em uma placa de controle contendo LB ágar, penicilina (100 µg/mL) e glicose (2%), e incubadas a 37ºC na estufa por 16 horas. Essa etapa preparatória foi realizada como preparação para o subsequente pré-inóculo.

2.8 CULTIVO, ARMAZENAMENTO E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

As colônias cultivadas na placa de controle foram inoculadas em 10 mL de meio LB Broth contendo ampicilina (100 $\mu g.mL^{-1}$) e suplementada com glicose 2%. O inóculo foi incubado em um agitador de bancada por um período de 16 horas a 37ºC.

Em seguida, foram preparadas duas alíquotas, cada uma contendo 700 µL do pré-inóculo acrescido de 300 µL de glicerol 50%, destinadas a serem armazenadas no ultrafreezer (-80ºC) para fins de conservação.

O restante do material foi submetido a uma lise alcalina utilizando o Kit Thermo Fisher de Miniprep para a extração do DNA plasmidial, seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante.

2.9 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA SEQUENCIAMENTO

Foi conduzida uma PCR para a preparação das amostras destinadas ao sequenciamento, utilizando primers específicos para o vírus da dengue (FW 5’-GCTAACAGGAGGAATTAACCATGT-3’ e RV 5’-TGCGGGTGGCTCCACTCGAGCTAT-3’).

A composição da reação de PCR incluiu 12,5 µL de tampão 2x PCR BIO Verify mix, 0,5 µL de cada primer (FW e RV), 0,5 µL de DNA, e água deionizada autoclavada em quantidade suficiente para atingir um volume final de 25 µL.

A amplificação do gene TbMCA-IIa foi realizada em um termociclador (BIO-RAD Thermal Cycler), seguindo as condições especificadas na **Tabela 4**.

Tabela 4: Condições da PCR para amplificação DNA recombinante

TEMPERATURA	TEMPO	
98ºC	30 segundos	
98ºC	10 segundos	35 ciclos
62ºC	15 segundos	
72ºC	30 segundos	
72ºC	10 minutos	

2.10 TESTE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) EM RESPOSTA À VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE $CaCl_2$

O plaqueamento dos estoques de glicerol dos clones da TbMCA-IIa no plasmídeo com baixa origem de replicação pColA e pET28a (+) foi realizado utilizando a técnica de esgotamento. O estoque de glicerol da TbMCA-IIa pColA foi distribuído em placas contendo ampicilina (100 $\mu g.mL^{-1}$), enquanto que o estoque para a construção do pET-28a(+) foi distribuído em placas suplementadas com canamicina (50 $\mu g.mL^{-1}$). Ambas as placas foram incubadas em estufa a 37ºC durante a noite (~16-18h).

Em seguida, uma única colônia foi selecionada de cada placa para realizar o pré-inóculo em tubos cônicos de 50 mL. Um tubo foi destinado à colônia referente ao pColA, e outro para a colônia referente ao pET-28a(+). Ambos os tubos continham 10 mL de meio Luria Bertani Broth (LB Broth) [1% triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 0,5% de NaCl (p/v) – pH 7,0], e foram suplementados com o antibiótico apropriado. O processo de incubação ocorreu em um agitador de bancada NT 712 Nova Técnica a 37ºC, com uma rotação de 180 rpm, durante a noite.

Após transferir 1% do pré-inóculo para meio LB fresco, a cultura foi incubada até que a densidade ótica (OD_{600}) atingisse 0,5. Em seguida, foi realizada a indução com 100mM de L-(+)-Arabinose para a construção da TbMCA-IIa pColA e 0,25 mM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo para a indução da TbMCA-IIa em pET-28a(+). Diferentes concentrações de $CaCl_2$ foram adicionadas a cada tubo, conforme descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5: Condições utilizadas no teste para avaliação do crescimento celular sob diferentes concentrações de $CaCl_2$

TbMCA-IIa pColA	**TbMCA-IIa** pET-28a(+)
Tubo 1: CN (sem $CaCl_2$ e sem L-(+)-Arabinose)	**Tubo 7:** CN (sem $CaCl_2$ e sem IPTG)
Tubo 2: 0 $CaCl_2$	**Tubo 8:** 0 $CaCl_2$
Tubo 3: 10 µM $CaCl_2$	**Tubo 9:** 10 µM $CaCl_2$
Tubo 4: 100 µM $CaCl_2$	**Tubo 10:** 100 µM $CaCl_2$
Tubo 5: 1 mM $CaCl_2$	**Tubo 11:** 1 mM $CaCl_2$
Tubo 6: 5 mM $CaCl_2$	**Tubo 12:** 5 mM $CaCl_2$

Após a indução com L-(+)-Arabinose e IPTG, foram retiradas alíquotas das culturas para plaqueamento, representando a condição inicial (0h após a indução), enquanto as outras alíquotas foram incubadas na estufa a 30ºC, permanecendo no agitador por um total de 24h.

Ao final desse período, alíquotas das culturas foram diluídas e plaqueadas (100 µL diluídas na proporção $1:10^5$). As placas foram incubadas na estufa a 37ºC por aproximadamente 16-18h.

Para avaliar o crescimento e a expressão da proteína ao longo do tempo, foram gerados gráficos utilizando o Microsoft Excel, para avaliar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em relação ao percentual de crescimento em diferentes intervalos de tempo.

O experimento foi conduzido em duplicata.

2.11 TESTE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) MEDIANTE ADIÇÃO DE GLICOSE

O estoque de glicerol referente ao clone da TbMCA-IIa em pET-28a(+) foi plaqueado por esgotamento em placas suplementadas com canamicina (50 $\mu g.mL^{-1}$). Após incubação durante a noite (~16-18h) a 37ºC, uma colônia foi cultivada em meio Luria Bertani Broth (LB Broth) contendo canamicina, em um tubo cônico de 50 mL, no agitador de bancada, durante a noite, a 37ºC.

Em seguida, 1% da cultura foi transferida para meio LB Broth e incubada nas mesmas condições até que a densidade ótica (OD_{600}) alcançasse 0,5. Neste ponto, glicose (1%) foi adicionada, a temperatura do agitador foi reduzida para 30ºC, e uma amostra foi reservada para plaqueamento. Outras amostras foram mantidas em

agitação por 24 horas. Após este período, alíquotas foram retiradas para plaqueamento em placas suplementadas com canamicina.

