Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Planejamento racional de candidatos a fármacos inibidores de glicogênio
sintase cinase – 3 beta (GSK-3 β) em doença de Alzheimer**

JOÃO GABRIEL CURTOLO POIANI

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da
Silva

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

VERSÃO CORRIGIDA

Poiani, João Gabriel Curtolo

Planejamento racional de candidato a fármacos inibidores de glicogênio sintase cinase – 3 beta (GSK-3 β) em doença de Alzheimer. Ribeirão Preto, 2017.

96 p : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Henrique Tomich de Paula da Silva, Carlos.

1. Alzheimer. 2. Triagem virtual. 3. Glicogênio sintase cinase. 4. Modelagem molecular. 5. Planejamento de fármacos.

João Gabriel Curtolo Poiani, **Planejamento racional de candidatos a fármacos inibidores de glicogênio sintase cinase – 3 beta (GSK-3 β) em doença de Alzheimer**. Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho à Deus, por sua
infinita luz e onipresença.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me guiar num caminho de luz e bondade.

À minha família, que sempre me apoiou nas minhas escolhas e decisões.

À minha esposa Daniela, por estar sempre ao meu lado e por toda ajuda, incentivo e conselhos.

Ao meu orientador Carlos, por todo aprendizado, desenvolvimento, apoio, suporte, críticas e discussões.

Aos meus colegas de trabalho Jonathan, Ricardo e Leonardo que conviveram diariamente comigo e também participaram ativamente do meu desenvolvimento.

À todos os membros da química farmacêutica pelo convívio diário e interação durante todo esse período, tornando o processo muito saudável e positivo.

Ao programa de pós-graduação em química da FFCLRP pela assessoria e coordenação, tornando esse processo possível.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar
novas paisagens, mas em ter novos olhos.”*

Marcel Proust

RESUMO

Poiani, J.G.C. **Planejamento racional de candidatos a fármacos inibidores de glicogênio sintase cinase – 3 beta (GSK-3 β) em doença de Alzheimer**, 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A Doença de Alzheimer (DA) é um transtorno progressivo que acomete o Sistema Nervoso Central, causando demência em idosos. A doença leva a uma diminuição da memória, dificuldade no raciocínio e pensamento e alterações comportamentais. A fisiopatologia da doença corresponde ao aumento na concentração do peptídeo β -amilóide com consequente deposição e formação da placa amiloide; e também ao aparecimento dos emaranhados neurofibrilares, que são agregados de proteína tau hiperfosforilada. A enzima glicogênio sintase cinase – 3 beta (GSK-3 β) está diretamente envolvida nos dois processos e, por isso, a busca por novos inibidores dessa enzima é uma importante estratégia terapêutica para o tratamento da doença. Neste trabalho utilizou-se a triagem virtual em 7 bancos de dados de moléculas aplicando cinco diferentes estratégias *in silico*, através de planejamento de fármacos baseado em ligantes e baseado em estrutura, combinada com estudos *in silico* de farmacocinética, toxicidade e atividade biológica, seguido de posteriores ensaios de inibição enzimática *in vitro*. Obteve-se três compostos pela metodologia de farmacóforo, (Estratégia 3) dos quais dois deles demonstraram atividade inibitória interessante para GSK-3 β , na faixa de micromolar. A partir das outras quatro estratégias foram selecionados 16 compostos que futuramente serão também testados utilizando o mesmo protocolo de ensaio *in vitro* aqui utilizado.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Proteínas cinases, Glicogênio sintase cinase, Triagem virtual, Planejamento de fármacos.

ABSTRACT

Poiani, J.G.C. **Rational design of drug candidates for glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) inhibitors in Alzheimer's disease**, 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive disorder that affects the Central Nervous System, causing dementia in the elderly. The disease leads to decreased memory, difficulty in reasoning and thinking, and behavioral changes. The pathophysiology of the disease corresponds to the increase in β -amyloid peptide concentration with consequent deposition and formation of the amyloid plaque and to the appearance of neurofibrillary tangles, which are aggregates of hyperphosphorylated tau protein. The enzyme glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) is directly involved in both processes and, therefore, the search for new inhibitors of this enzyme is an important therapeutic strategy for the treatment of the disease. In this work, we used virtual screening in 7 molecule databases applying five different *in silico* strategies, using the ligand-based and structure-based drug design methodologies, combined with *in silico* studies of pharmacokinetics, toxicity and biological activity, followed by subsequent assays enzymatic inhibition *in vitro*. We obtained three compounds by the pharmacophore methodology (Strategy 3) of which two of them demonstrated interesting inhibitory activity for GSK-3 β in the micromolar range. From the other four strategies, 16 compounds were selected which in future will also be tested using the same *in vitro* assay protocol used here.

Keywords: Alzheimer's disease, Protein kinases, Glycogen synthase kinase, Virtual screening, Drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Demonstração do dano cerebral e morte neuronal em DA. À esquerda um cérebro saudável. À direita um cérebro em fase avançada da doença no qual é possível observar a perda neuronal, principalmente nas regiões de memória e linguagem.

Figura 2: Mecanismo de formação da placa amiloide através de uma rede de fibrila composta de dímeros de A β .

Figura 3: Esquema demonstrativo do processo de formação dos emaranhados neurofibrilares. Em cima, o neurônio saudável. Embaixo, a proteína tau hiperfosforilada se aglomerando para formar os EN, e consequente desestabilização dos microtúbulos.

Figura 4: Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da DA aprovados pelo FDA.

Figura 5: Esquema representando a relação entre a DA e o DMT2 pelo olhar da RI. a. disfunção mitocondrial. b. altas concentrações de hemoglobina glicosilada. c. estresse oxidativo induzido por A β e proteína tau. d. inflamação causada pela disfunção mitocondrial. e. ativação do canal iônico voltagem-dependente por A β .

Figura 6: Esquema demonstrando todos os processos de regulação na sinalização celular envolvidos com a GSK-3 β .

Figura 7: Estrutura terciária da GSK-3 β complexada com um inibidor AMP-PNP ligado no sítio do ATP. O domínio das folhas- β está representado em verde. O domínio das hélices- α está indicado em vermelho. O loop de ativação é visualizado em amarelo.

Figura 8: Ilustração das interações entre os inibidores (a) AMP-PNP, (b) estaurosporina, (c) indirubina-3-monoxima, (d) alsterpaulona e resíduos do sítio ativo da GSK-3 β . Inibidores estão representados em cor laranja; moléculas de água e Mg²⁺ estão representados em vermelho e amarelo, respectivamente. Os domínios N- e C-terminais estão representados em azul e verde.

Figura 9: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 1. Utilizou-se as 7 bases de dados (300) para cada um dos 3 modelos de similaridade selecionados. Primeiro uma triagem por forma no programa **ROCS**, selecionando os 2000 melhores, depois no programa **EON**, selecionando os 100 melhores.

Figura 10: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 2, utilizando-se as 7 bases de dados. Através do programa **GOLD**, primeiramente com o modo VS, selecionando os 5000 melhores, depois com o modo XP, selecionando os 100 melhores compostos.

Figura 11: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 3. Cada uma das 7 bases de dados no programa **Discovery Studio**. Primeiro no modo FAST, selecionando os 5000 melhores, depois no modo BEST, selecionando os 100 melhores. Geração de confôrmeros pelo OMEGA e por último o modo NONE, selecionando os 100 melhores.

Figura 12: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 4. Com o primeiro resultado do modo VS do **GOLD** (Estratégia 2), foi feita, para cada modelo, uma triagem por forma no programa **ROCS**, selecionando os 2000 melhores, depois uma triagem por eletrostática no programa **EON**, selecionando os 100 melhores compostos.

Figura 13: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 5. Com o primeiro resultado do modo FAST do **Discovery Studio** (Estratégia 3), foi feita, para cada modelo, uma triagem por forma no programa **ROCS**, selecionando os 2000 melhores, depois uma triagem por eletrostática no programa **EON**, selecionando os 100 melhores compostos.

Figura 14: Esquema dos estudos de predição (farmacocinética, toxicidade e atividade biológica, assim como as proposições de modo de ligação com o *docking ensemble* e a inspeção visual final como últimos filtros na seleção dos compostos.

Figura 15: Estrutura 2D de alguns dos inibidores dentre os mais ativos selecionados do web servidor BindingDB.

Figura 16: Representação 2D dos 3 inibidores selecionados como modelos de similaridade: IXM (a), Z48 (b) e 7YG (c), referente aos complexos cristalográficos de código PDB 1Q41, 3I4B e 4ACC respectivamente.

Figura 17: Representação 3D dos 3 inibidores selecionados para buscas por similaridade em bancos de dados de moléculas. IXM (a) carbonos em azul, Z48 (b) em verde e 7YG (c) em cor laranja.

Figura 18: Sobreposição dos três inibidores selecionados como modelos de similaridade, evidenciando sua complementariedade graças à exploração de diferentes regiões do sítio ativo da enzima.

Figura 19: Estrutura dos três complexos selecionados, evidenciando a boa similaridade estrutural e sobreposição dos resíduos de aminoácidos. Os círculos pretos destacam a posição do resíduo Phe67 em cada complexo, que se ajusta no sítio ativo da GSK-3 β de acordo com o tamanho do inibidor ligado.

Figura 20: Complexo cristalográfico do inibidor IXM (a) na estrutura de código PDB 1Q41, evidenciando as principais interações com a enzima.

Figura 21: Complexo cristalográfico do inibidor 7YG (c) da estrutura de código PDB 4ACC, evidenciando as principais interações com a enzima.

Figura 22: Complexo cristalográfico do inibidor Z48 (b) na estrutura de código PDB 3I4B evidenciando as principais interações com a enzima.

Figura 23: Resultado obtido com o uso do web servidor **PharmaGist**, mostrando a sobreposição das 29 moléculas utilizada para gerar o modelo farmacofórico utilizado: 3 grupos aromáticos (esferas azuis), 1 doador de ligação de hidrogênio (esfera amarela) e 1 aceitador de ligação de hidrogênio (esfera verde).

Figura 24: Padrão farmacofórico comum obtido para 10 inibidores cristalográficos, aqui sobrepostos no interior do sítio ativo da GSK-3 β . O modelo contém 1 grupo hidrofóbico aromático (esfera azul escura), 1 hidrofóbico (esfera azul clara) e 1 grupo aceitador de ligação de hidrogênio (esfera verde). O grupo aceitador de ligação de hidrogênio contém duas esferas, onde a menor deve-se aos inibidores, enquanto a maior (dita “esfera de exclusão”) indica a posição do resíduo (Val135, via nitrogênio de cadeia principal) que doa ligação de hidrogênio aos inibidores.

Figura 25: Representação do complexo cristalográfico código PDB 4ACC selecionado para os estudos de *docking* juntamente com seu ligante 7YG e os principais resíduos de aminoácido responsáveis pela interação no sítio ativo da GSK-3 β . A esfera em vermelho represente o ponto central da esfera.

Figura 26: Descrição da Estratégia 1, os resultados provenientes das triagens em cada base de dados para cada um dos 3 modelos de similaridade.

Figura 27: Descrição da Estratégia 2, com todos os resultados provenientes de cada base de dados.

Figura 28: Descrição da Estratégia 3, com todos os resultados provenientes de cada base de dados.

Figura 29: Descrição da Estratégia 4, os resultados provenientes das triagens em cada base de dados para cada um dos 3 modelos de similaridade.

Figura 30: Descrição da Estratégia 5, os resultados provenientes das triagens em cada base de dados para cada um dos 3 modelos de similaridade.

Figura 31: Representação 2D dos 19 compostos selecionados através das 5 Estratégias.

Figura 32: *Layout* do programa **Derek**, mostrando as moléculas analisadas, o progresso das predições e todos os alertas para cada uma delas.