Para todos os plaqueamentos foi utilizado 100 µL das alíquotas diluídas $1:10^5$. A análise dos resultados foi conduzida por meio de gráficos de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) – Crescimento *versus* Tempo (horas) utilizando o Microsoft Excel, e esse experimento também foi realizado em duplicata.

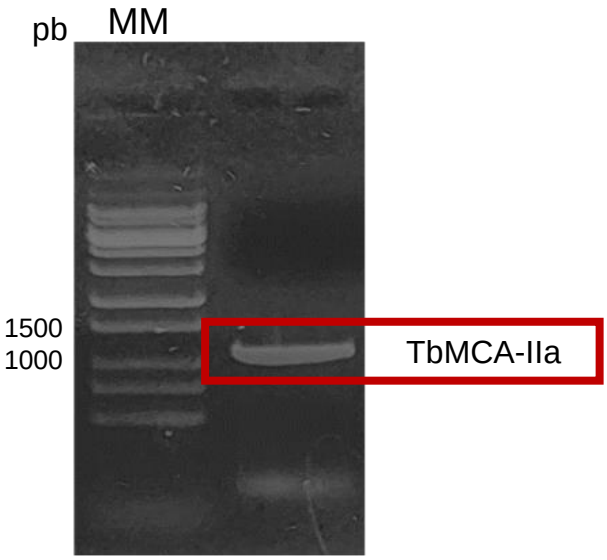
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 OBTENÇÃO DO CLONE DA METACASPASE-2 DE *Trypanosoma brucei* RECOMBINANTE

A clonagem do gene da TbMCA-IIa no plasmídeo Den Trx pColA, visa o desenvolvimento de um sistema de seleção de inibidores para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*, visto a importância dessa cisteíno protease na regulação de eventos de autoprocessamento e ativação celular, emergindo como um potencial alvo terapêutico no combate à Tripanossomíase Humana Africana.

Para tanto, foram amplificados tanto o gene da TbMCA-IIa quanto o do vetor Den Trx pColA. A amplificação do inserto foi conduzida por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os primers específicos da dengue, conforme já descrito na metodologia. Posteriormente, o produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (**Figura 1**).

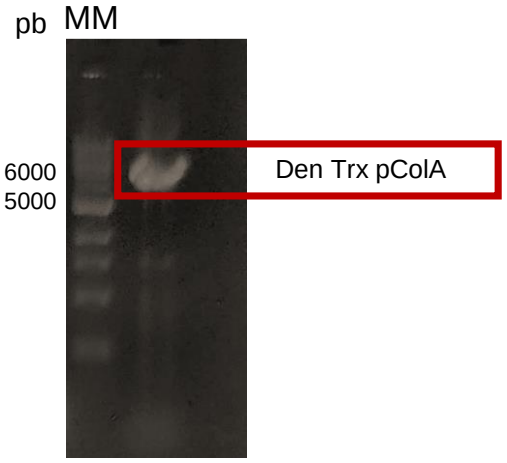
Figura 1: Amplificação do gene da TbMCA-IIa



Eletroforese em gel de agarose 1%. Obtenção da amplificação do gene da TbMCA-IIa (~1100 pb). (MM) marcador de peso molecular (Ladder 1kb); (pb) pares de bases.

Em seguida, o vetor Den Trx pColA foi amplificado por PCR nas mesmas condições de temperatura, mas usando primers de arabinose, o promotor específico para a clonagem. O resultado da amplificação do vetor também foi avaliado em gel de agarose 1%, conforme apresentado na **Figura 2.**

Figura 2: Amplificação do plasmídeo Den Trx pColA



Eletroforese em gel de agarose 1%. Obtenção da amplificação do plasmídeo Den TR x pColA (~6000 pb). (MM) marcador de peso molecular (Ladder 1kb); (pb) pares de bases

A escolha do plasmídeo contendo a origem de replicação pColA para a clonagem foi motivada pela sua baixa capacidade de replicação, o que proporciona uma vantagem na avaliação subsequente dos testes relacionados à indução da expressão da TbMCA-IIa. Essa característica de baixa cópia oferece maior controle e sensibilidade nos experimentos.

Após a amplificação do inserto e do vetor, os produtos foram purificados usando o Gel DNA Purification Kit da Ludwig, seguindo as instruções do fabricante. As concentrações foram quantificadas no NanoDrop, resultando em 57,2 ng/µL para o inserto e 65,9 ng/µL para o vetor.

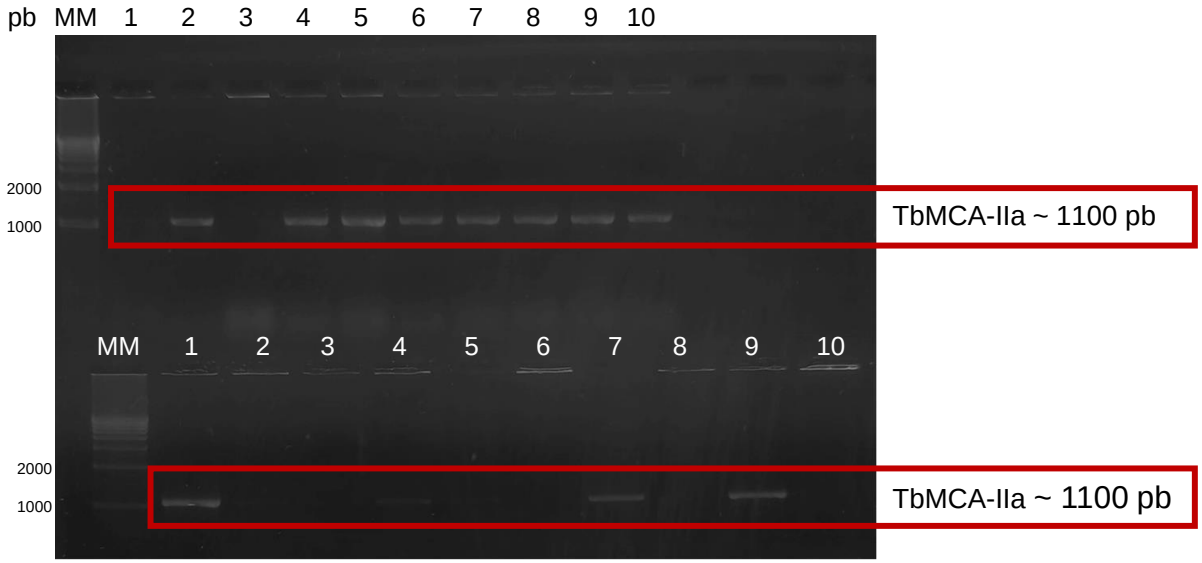
O passo subsequente envolveu a aplicação da técnica de clonagem denominada TEDA, reconhecida por sua simplicidade, baixo custo e eficiência na clonagem, conforme descrito na literatura. O TEDA permite a montagem simultânea de vários fragmentos de DNA e a execução de mutagênese direcionada em diferentes locais. Sua principal característica é a utilização exclusiva da T5 exonuclease para simplificar o processo de clonagem de fragmentos de DNA. Durante a incubação, a T5 exonuclease remove bases nitrogenadas das extremidades 5' dos fragmentos, gerando extremidades coesivas 3'. Esses fragmentos, com extremidades complementares, se hibridizam e são introduzidos em células hospedeiras. Dentro dessas células, o reparo *in vivo*, conduzido pela DNA polimerase e ligase, preenche lacunas e une os fragmentos, resultando na formação de um plasmídeo recombinante [9].