Figura 33: Validação do inibidor IXM (a), referente ao complexo de código PDB 1Q41 para os estudos de *docking ensemble*. Com carbonos em azul, o inibidor na conformação cristalográfica e, em cinza, o resultado obtido na validação.

Figura 34: Validação do inibidor Z48 (b), referente ao complexo de código PDB 3I4B para os estudos de *docking ensemble*. Com carbonos em verde, o inibidor na conformação cristalográfica e, em cinza, o resultado obtido na validação.

Figura 35: Validação do inibidor 7YG (c), referente ao complexo de código PDB 4ACC para os estudos de *docking ensemble*. Com carbonos em cor laranja, o inibidor na conformação cristalográfica e, em cinza, o resultado obtido na validação.

Figura 36: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **1**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 37: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **2**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 38: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **3**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 39: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **4**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 40: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **5**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em laranja e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 41: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **6**. A pose obtida no estudo de *docking* (Estratégia 2) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 42: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **7**. A pose obtida no estudo de *docking* (Estratégia 2) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 43: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **8**. A pose obtida no estudo de *docking* (Estratégia 2) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 44: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **9**. A pose obtida no estudo de farmacóforo (Estratégia 3) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 45: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **10**. A pose obtida no estudo de farmacóforo (Estratégia 3) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 46: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **11**. A pose obtida no estudo de farmacóforo (Estratégia 3) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 47: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **12**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 48: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **13**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 49: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **14**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 50: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **15**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em laranja e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 51: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **16**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 52: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **17**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 53: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **18**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 54: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **19**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Figura 55: Representação 2D dos compostos **9, 10 e 11**.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fármacos disponível para tratamento da DA, seu nome comercial, indicação de uso de acordo com o estágio de evolução da doença e data de aprovação pelo FDA.

Tabela 2: Bases de dados utilizadas no projeto e o número de compostos de cada uma.

Tabela 3: Os 10 complexos não mutados de GSK-3 β com inibidores não-peptídicos disponíveis no **PDB**, com respectivas resoluções (em ângstroms) e seus valores de atividade, seja k_i ou IC_{50} , em faixa nanomolar de concentração.

Tabela 4: Valores de predição de % absorção oral para as 19 moléculas selecionadas.

Tabela 5: Valores de predição de log BB para as 19 moléculas selecionadas.

Tabela 6: Valores de predição de capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica para as 19 moléculas selecionadas.

Tabela 7: Predições de toxicidade para os 19 compostos selecionados.

Tabela 8: Valores de predição de atividade biológica obtidas para as 19 moléculas selecionadas.

Tabela 9: Resultados do ensaio de inibição enzimática dos três compostos selecionados através da Estratégia 3. Seus nomes e respectivas porcentagens de inibição de GSK-3 β , à concentração de 10 μ M.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β = Peptídeo β amilóide

ACh = Acetilcolina

AChE = Acetilcolinesterase

AGEs = Produtos finais de glicação avançada

AMP-PNP = Adenilil-imidodifosfato

APP = Proteína precursora de amiloide

ATP = Adenosina trifosfato

BACE = Beta secretase

BB = *Brain / blood*

BHE = Barreira hematoencefálica

BindingDB = Binding Database

CDK = Proteína cinase dependente de ciclina

CK = caseína cinase

CNS = *Central nervous system*

CSIC = *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*

DA = Doença de Alzheimer

DM = Diabetes Mellitus

DMSO = Dimetilsulfóxido

DMT1 = Diabetes Mellitus Tipo 1

DMT2 = Diabetes Mellitus Tipo 2

DMT3 = Diabetes Mellitus Tipo 3

EN = Emaranhados neurofibrilares

FDA = *Food and Drug Administration*

GS = Glicogênio sintase

GSK-3 = Glicogênio sintase cinase 3

GSK-3 α = Glicogênio sintase cinase 3 alfa

GSK-3 β = Glicogênio sintase cinase 3 beta

IC₅₀ = Concentração responsável por inibir 50% da enzima

k_i = constante de dissociação do inibidor

LBDD = Desenvolvimento de fármacos baseado em ligantes

MAPK = Proteína cinases ativadoras de mitógenos

NMDA = Receptor de N-metil-D-aspartato

PDB = Protein Data Bank

RI = Resistência à insulina

RMN = Ressonância magnética nuclear

RMSD = desvio médio quadrático

SBDD = Desenvolvimento de fármacos baseado em estrutura

SEA = *Similarity Ensemble Approach*

SNC = Sistema Nervoso Central

TK = Tirosina cinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER (DA).....	19
1.1.1	PLACA AMILOIDE	20
1.1.2	EMARANHADOS NEUROFIBRILARES (EN).....	21
1.1.3	HIPÓTESE COLINÉRGICA	22
1.1.4	HIPÓTESE GLUTAMATÉRGICA	22
1.1.5	TRATAMENTOS DISPONÍVEIS	22
1.1.6	DA E DIABETES MELLITUS (DM)	24
1.2	GLICOGÊNIO SINTASE CINASE - 3 (GSK-3)	25
1.2.1	GLICOGÊNIO SINTASE CINASE - 3 BETA (GSK-3B)	25
1.3	MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	30
1.3.1	PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM LIGANTES (LBDD)	31
1.3.2	PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO EM ESTRUTURA (SBDD).....	31
1.3.3	TRIAGEM VIRTUAL.....	32
1.3.4	ESTUDOS DE PREDIÇÃO	32
1.3.5	ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA IN VITRO	33
2	OBJETIVOS.....	35
3	METODOLOGIA	37
3.1	BUSCA POR COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS EM BANCOS DE DADOS.....	37
3.2	BUSCA POR COMPLEXOS CRISTALOGRAFICOS EM BANCOS DE DADOS.....	37
3.3	SELEÇÃO DE MODELOS DE SIMILARIDADE	37
3.4	DESENVOLVIMENTO DO MODELO FARMACOFÓRICO	38
3.5	VALIDAÇÃO DO MODELO FARMACOFÓRICO	38
3.6	DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE DOCKING	39
3.7	VALIDAÇÃO DO MODELO DE DOCKING.....	39
3.8	GERAÇÃO DE CONFÔRMEROS	40
3.9	BASES DE DADOS UTILIZADAS	40
3.10	TRIAGEM VIRTUAL	41
3.10.1	ESTRATÉGIA 1: TRIAGEM POR SIMILARIDADE DE FORMA E ELETROSTÁTICA	41

3.10.2	ESTRATÉGIA 2: TRIAGEM POR DOCKING	42
3.10.3	ESTRATÉGIA 3: TRIAGEM POR FARMACÓFORO	43
3.10.4	ESTRATÉGIA 4: TRIAGEM POR DOCKING + SIMILARIDADE	44
3.10.5	ESTRATÉGIA 5: TRIAGEM POR FARMACÓFORO + SIMILARIDADE	45
3.11	ESTUDOS DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	46
3.11.1	PREDIÇÃO DE FARMACOCINÉTICA	46
3.11.2	PREDIÇÃO DE TOXICIDADE	46
3.11.3	PREDIÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	47
3.12	<i>DOCKING ENSEMBLE</i>	47
3.13	INSPEÇÃO VISUAL	48
3.14	ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	49
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	<u>51</u>
4.1	BUSCA POR COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS EM BANCOS DE DADOS.....	51
4.2	BUSCA POR COMPLEXOS CRISTALOGRAFICOS EM BANCOS DE DADOS.....	51
4.3	BUSCA POR MODELOS DE SIMILARIDADE.....	52
4.4	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO FARMACOFÓRICO.....	56
4.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO DE <i>DOCKING</i>	58
4.6	TRIAGEM VIRTUAL.....	60
4.7	ESTUDOS DE PREDIÇÃO	66
4.8	<i>DOCKING ENSEMBLE</i>	66
4.9	INSPEÇÃO VISUAL	67
4.10	ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i>	88
5	<u>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</u>	<u>91</u>
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹</u>	<u>93</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer (DA)

Dentre as doenças neurodegenerativas, a Doença de Alzheimer (DA) é a mais comum, levando à demência em idosos. Acomete 10% da população mundial aos 65 anos e atinge cerca de 50% dos indivíduos com mais de 85 anos (REICHMAN, 2003). Foi descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907).

A DA é caracterizada pela perda sináptica e consequente morte neuronal. Os principais sintomas da doença são: diminuição da memória, déficit cognitivo, alterações comportamentais e dificuldade de raciocínio e pensamento (SHINTANI e UCHIDA, 1997; DVIR et al., 2002).

Figura 1: Demonstração do dano cerebral e morte neuronal em DA. À esquerda um cérebro saudável. À direita um cérebro em fase avançada da doença no qual é possível observar a perda neuronal, principalmente nas regiões de memória e linguagem.

BRIGHTFOCUS FOUNDATION, 2000

A fisiopatologia da doença é caracterizada pela deposição de placas neuríticas, ou placas amiloides, formadas predominantemente pela deposição do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e pelo aparecimento dos chamados emaranhados neurofibrilares (EN),

que são agregados de proteína tau hiperfosforilada (HANGER et al., 1992; LOVESTONE et al., 1994; LOVESTONE et al., 1996; WAGNER et al., 1996).

1.1.1 Placa Amiloide

A formação da placa amiloide ocorre graças ao acúmulo excessivo de A β que forma oligômeros no meio extracelular. Esses oligômeros se aglomeram para formar as placas amiloides. A β é gerado pela enzima beta-secretase (BACE) através de uma clivagem anormal da proteína precursora de amiloide (APP) (CHO e JOHNSON, 2003).

Numa situação fisiológica, ocorre a formação de monômeros e trímeros de A β , e isso não implica em DA. Porém, por algum motivo ainda não identificado, os monômeros atingem uma conformação anormal, facilitando assim, a formação dos dímeros de A β . Esses dímeros rapidamente formam uma rede de fibrila que se aglomeram formando as placas amiloides (Figura 2).

Figura 2: Mecanismo de formação da placa amiloide através de uma rede de fibrila composta de dímeros de A β .

LARSON e LESNÉ, 2012

Hoje já está bem documentado a maior relação da DA com oligômeros solúveis de A β do que com a placa amiloide propriamente dita. Acredita-se que a presença da placa amiloide não está ligada ao desenvolvimento da doença e é apenas um

mecanismo de defesa do organismo frente à toxicidade causada pelos oligômeros solúveis de A β (TERRY et al., 1991; DICKSON et al., 1995; LUE, MCLEAN, 1999).

1.1.2 Emaranhados neurofibrilares (EN)

Os EN são aglomerados de proteína tau hiperfosforilada. Proteína tau foi descrita pela primeira vez por Weingarten e colaboradores em 1975. Na verdade é uma sigla para um conjunto de proteínas associadas aos microtúbulos.

São expressas majoritariamente nos neurônios e sua principal função é realizar a estabilização dos microtúbulos. Ela atua como mediadora na polimerização de tubulina (WEINGARTEN et al., 1975).

Na DA, os mecanismos de regulação da sinalização celular estão alterados. Uma das implicações dessas alterações está na regulação da tau, que está hiperfosforilada. A proteína tau hiperfosforilada não é mais capaz de estabilizar os microtúbulos, perdendo assim sua função, se aglomerando e, por consequência, os EN são formados. (Figura 3) (BUÉE et al., 2000).

Figura 3: Esquema demonstrativo do processo de formação dos emaranhados neurofibrilares. Em cima, o neurônio saudável. Em baixo, a proteína tau hiperfosforilada se aglomerando para formar os EN, e consequente desestabilização dos microtúbulos.

1.1.3 Hipótese Colinérgica

Um outro padrão encontrado em pacientes com DA que foi diretamente associado à perda sináptica e déficit cognitivo foi a diminuição na concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica (BARTUS et al., 1982; COYLE et al., 1983).