Para a realização do TEDA foram testadas proporções de inserto/vetor de 1:1 e 1:4, usando 100 ng de vetor. Os cálculos necessários foram realizados conforme a metodologia. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora.

Posteriormente, 7 µL do TEDA foram inseridos na cepa de *E. coli* DH5α para a realização da transformação por choque térmico. Essa técnica destaca-se por sua simplicidade e acessibilidade, uma vez que dispensa a necessidade de equipamentos específicos; apenas a regulação da temperatura é requerida para controlar a permeabilidade da membrana celular, viabilizando a inserção do DNA recombinante [10].

Após o crescimento das colônias, foi realizada uma PCR para triagem de colônias positivas, seguindo os mesmos parâmetros da PCR de amplificação do inserto. A eletroforese em gel de agarose 1% mostrou os resultados na **Figura 3.**

Figura 3: Triagem das colônias transformadas com o gene da TbMCA-IIa

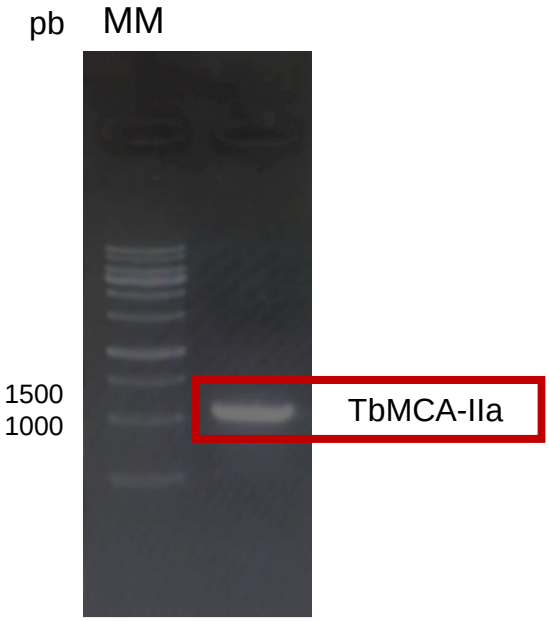


Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da obtenção do DNA recombinante da TbMCA-IIa (1100 pb) no plasmídeo Den Trx pColA. As colônias positivas estão representadas nas colunas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 na parte superior, correspondendo à proporção 1:1, enquanto as colunas 1, 2, 4, 7 e 9 da parte inferior do gel são associadas à proporção 1:4. (MM) marcador de peso molecular (Ladder 1kb); (pb) pares de bases.

Das 20 colônias selecionadas, 8 foram positivas na proporção 1:1 e 5 na proporção 1:4. As colônias positivas com maior intensidade de banda foram submetidas a extração de DNA plasmidial usando o Kit Thermo Fisher de Miniprep, seguido de quantificação no NanoDrop.

A colônia com a maior concentração de DNA (43,9 ng/µL) foi escolhida para uma reação de PCR subsequente, que será sequenciada para confirmação.

Figura 4: Preparação para sequenciamento da amostra de TbMCA-IIa no plasmídeo Den TR x pColA



Eletroforese em gel de agarose 1%. Resultado da PCR para posterior sequenciamento da amostra. (MM) marcador de peso molecular (Ladder 1kb); (pb) pares de bases.

A análise de eletroforese em gel de agarose 1%, como demonstrado na **Figura 4**, validou à amplificação bem-sucedida do gene alvo, evidenciada pela presença da do fragmento de DNA desejado representada pela banda observada.

3.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) EM RESPOSTA À VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE $CaCl_2$

Após o sucesso na clonagem do gene da TbMCA-IIa no plasmídeo com a origem de replicação pColA, o foco voltou-se para investigar o impacto da variação da concentração de cálcio no meio sobre o crescimento das colônias. Para isso, realizou-se um teste com o clone, induzindo a expressão do gene por meio da adição de L-(+)-Arabinose, conforme detalhado na metodologia. Alíquotas iniciais (0h) foram plaqueadas, enquanto o restante foi incubado por 24h para posterior plaqueamento. Após esse processo, realizou-se a contagem de colônias de cada placa, plotando a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em relação ao tempo para cada concentração de $CaCl_2$ utilizada no experimento. A **Figura 5** apresenta a média dos resultados obtidos, considerando que o teste foi conduzido em duplicata.

Figura 5: Influência da variação de concentração de $CaCl_2$ no crescimento das colônias contendo o gene da TbMCA-IIa no plasmídeo com origem de replicação pColA

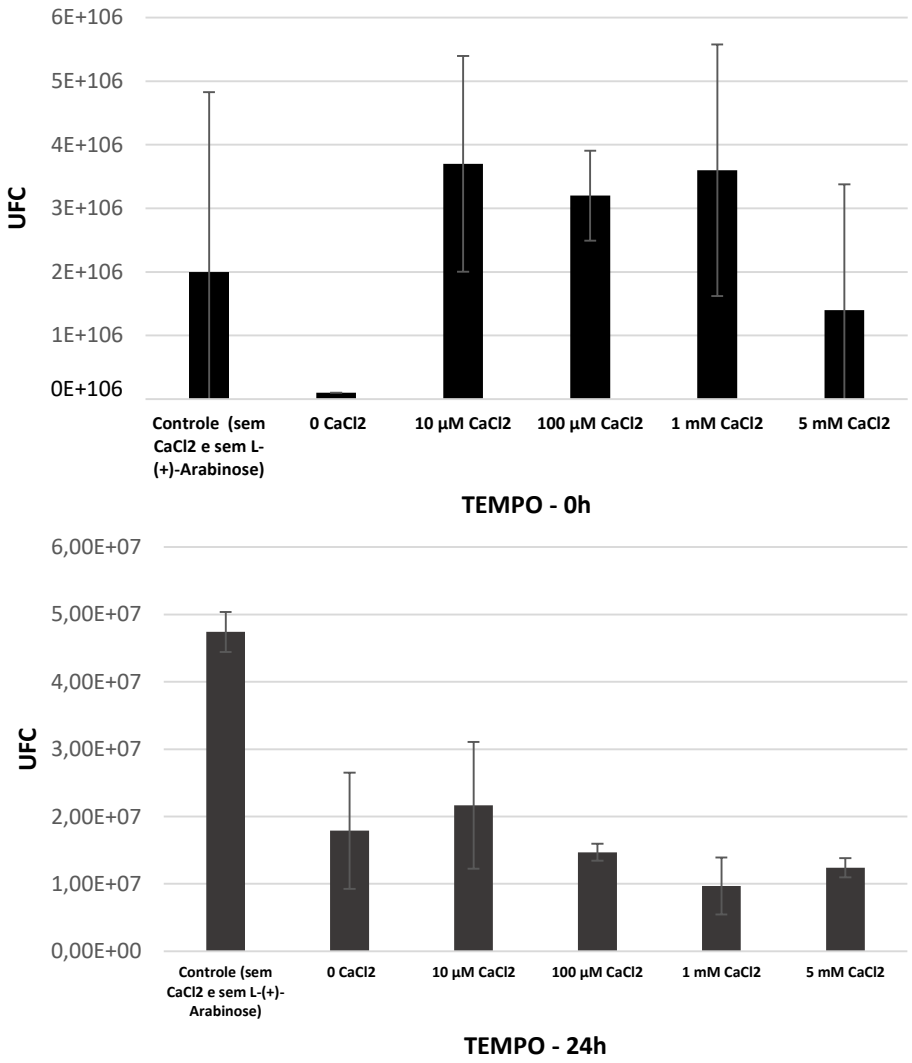


Gráfico referente ao número de Unidades Formadoras de Colônia do gene da TbMCA-IIa no plasmídeo com origem de replicação pColA. em função do tempo (h), influenciado pela variação de $CaCl_2$.

Analisando o gráfico da **Figura 5**, é possível verificar a redução no crescimento celular, se comparado com o controle, para todas as amostras de ambos os períodos (0h e 24h), sendo que a amostra sem concentração de cálcio (0 $CaCl_2$) em 0h apresentou a redução de crescimento mais significativa, atingindo uma diminuição de 95% em comparação com o controle negativo, que não recebeu cálcio nem o indutor de arabinose.

Tendo em vista que o experimento em questão foi realizado em duplicata, foi calculado o desvio padrão para cada amostra, conforme **Tabela 6:**

Tabela 6 : Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias em meio com diferentes concentrações de $CaCl_2$ nos períodos de 0h e 24h

	0h	0h	24h	24h
	Média (UFC)	**Desvio Padrão**	**Média (UFC)**	**Desvio Padrão**
Controle (sem $CaCl_2$ e sem L-(+)-Arabinose)	$2,0 \times 10^6$	$2,82 \times 10^6$	$4,74 \times 10^7$	$2,97 \times 10^6$
0 $CaCl_2$	$1,0 \times 10^5$	0	$1,79 \times 10^7$	$8,63 \times 10^6$
10 µM $CaCl_2$	$3,75 \times 10^6$	$1,69 \times 10^6$	$2,17 \times 10^7$	$9,40 \times 10^6$
100 µM $CaCl_2$	$3,2 \times 10^6$	$7,07 \times 10^5$	$1,47 \times 10^7$	$1,27 \times 10^6$
1 mM $CaCl_2$	$3,6 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$	$9,70 \times 10^6$	$4,24 \times 10^6$
5 mM $CaCl_2$	$1,4 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$	$1,24 \times 10^7$	$1,41 \times 10^6$

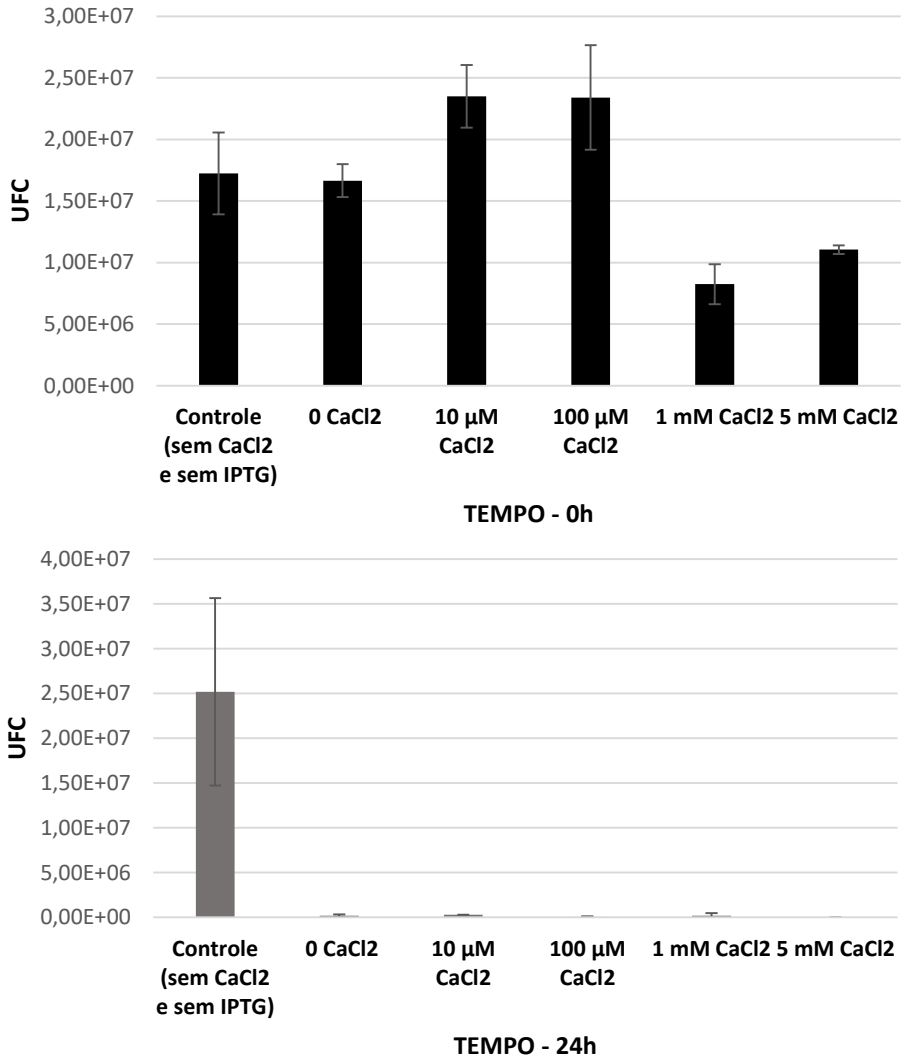
A necessidade de avaliação do efeito da variação da concentração de cálcio no meio se deu pelo fato de que, conforme já descrito na literatura, a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* possui dependência de íons cálcio para seu processamento e consequentemente ativação celular [11], sendo necessário avaliar qual a concentração ideal a ser utilizada nos experimentos posteriores.