A ACh é um importante neurotransmissor colinérgico que está intimamente relacionado com os processos de memória e aprendizagem e há uma correlação direta entre níveis de ACh e grau de severidade do déficit cognitivo (DEUTSCH, 1971).

A acetilcolinesterase (AChE) é a principal enzima responsável pela degradação de ACh. A inibição dessa enzima se mostrou eficiente em aumentar os níveis de ACh na fenda sináptica, bem como em ativar o sistema colinérgico. A busca por inibidores de AChE foi então a principal estratégia na busca por tratamentos para DA e, hoje, os medicamentos disponíveis são em sua grande maioria dessa classe de moléculas (GIACOBINI, 1998; DVIR et al., 2002; BENNETT et al., 2007).

1.1.4 Hipótese glutamatérgica

Uma outra característica observada em pacientes de DA é a disfunção na regulação do glutamato, processo esse que ocorre através do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAs). Em determinadas condições celulares ocorre uma ativação excessiva desse receptor, o qual é responsável, entre outras coisas, pela regulação do balanço eletrolítico celular, que é glutamato-dependente. Este processo, em DA, estaria desregulado, contribuindo para um aumento na toxicidade e, consequente, morte neuronal. Assim, um antagonismo nos NMDAs seria responsável por reverter esse processo (GREENAMYRE et al., 1987).

1.1.5 Tratamentos disponíveis

Os medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DA agem, basicamente, na melhora dos sintomas. A maioria deles está envolvida na regulação de ACh na fenda sináptica. Eles se ligam à AChE impedindo a degradação da ACh, aumentando sua concentração na fenda sináptica e, com isso, há uma melhora na cognição. São eles: Donepezil (Aricept®), Rivastigmina (Exelon®) e Galantamina (Reminyl®) (National Institute on Aging - <http://www.nia.nih.gov>).

Um outro fármaco também aprovado para o tratamento da DA foi a Memantina (Namenda®). Seu mecanismo de ação se dá pela hipótese glutamatérgica através do antagonismo do NMDAs, e é responsável também por melhoras cognitivas (JOHNSON e KOTERMANSKI, 2006).

Em 2014, foi liberado também uma associação de dois fármacos: Donepezil e Memantina, com o nome comercial de Namzaric®. Esse medicamento age tanto na inibição de AChE (Donepezil) quanto no antagonismo de NMDA (Memantina) e é utilizado para estágios mais avançados da doença.

Figura 4: Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da DA aprovados pelo FDA.

Tabela 1: Fármacos disponível para tratamento da DA, seu nome comercial, indicação de uso de acordo com o estágio de evolução da doença e data de aprovação pelo FDA.

Fármaco	Nome Comercial	Indicação	Data de aprovação
Donepezil	Aricept® (Pfizer)	Todos os estágios	1996
Rivastigmina	Exelon® (Novartis)	Todos os estágios	2000
Galantamina	Reminyl® (Janssen-Cilag)	Leve a moderado	2001
Memantina	Namenda® (Merz)	Moderado a severo	2003
Donepezil + Memantina	Namzaric® (Merz)	Moderado a severo	2014

1.1.6 DA e Diabetes Mellitus (DM)

Existem cada vez mais evidências de uma forte relação da DA com Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) e tipo 2 (DMT2), pois diversas características presentes nestas, estão também presentes em DA.

Essa relação é complexa, porém, bem fundamentada. Diversos trabalhos já utilizam a terminologia Diabetes Mellitus Tipo 3 (DMT3) se referindo à DA (DE LA MONTE e WANDS, 2008; ACCARDI et al., 2012; FERREIRA et al., 2014; LOURENCO et al., 2015; KANDIMALLA et al., 2016). A principal correlação ocorre devido ao metabolismo da insulina e geração da resistência à insulina (RI).

A RI gera uma cascata de sinalização que causará efeitos comuns para as duas doenças, efeitos esses, que podem ser observados na Figura 5. Em DM, a RI gera disfunção mitocondrial através do estresse oxidativo e consequente geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Também há aumento nas concentrações de A β e EN. Essa disfunção mitocondrial gera inflamação, perdas sinápticas e neuronais que, juntamente com a disfunção cognitiva causada pelo aumento nos níveis de hemoglobina glicada, cria todo o ambiente presente em DA (KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2016).

Figura 5: Esquema representando a relação entre a DA e o DMT2 pelo olhar da RI. a. disfunção mitocondrial. b. altas concentrações de hemoglobina glicosilada. c. estresse oxidativo induzido por A β e proteína tau. d. inflamação causada pela disfunção mitocondrial. e. ativação do canal iônico voltagem-dependente por A β .

KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2016

1.2 Glicogênio sintase cinase - 3 (GSK-3)

A glicogênio sintase cinase - 3 (GSK-3) é uma serino-treonina cinase que possui papel chave no metabolismo celular. Participa de uma série de processos celulares através de diversos mecanismos de sinalização celular. Está diretamente envolvida com o controle metabólico, desenvolvimento embrionário, morte celular e oncogênese (PLYTE et al. 1992; WOODGETT, 1994; KIM e KIMMEL, 2000; HARWOOD, 2001).

Além de DA, GSK-3 tem se destacado como um dos alvos terapêuticos mais atraentes também para diversas outras patologias, como Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), Câncer, entre outras (AVILA, HERNÁNDEZ, 2007; HOPPER, KILLICK, LOVESTONE, 2008; MARTINEZ, 2008).

Está presente no corpo humano sob duas isoformas: GSK-3 α e GSK-3 β . GSK-3 α está presente no organismo distribuída de uma forma geral em todos os órgãos e tecidos. Já GSK-3 β está presente majoritariamente no Sistema Nervoso Central (SNC) e isso a torna um bom alvo para estudos em DA (HOPPER, KILLICK, LOVESTONE, 2008).

1.2.1 Glicogênio sintase cinase - 3 beta (GSK-3 β)

É a isoforma predominante de GSK-3 β no SNC. Sua estrutura é composta de 420 aminoácidos e possui 47 kDa (WOODGETT, 1990). Está envolvida na regulação de diversas proteínas e processos de sinalização celular (Figura 6) e tem se destacado como um dos alvos terapêuticos mais atraentes para o tratamento de várias doenças neurológicas, incluindo a DA (AVILA, HERNÁNDEZ, 2007; HOPPER, KILLICK, LOVESTONE, 2008; MARTINEZ, 2008).

Figura 6: Esquema demonstrando todos os processos de regulação na sinalização celular envolvidos com a GSK-3 β .

Adaptado de PHUKAN et al., 2010

GSK-3 β está diretamente envolvida no metabolismo da glicose, atuando como inibidora da enzima glicogênio sintase (GS). Esse processo é mediado pela insulina. O tratamento com insulina é capaz de inibir a atividade de GSK-3 β em 50% (NIKOULINA et al, 2000).

Por estar diretamente envolvida no metabolismo da glicose, a inibição de GSK-3 β tem como principal efeito adverso a hipoglicemia e, por isso, a utilização de inibidores brandos é indicada (inibição de não mais que 25% da atividade de GSK-3 β) (MARTINEZ; GIL; PEREZ, 2011).

Apresenta em sua estrutura os dois domínios típicos presentes em proteínas cinases: um domínio folha- β amino-terminal, compreendendo os resíduos 35 a 134, acoplado a um domínio α -helicoidal carboxi-terminal, compreendendo os resíduos 139 a 343, tal como visualizado na Figura 7 (HANKS, QUINN, HUNTER, 1988; HANKS, QUINN, 1991; HUGHES et al., 1993; ABERLE et al., 1997; BAX et al., 2001; DAJANI et al., 2001; FRAME, COHEN, 2001; GRIMES, JOPE, 2001; ter HAAR et al., 2001).

O domínio N-terminal consiste de 7 folhas- β estendidas: as folhas- β 1-5 formam uma estrutura na forma de barril que é interrompida entre as folhas- β 3 e 4 por uma curta hélice- α (α C, resíduos 96-102) que empacota na direção contrária ao barril de folhas- β . Esta hélice- α é conservada em todas as proteínas cinases e dois de seus resíduos (Arg96 e Glu97) exercem papel importante na atividade catalítica da enzima. O loop de ativação (resíduos 200-226) situa-se ao longo da superfície da fenda de ligação do substrato.

Figura 7: Estrutura terciária da GSK-3 β complexada com um inibidor AMP-PNP ligado no sítio do ATP. O domínio das folhas- β está representado em verde. O domínio das hélices- α está indicado em vermelho. O *loop* de ativação é visualizado em amarelo.

O sítio de ligação de ATP está localizado na interface entre os domínios α -*helicoidal* e o das folhas- β estendidas e está envolvido por um *loop* rico em glicinas e uma estrutura na forma de dobradiça. A GSK-3 β possui dois sítios de fosforilação que influenciam a atividade catalítica da proteína: Ser9, localizada no N-terminal e Tyr216, localizada no loop de ativação. A fosforilação da Ser9 diminui a atividade catalítica da enzima, enquanto que Tyr216 fosforilada gera um aumento na atividade. A principal diferença estrutural entre a GSK-3 β na sua forma nativa e a fosforilada é a conformação da Tyr216.

A fosforilação provoca uma rotação de aproximadamente 120° na cadeia lateral da Tyr216 e reposicionamento das cadeias laterais da Arg220 e Arg223, para formar uma ligação de hidrogênio com o fosfato da Tyr216. Contudo, o principal loop de fosforilação mantém-se inalterado (BERTRAND et al., 2003; BHAT et al., 2003).

A atividade catalítica de proteínas cinase depende da correta justaposição dos grupos catalíticos, o que contribui para a transferência do grupo fosfato- γ do ATP para a cadeia lateral de um resíduo de serina, treonina ou tirosina do substrato. Um segundo fator são a acessibilidade e o correto posicionamento dos grupos que constituem o sítio ativo do substrato, os quais proporcionam afinidade e especificidade ao substrato (JOHNSON, NOBLE, OWEN, 1996; ter HAAR et al., 2001).

Análise de sítios fosforilados pela GSK-3 β (HONG et al., 2000) sugere uma preferência para o tipo Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr, onde o resíduo carbóxi-terminal Ser ou Thr encontra-se previamente fosforilado (FIOL et al., 1988; FIOL et al., 1990; WANG, ROACH, 1993).

Uma das características presentes em DA é possuir níveis de atividade de GSK-3 β aumentados e essa enzima está intimamente relacionada com a doença por atuar nos dois mecanismos da doença. Atua junto à BACE como facilitadora na clivagem de APP e consequente formação de A β (PHIEL et al., 2003; LATHER et al., 2008) e é a principal responsável pela fosforilação da proteína tau e consequente formação dos EN (HANGER et al., 1992).

Em um estudo com camundongos com DA, foi testado como a inibição de GSK3 β é capaz de reduzir a fosforilação da proteína tau e, com isso, avaliar a progressão da doença. No grupo teste, que conseguiu a diminuição na atividade de

GSK-3 β , foi observado uma diminuição na fosforilação da proteína tau e também uma melhora significativa na capacidade cognitiva (BIAN et al., 2016).

O primeiro inibidor reportado na literatura para GSK-3 β foi o lítio (KLEIN e MELTON, 1996), que já era utilizado há tempos para o tratamento de transtorno bipolar. O lítio é classificado como um inibidor fraco de GSK-3 β , com uma taxa de inibição de aproximadamente 25% ($k_i = 2$ mM) e seu mecanismo de ação ainda é incerto. Porém, por atingir diversos processos metabólicos, apresenta uma série de efeitos adversos.