Além de conduzir este teste com a clonagem do gene da TbMCA-IIa efetuada neste trabalho, foi igualmente relevante realizar o mesmo experimento com o clone da TbMCA-IIa em pET-28a(+) para comparativo e análise de possíveis diferenças, com o intuito de compreender se as variações nas condições experimentais ou nas características específicas dos vetores podem influenciar o crescimento das colônias e, consequentemente, a expressão do gene da TbMCA-IIa.

Para tanto, conforme metodologia já descrita, o protocolo foi seguido da mesma forma que o realizado com a clonagem com o plasmídeo contendo a origem de replicação pColA, alterando somente o indutor, que no caso foi utilizado o IPTG para indução do *operon lac* no vetor pET-28a(+).

A **Figura 6** apresenta o plote da média das Unidades Formadoras de Colônias nos períodos de 0 e 24h, uma vez que esse teste também foi conduzido em duplicata.

Figura 6: Influência da variação de concentração de $CaCl_2$ no crescimento das colônias com o gene da TbMCA-IIa em pET-28a(+)



Gráficos referente as Unidades Formadoras de Colônia do gene da TbMCA-IIa no plasmídeo pET-28a(+).em função do tempo (h), influenciado pela variação de $CaCl_2$.

Os resultados deste experimento com o clone em pET-28a(+) mostraram uma ausência significativa de crescimento de colônias em praticamente todas as amostras ao longo de 24 horas. No início (0h), observou-se um crescimento celular inicial em todas as amostras. No entanto, as amostras contendo concentrações de 1mM e 5mM de $CaCl_2$ apresentaram os menores índices de crescimento celular, aproximadamente 64% e 48%, respectivamente.

A **Tabela 7** sumariza os dados experimentais encontrados, bem como o desvio padrão de cada amostra:

Tabela 7: Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias em meio com diferentes concentrações de $CaCl_2$ nos períodos de 0h e 24h

	0h	0h	24h	24h
	Média (UFC)	**Desvio Padrão**	**Média (UFC)**	**Desvio Padrão**
Controle (sem $CaCl_2$ e sem IPTG)	$1{,}73 \times 10^7$	$3{,}32 \times 10^6$	$2{,}52 \times 10^7$	$1{,}05 \times 10^6$
0 $CaCl_2$	$1{,}67 \times 10^7$	$1{,}34 \times 10^6$	$2{,}00 \times 10^5$	$1{,}41 \times 10^6$
10 µM $CaCl_2$	$2{,}35 \times 10^7$	$2{,}55 \times 10^6$	$3{,}00 \times 10^5$	0
100 µM $CaCl_2$	$2{,}34 \times 10^7$	$4{,}24 \times 10^6$	$5{,}00 \times 10^4$	$7{,}07 \times 10^4$
1 mM $CaCl_2$	$8{,}25 \times 10^6$	$1{,}63 \times 10^6$	$2{,}00 \times 10^5$	$2{,}83 \times 10^5$
5 mM $CaCl_2$	$1{,}11 \times 10^7$	$3{,}54 \times 10^5$	0	0

Assim sendo, ao comparar os resultados desses testes, tanto para o clone com origem de replicação pColA quanto para o teste realizado com o clone em pET-28a(+) é possível verificar uma maior efetividade na inibição do crescimento celular quando testada com o clone em pET-28a(+). Independentemente da variação da concentração de cálcio no meio, todas as concentrações de $CaCl_2$ inibiram o crescimento celular, conforme já demonstrado. Dentre todas essas concentrações, a amostra contendo 5 mM foi a que inibiu completamente o crescimento, porém, ao se analisar os resultados de forma abrangente, a amostra com concentração de 1 mM se destacou pelo fato de que, além de ter apresentado um crescimento celular abaixo de 1%, também obteve o menor resultado no horário inicial (0h) do experimento.

Conforme consta na literatura, experimentos de fluorescência intrínseca baseados na adição crescente de $CaCl_2$ revelaram que a concentração de 1 mM de cálcio promoveu uma mudança estrutural reversível na metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*, sugerindo que essa concentração exerce influência significativa na conformação da enzima, afetando sua atividade e modulação de especificidade [12].

3.3 TESTE DO CRESCIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) MEDIANTE ADIÇÃO DE GLICOSE

Para avaliar a influência da glicose no crescimento das colônias expressando TbMCA-IIa em pET-28a(+), foi realizado o plote da quantidade de unidades

formadoras de colônias (UFC) encontradas nas placas referentes aos períodos de 0h e 24h, apresentado pela **Figura 7**.

Figura 7: Efeito da adição de glicose no crescimento das colônias com o gene da TbMCA-IIa em pET-28a(+)

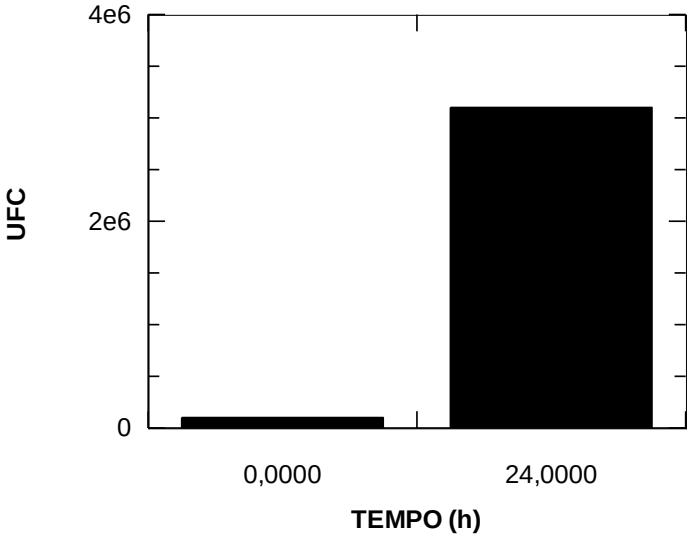


Gráfico referente ao número de Unidades Formadoras de Colônia do gene da TbMCA-IIa no plasmídeo pET-28a(+).em função do tempo (h), influenciado pela adição de glicose no meio.

Ao analisar os resultados, é possível observar um aumento no crescimento das colônias ao comparar o período de 0 horas com o de 24 horas, o que evidencia a influência da glicose nas dinâmicas de crescimento. Estudos anteriores já descreveram que a presença de glicose exerce uma influência significativa no processo de morte celular programada em leveduras, como destacado em estudos com *Saccharomyces cerevisiae*. Essas pesquisas indicaram que o estresse hiperosmótico, associado a altas concentrações de glicose, pode desencadear apoptose celular. Em experimentos com cepas mutantes, observou-se uma menor ativação de caspases, sugerindo maior sobrevivência celular em resposta ao estresse hiperosmótico [13].

Além disso, o gene da TbMCA-IIa inserido no vetor de expressão pET-28a(+) permite a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*. O sistema pET utiliza componentes do *operon lac* da *E. coli*, como o promotor *lac*, para regular a expressão dos genes. Sob condições normais, a transcrição dos genes do *operon lac*, incluindo aqueles que codificam a T7 RNA polimerase necessária para a expressão do gene alvo, é inibida na presença de glicose. Isso significa que a glicose atua como um

inibidor natural do *operon lac*, limitando a produção de T7 RNA polimerase e, consequentemente, controlando a expressão da proteína recombinante [14,15].

Ao relacionar essas informações com o efeito da adição de glicose no crescimento das colônias neste estudo, é possível verificar que houve inibição da expressão da metacaspase, indicado pelo aumento no crescimento das colônias após 24 horas.

Portanto, a presença de glicose no meio de crescimento funciona como um mecanismo de regulação negativa sobre a expressão gênica controlada pelo *operon lac*, destacando o papel significativo da glicose na regulação da morte celular programada no *Trypanosoma brucei*, possuindo relevância no desenvolvimento do sistema celular de seleção de inibidores para posterior testes com bibliotecas de peptídeos.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, foi realizada a construção de um sistema celular de seleção de inibidores específico para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa).

A clonagem do gene da TbMCA-IIa utilizando o plasmídeo com origem de replicação pColA demonstrou-se satisfatória, permitindo a realização de testes subsequentes com diferentes concentrações de $CaCl_2$ para analisar o efeito no crescimento celular.

Os resultados do teste de cálcio com o clone obtido nesse trabalho mostraram que a expressão da metacaspase induzida pelo promotor de arabinose afetou o crescimento celular, sendo que a amostra sem adição de $CaCl_2$ resultou no menor crescimento celular do experimento com o plasmídeo pColA. Em comparação, o clone contendo o gene da TbMCA-IIa no plasmídeo pET-28a(+) demonstrou maior eficiência nos testes com $CaCl_2$, uma vez que com uma concentração menor de $CaCl_2$ (1 mM) resultou em uma maior redução no crescimento celular tanto no período inicial do experimento (0h) como no final (24h).

No teste com glicose realizado no clone em pET-28a(+), foi observado que a adição desse açúcar influenciou o crescimento das células, o que demonstra sua importância na viabilidade celular e regulação da expressão gênica.

Nesse estudo, foi possível realizar a construção de um sistema celular de seleção de inibidores para a matacaspase-2 de *Trypanosoma brucei,* tendo em vista que os resultados apresentados referentes a influência da adição de $CaCl_2$ e glicose no crescimento das colônias podem validar a viabilidade desse sistema proposto, possibilitando a realização de posteriores testes com bibliotecas de peptídeos para impulsionar a inovação de estratégias na busca por inibidores mais específicos para essa enzima, e consequentemente possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a Tripanossomíase Humana Africana.

REFERÊNCIAS

1 SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. 2018.

2 SANDERSJÖÖ, L. et al. A protease substrate profiling method that links site-specific proteolysis with antibiotic resistance. **Biotechnology journal**, v. 9, n. 1, p. 155–162, jan. 2014.

3 CUDIC, M.; FIELDS, G. Extracellular proteases as targets for drug development. **Current protein & peptide science**, v. 10, n. 4, p. 297–307, 1 ago. 2009.

4 OMIDFAR, K., & DANESHPOUR, M. (2015). *Advances in phage display technology for drug discovery.* ***Expert Opinion on Drug Discovery****, 10(6), 651–669.* doi:10.1517/17460441.2015.1037738

5 BIJLMAKERS, M. J. Ubiquitination and the Proteasome as Drug Targets in Trypanosomatid Diseases. **Frontiers in chemistry**, v. 8, 28 jan. 2021.

6 POUDYAL, N. R.; PAUL, K. S. Fatty acid uptake in Trypanosoma brucei: Host resources and possible mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, 21 nov. 2022.

7 FALL, F. et al. Trypanosoma brucei: Metabolomics for analysis of cellular metabolism and drug discovery. **Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society**, v. 18, n. 4, 1 abr. 2022.

8 HELMS, M. J. et al. Bloodstream form Trypanosoma brucei depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 6, p. 1105–1117, 15 mar. 2006

9 .XIA, Y. et al. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 3, 20 fev. 2019.

10 HANAHAN, D.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R. Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. **Methods in enzymology**, v. 204, n. C, p. 63–113, 1 jan. 1991.

11 MOSS, C. X. et al. Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. **FEBS Letters**, v. 581, n. 29, p. 5635–5639, 11 dez. 2007.