Vários grupos de pesquisa têm identificado alternativamente pequenas moléculas como sendo potenciais inibidores da GSK-3 β (HERS; TAVARE; DENTON, 1999; COGHLAN et al., 2000; MEIJER et al., 2000; LECLERC et al., 2001; SMITH et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002). Himenialdisina ($IC_{50} = 10$ nM) (MEIJER et al., 2000), Paullonas ($IC_{50} = 4-80$ nM) (LEOST et al., 2000), Indirubinas ($IC_{50} = 5-50$ nM) (LECLERC et al., 2001), bisindolilmaleimida Ro31-8220, derivado da estaurosporina ($IC_{50} = 3-7$ nM) (HERS; TAVARE; DENTON, 1999), são exemplos de potentes inibidores da GSK-3 β .

Essas moléculas atuam competindo com o ATP pela ligação ao sítio ativo da GSK-3 β , inibindo a fosforilação da tau *in vivo* em sítios que são tipicamente fosforilados pela GSK-3. Bertrand e colaboradores analisaram as interações da GSK-3 β com os inibidores adenil imidodifosfato (AMP-PNP), estaurosporina, indirubina-3'-monoxima, alsterpaulona e o inibidor contendo uma maleimida como estrutura central, I-5 (Figura 8) e revelaram como esta enzima pode acomodar *scaffolds* moleculares relativamente diferentes (BERTRAND et al., 2003).

Figura 8: Ilustração das interações entre o inibidor AMP-PNP e resíduos do sítio ativo da GSK-3 β . O inibidor está representado em cor laranja; moléculas de água e Mg²⁺ estão representados em vermelho e amarelo, respectivamente. Os domínios N- e C- terminais estão representados em azul e verde.

Adaptado de BERTRAND et al., 2003

A estrutura cristalográfica do complexo da GSK-3 β com um análogo de ATP não-hidrolisável adenil imidodifosfato (AMP-PNP) - (Figura 8), código PDB 1PYX, 2,4 Å) (BERTRAND et al., 2003), fornece um bom entendimento de como os inibidores que mimetizam ATP interagem com a GSK-3 β . AMP-PNP e dois íons Mg²⁺ se ligam na fenda formada entre os domínios α -*helicoidal* e folha- β estendida da GSK-3 β , com o grupo adenina fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos Asp133 e Val135. Em adição às interações polares, o grupo adenina também faz interações hidrofóbicas com os resíduos Ile62, Val70, Ala83, Val110, Leu132, Tyr134 e Leu188 da GSK-3 β . O grupo ribose da AMP-PNP interage com a GSK-3 β através de uma única ligação de hidrogênio com Gln185.

1.3 Modelagem molecular no planejamento de fármacos

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, um processo que pode levar em média 11 anos ou mais, a química computacional vem se tornando, a cada dia, indispensável no planejamento racional de novos fármacos, já com inúmeros casos de sucesso envolvendo o emprego de suas metodologias (OPREA, 2005). Para Christopher Watson, da Novartis Institutes for BioMedical Research, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é hoje totalmente dependente das metodologias computacionais envolvidas (PEITSCH, 2004, JORGENSEN, 2004; OPREA, 2005).

As principais estratégias de planejamento computacional de fármacos podem ser divididas em dois grandes grupos: o “Planejamento de fármacos baseado em ligantes”, do inglês *ligand-based drug design* (LBDD) e o Planejamento de fármacos baseado em estrutura”, do inglês *structure-based drug design* (SBDD).

1.3.1 Planejamento de fármacos baseado em ligantes (LBDD)

O planejamento de fármacos baseado em ligantes (LBDD) tem sido empregado com sucesso na busca de novas moléculas (WANG et al., 2008). O LBDD utiliza informações e metodologia baseadas em moléculas sabidamente ativas para o alvo em questão, suas características e propriedades farmacodinâmicas (FOUDAH et al., 2014). As duas principais metodologias utilizadas no LBDD são: triagem por farmacóforo e triagem por similaridade.

Farmacóforo é definido como o conjunto de características estereoelétrônicas necessárias para se assegurar que as interações com um determinado alvo biológico sejam ótimas e assim, seja capaz de ativar (ou bloquear) sua resposta biológica (VERMUTH et al., 1998). Corresponde então a um modelo tridimensional que reúne as características essenciais para interação com o alvo, tais como grupos hidrofóbicos, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, aromáticos, iônicos, metálicos entre outros.

A busca por similaridade utiliza informações estruturais de moléculas sabidamente ativas para o alvo na busca por novas moléculas que mantenham essas características. Essa similaridade pode ser 2D (Índice de Tanimoto) ou 3D (forma e eletrostática) (CHEN e REYNOLDS, 2002; HAWKING et al., 2007).

1.3.2 Planejamento de fármacos baseado em estrutura (SBDD)

O planejamento de fármacos baseado em estrutura (SBDD), é feito quando existe informação estrutural sobre o alvo disponível na literatura, o que nem sempre ocorre. A principal estratégia de SBDD utilizada é o *docking*.

Em química computacional (ou quimioinformática), genericamente citada como modelagem molecular, destaca-se o *docking* molecular como um dos métodos mais empregados. Com essa metodologia, são investigadas as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um bioreceptor, no sítio ativo de uma enzima, ou simplesmente entre duas moléculas.

O *docking*, ou ancoragem, nada mais é do que um modelo que utiliza um conjunto de aminoácidos em regiões específicas do alvo biológico, por exemplo, como sonda para o encaixe de moléculas. Seus métodos, em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligações de hidrogênio e hidrofóbicos, a qual gera modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de escores de energia (CODDING, 1998).

1.3.3 *Triagem virtual*

A estratégia de triagem virtual é utilizada para a busca de moléculas em banco de dados de compostos e seleção de novos protótipos. A literatura vem reportando, há alguns anos, diversos casos de sucesso com o uso dessa sistemática (CHEN et al., 2001; BRENK et al., 2003; KESERÜ e MAKARA, 2009; YAN et al., 2014). O sucesso na utilização da metodologia de triagem virtual, aplicando estratégias de LBDD e SBDD, depende de um estudo aprofundado sobre as características dos alvos em questão e do correto manejo dessas informações, de acordo com a metodologia aplicada (CARLSON; MASUKAWA; MCCAMMON, 1999).