12 MACHADO, M. F. M. et al. Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2. **The FEBS journal**, v. 280, n. 11, p. 2608, jun. 2013

13 SILVA, R. D. et al. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in Saccharomyces cerevisiae. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 824–834, 1 nov. 2005

14 DU, F., LIU, YQ., XU, YS. *et al.* Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact* **20**, 189 (2021). https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6

15 NOVY R, MORRIS B. Use of glucose to control basal expression in the pET System. **inNovations**. 2001;13:8–10.

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo apresenta avanços significativos na identificação de potenciais inibidores para TbMCA-IIa, associada ao *Trypanosoma brucei*, agente causador da Doença do Sono Africana, bem como a apresenta um sistema de seleção celular de inibidores específicos para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa).

No contexto dos ensaios de atividade enzimática, os compostos derivados de éter de oxima (AO-7, AO-12 e EO-20) e os compostos naturais derivados de chalconas e flavonoides (EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C) demonstraram ser promissores como potenciais inibidores da metacaspase TbMCA-IIa, apresentando valores de IC_{50} inferiores aos previamente relatados, o que indica uma forte capacidade de inibição da atividade da enzima.

Dentre os compostos derivados de éter de oxima, destaca-se o composto AO-12, que além de ter um valor de IC_{50} baixo, chamou atenção por demonstrar um mecanismo de inibição não competitivo, sugerindo uma preferência por interações alostéricas dentro da enzima. Essa descoberta é fundamental, pois indica que esses compostos têm o potencial de interromper efetivamente a atividade da metacaspase, o que é um passo importante no desenvolvimento de tratamentos para a Doença do Sono Africana.

Além disso, a eficácia dos compostos derivados de chalconas e flavonoides, como EM-1A, EM-1B, EM-1C e EM-F12C, na redução da atividade enzimática também foi observada. As chalconas mostraram-se mais eficazes do que os flavonoides na redução da atividade enzimática, com destaque para o composto EM-1A, derivado das chalconas, que apresentou uma atividade remanescente de cerca de 13%, enquanto o composto EM-F12C, derivado dos flavonoides, teve uma atividade remanescente de aproximadamente 24%. Todos os compostos testados mostraram capacidade satisfatória de inibição, com valores de IC_{50} na faixa de 2,14 a 7,55 µM, sendo que três deles (EM-1A, EM-1C e EM-F12C) exibiram um perfil competitivo de inibição, enquanto o EM-1B mostrou um perfil de inibição não competitiva.

Acerca dos resultados encontrados para o desenvolvimento do sistema celular de seleção de inibidores específicos para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-IIa), os mesmos foram promissores. A clonagem bem-sucedida utilizando o plasmídeo com origem de replicação pColA permitiu experimentos com diferentes

concentrações de $CaCl_2$ para avaliar o crescimento celular, os quais observou-se uma influência no crescimento.

Por outro lado, o clone contendo o gene da TbMCA-IIa no plasmídeo pET-28a(+) demonstrou maior eficiência nos testes com $CaCl_2$, com uma concentração menor (1 mM) resultando em uma maior redução no crescimento celular. Além disso, um teste realizado com glicose no clone em pET-28a(+) revelou que a adição desse açúcar influenciou significativamente o crescimento das células, validando a viabilidade desse sistema de seleção celular de inibidores específicos proposto para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei*.

Os resultados desses estudos apontam para o potencial dos compostos derivados de chalconas e flavonoides como agentes terapêuticos para a Tripanossomíase Humana Africana, oferecendo uma ampliação significativa das opções de tratamento disponíveis. No entanto, ainda são necessários estudos adicionais para avaliar sua eficácia e segurança, destacando a importância dessas descobertas para o desenvolvimento de novas terapias contra essa doença em questão.

Ademais, os resultados sugerem que a construção do sistema celular de seleção de inibidores para a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* proporciona uma perspectiva promissora para futuras pesquisas nesse campo, principalmente no que se refere a testes com bibliotecas de inibidores, visando encontrar tratamentos mais específicos e eficazes para a Tripanossomíase Humana Africana.

REFERÊNCIAS

BADSHAH, Syed Lal; FAISAL, Shah; MUHAMMAD, Akhtar; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz. Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [*S.l.*], v. 140, n. 111596, p.1-29, ago. 2021. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111596. Acesso em: 17 jul. 2023.

BARREIRO, J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 3. ed. Porto Alegre, Artmed Editora, 2015. 608 p.

BARRETT, A. J. **Proteolytic Enzymes**: Serine and Cysteine Peptidases. Virginia: Academic Press, 1994. 765 p.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Oxford: Academic Press, 2012. 4094 p.

BERG, M.; VEKEN, P. V. D.; JOOSSENS, J.; MUTHUSAMY, V.; BREUGELMANS, M.; MOSS, C. X.; RUDOLF, J.; COS, P.; COOMBS, G. H.; MAES, L.; HAEMERS, A.; MOTTRAM, J.; AUGUSTYNS, K. Design and evaluation of *Trypanosoma brucei* metacaspase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, n.6, p. 2001-2006, 2010.

BRIX, K.; STÖCKER, W. **Proteases**: Structure and Function. Wien: Springer Science & Business Media, 2014.

COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

CUSHNIE, T.P. Tim; LAMB, Andrew J.. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 343-356, nov. 2005. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002. Acesso em: 17 jul. 2023.

DIAS, Maria Celeste; PINTO, Diana C. G. A.; SILVA, Artur M. S.. Plant Flavonoids: chemical characteristics and biological activity. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 5377, 4 set. 2021. MDPI AG. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/molecules26175377. Acesso em: 17 jul. 2023.

FALL, Fanta; MAMEDE, Lucia; SCHIOPPA, Laura; LEDOUX, Allison; TULLIO, Pascal de; MICHELS, Paul; FRÉDÉRICH, Michel; QUETIN-LECLERCQ, Joëlle. Trypanosoma brucei: metabolomics for analysis of cellular metabolism and drug discovery. **Metabolomics**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 1-18, 19 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s11306-022-01880-0. Acesso em 17 jul. 2023.

GAO, Jiang-Mei; QIAN, Zheng-Yu; HIDE, Geoff; LAI, De-Hua; LUN, Zhao-Rong; WU, Zhong-Dao. Human African trypanosomiasis: the current situation in endemic regions

and the risks for non-endemic regions from imported cases. **Parasitology**, [S.L.], v. 147, n. 9, p. 922-931, 27 abr. 2020. Cambridge University Press (CUP). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1017/s0031182020000645. Acesso em: 17 jul. 2023.

GILIO, Joyce M.; MARCONDES, Marcelo F.; FERRARI, Débora; JULIANO, Maria A.; JULIANO, Luiz; OLIVEIRA, Vitor; MACHADO, Maurício F.M.. Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1865, n. 4, p. 388-394, abr. 2017. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.002. Acesso em: 18 jul. 2023
HELMS, M. J.; AMBIT, A.; APPLETON, P.; TETLEY, L.; COOMBS, G. H.; Jasim, H.A.; Nahar, L.; Jasim, M.A.; Moore, S.A.; Ritchie, K.J.; Sarker, S.D. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Lea Disponível em: https://doi.org/10.3390/biom110812036. Acesso em: 17 jul. 2023.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Structural and Functional Diversity of Caspase Homologues in Non-Metazoan Organisms. **Protoplasma**, v.255, n.1, p. 387– 397, 2017.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Type III Metacaspases: Calcium-Dependent Activity Proposes New Function for The P10 Domain. **New Phytologist**, v.218, n.3, p. 1179–1191, 2017.

KOSMALSKI, Tomasz; KUPCZYK, Daria; BAUMGART, Szymon; PAPROCKA, Renata; STUDZIńSKA, Renata. A Review of Biologically Active Oxime Ethers. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 13, p. 5041, 28 jun. 2023. MDPI AG. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3390/molecules28135041. Acesso em: 17 jul. 2023.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry.** United States: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.1377 p.

MACHADO, M. F. M.; MARCONDES, M. F.; JULIANO, M. A.; MCLUSKEY, K., MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinetics:** A Modern Approach. New Jersey, United States: John Wiley & Sons, 2003. 248 p.

MAXFIELD L, Bermudez R. Human African Trypanosomiasis. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 30571034.

MCLUSKEY, K.; MOSS, C. X; MOTTRAM, J. C. Purification, Characterization, and Crystallization of Trypanosoma Metacaspases. **Caspases, Paracaspases, and Metacaspases,** p. 203–221, 2014.

MIRJAFARY, Zohreh; ABDOLI, Morteza; SAEIDIAN, Hamid; KAKANEJADIFARD, Ali; FARNIA, S. Morteza F.. Review of the synthesis of acyclic and cyclic oxime ethers. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 6, n. 21, p. 17740-17758, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1039/c5ra25591k. Acesso em: 18 jul. 2023.

MOTTRAM, J. C. Bloodstream Form *Trypanosoma brucei* Depend Upon Multiple Metacaspases Associated With RAB11- Positive Endosomes. **Journal of Cell Science,** v.119, n.6, p. 1105–1117, 2006.

MOTTRAM, J. C.; HELMS, M. J.; COOMBS, G. H.; SAJID, M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends in Parasitology**, v.19, n.4, p. 182– 187, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PEREIRA, Rui; SILVA, Artur M.s.; RIBEIRO, Daniela; SILVA, Vera L.M.; FERNANDES, Eduarda. Bis-chalcones: a review of synthetic methodologies and anti-inflammatory effects. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 252, p. 115280, abr. 2023. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115280. Acesso em: 19 jul. 2023.

RODGERS, Jean. Human African trypanosomiasis, chemotherapy and CNS disease. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.L.], v. 211, n. 1-2, p. 16-22, jun. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.02.007.

RUFER, Arne Christian. Drug discovery for enzymes. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 875-886, abr. 2021. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.006. Acesso em: 19 jul. 2023.

SAHU, N. K.; BALBHADRA, S. S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D. V.. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: a review. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 209-225, 1 jan. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2174/092986712803414132. Acesso em 19 jul. 2023.

SALVESEN, G.S.; HEMPEL, A.; COLL, N.S. Protease Signaling In Animal And Plant-Regulated Cell Death. **FEBS Journal** v.283, n.14 p. 2577–2598, 2016.

SCHECHTER, Israel; BERGER, Arieh. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 157-162, abr. 1967. Elsevier BV. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(67)80055-x. Acesso em: 19 jul. 2023.

SCHNELL, Santiago. Validity of the Michaelis–Menten equation – steady-state or reactant stationary assumption: that is the question. **The Febs Journal**, [S.L.], v. 281, n. 2, p. 464-472, 18 nov. 2013. Wiley. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1111/febs.12564. Acesso em 20 jul. 2023.

ŞENTÜRK, M. **Enzyme Inhibitors and Activators.** Croatia: Bod – Books on Demand, 2017. 268 p.

SHARMA, R. **Enzyme Inhibition and Bioapplications.** Croatia: Bod – Books on Demand, 2012.

SMITH, H. J.; SIMONS, C. **Enzymes and Their Inhibitors: Drug Development.** United States: CRC Press, 2004. 328 p.

SRINIVASAN, Bharath. Explicit Treatment of Non-Michaelis-Menten and Atypical Kinetics in Early Drug Discovery**. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 899-918, 28 dez. 2020. Wiley. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000791. Acesso em: 20 jul. 2023.

TRONCOSO, Franco David; SÁNCHEZ, Daniel Alberto; FERREIRA, María Luján. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: an updated review. **Chemistryopen**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 1-18, mar. 2022. Wiley. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/open.202200017. Acesso em: 20 jul. 2023.

VERCAMMEN, D.; COTTE, B.; JAEGER, G.; EECKHOUT, D.; CASTEELS, P.; VANDEPOELE, K.; VANDENBERGHE, I.; BEEUMEN, J.; INZE, D.; WALSH, G. **Proteins: Biochemistry and Biotechnology.** England: John Wiley & Sons, 2002. 547 p.

WHO. **Human African trypanosomiasis (sleeping sickness)**. 2023. Disponível em: https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/human-african-trypanosomiasis. Acesso em: 20 jul. 2023.

WOLFENDEN, Richard; SNIDER, Mark J.. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. **Accounts Of Chemical Research**, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 938-945, 10 out. 2001. American Chemical Society (ACS). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1021/ar000058i. Acesso em: 20 jul. 2023.

WONG, C.; WHITESIDES, G. M. **Enzymes in Synthetic Organic Chemistry.** United Kingdom: Elsevier, 2013. 384