A triagem virtual nada mais é do que uma busca, ou varredura, *in silico*, em banco de dados de moléculas através de diferentes metodologias. Com esse mecanismo é possível selecionar poucas moléculas de um conjunto de milhares, que possuam determinadas características que já foram previamente investigadas como essenciais para atividade. Dessa forma, essas moléculas poderão ter maiores chances de demonstrar atividade frente à um certo alvo.

As características podem ser qualquer propriedade farmacocinética, como log P ou área superficial por exemplo, ou mesmo estrutura bi e tridimensional, um farmacóforo ou um modelo de *docking* (SUN et al., 2016).

1.3.4 *Estudos de predição*

Diversos programas ou servidores *online* são capazes de predizer, com um bom grau de confiabilidade, diversas propriedades e características de moléculas, sem a necessidade de se realizar experimentos em bancada. Isso é muito válido como estratégia de filtragem de moléculas potencialmente problemáticas (CARLSON; MASUKAWA; MCCAMMON, 1999; BAJORACH, 2004).

Os programas comparam estruturalmente cada região da molécula com informações contidas em seus bancos de dados. Dessa forma, é possível prever, por exemplo, que determinado grupo químico pode ser hepatotóxico, ou que outro tem maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (MARCHANT et al., 2008).

Tendo em mãos todas as características necessárias para se assegurar uma boa interação enzima-inibidor, é possível eliminar outras que não apresentem tais características. Eliminando essa molécula nas primeiras fases de desenvolvimento de um novo fármaco representa uma grande otimização tanto de tempo de pesquisa quanto de investimento, uma vez que essa mesma molécula terá grandes chances de travar a pesquisa nas fases finais de desenvolvimento (OPREA, 2005).

Sobre as relações estrutura-atividade e estrutura-propriedade dos compostos, é possível prever se uma nova molécula teria potencial de ser ativa, com respeito a algum alvo terapêutico ou efeito farmacológico. Os cálculos são baseados em similaridade estrutural 2D e nas propriedades, a partir da informação contida nos bancos de dados do servidor (KEISER et al., 2007).

1.3.5 Ensaio de inibição enzimática *in vitro*

A abordagem computacional (estudos *in silico*) já se tornou parte integrante no processo de desenvolvimento de fármacos (CHEN et al., 2001; BRENK et al., 2003; KESERÜ e MAKARA, 2009; YAN et al., 2014). Os ensaios de inibição enzimática vêm sendo aplicados na sequência dos estudos *in silico* com o objetivo de testar a metodologia, bem como aprimorar os resultados através das propostas de modificação molecular orientadas pelos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*. Essa etapa representa um importante passo na continuação de todo o processo de desenvolvimento de fármacos (KHAN et al., 2010; XU et al., 2017; JOSHI et al., 2017).

2 OBJETIVOS

Planejar novos candidatos a fármacos inibidores da enzima GSK-3 β , através da elaboração e execução de 5 diferentes estratégias computacionais de triagem virtual em bancos de dados de moléculas, estudos de predições de farmacocinética, predição de toxicidade, predição de atividade biológica, proposição de modo de ligação e posterior ensaio de inibição enzimática *in vitro*.

3 METODOLOGIA

3.1 Busca por compostos biologicamente ativos em bancos de dados

O Binding Database (**BindingDB**) (<http://www.bindingdb.org>) é um web servidor online que contém informações sobre afinidade de ligação proteína – ligante (LIU et al., 2007). Através da base de dados desse repositório, foi feita uma busca por compostos inibidores de GSK-3 β com atividade já descrita na literatura. Foram selecionadas moléculas de diferentes classes químicas, relacionadas estruturalmente e que possuíam valores de constante de dissociação do inibidor (k_i) menores ou igual a 9,0 nM de concentração.

3.2 Busca por complexos cristalográficos em bancos de dados

O Protein Data Bank (**PDB**) (<http://www.pdb.org>) é um repositório online de estruturas tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos, resolvidas por cristalografia de raios-X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou modelagem por homologia (KIRCHMAIR et al., 2008). Realizou-se uma análise nesse servidor na busca por estruturas cristalográficas da enzima alvo em complexo ou não com ligantes não-peptídicos, que tivessem alta resolução e refinamento, que não possuísem mutações, e que contivessem valores de atividade reportados.

3.3 Seleção de modelos de similaridade

Através dos complexos de GSK-3 β selecionados no **PDB**, foi feita uma análise tridimensional de cada estrutura, observando seus sítios ativos, as posições dos seus resíduos de aminoácidos e a conformação de cada um de seus ligantes. Essa análise buscou selecionar moléculas, comprovadamente ativas para o alvo, que explorem o sítio da enzima de maneiras distintas. Assim, utilizando a mesma conformação em que foram retiradas dos seus complexos (que representa a conformação supostamente bioativa de cada uma), essas moléculas foram utilizadas para as triagens por similaridade.

Foram selecionados três complexos para os estudos de similaridade. Seus ligantes estão interagindo de forma diferente no sítio ativo. Assim, eles formam um conjunto de moléculas que são complementares, cada uma possuindo informações

diferentes a respeito da interação com o sítio, sendo possível realizar uma análise mais abrangente, com maiores chances de sucesso.

Esses ligantes foram então retirados de seus complexos e foi utilizada essa mesma conformação (que representa a conformação supostamente bioativa da molécula) para a realização dos estudos de similaridade.

3.4 Desenvolvimento do modelo farmacofórico

O **PharmaGist** (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>) é um web servidor para detecção de farmacóforo através do método baseado em ligantes. Utiliza um conjunto de até 32 moléculas as quais já possuem atividade consolidada na literatura para o alvo estudado como entrada. O cálculo é feito por alinhamentos estruturais múltiplos flexíveis do grupo de moléculas de entrada, podendo-se utilizar uma delas como “pivô”, para a qual se mantém sua conformação fixa (por exemplo, a pose proveniente de um complexo cristalográfico com a enzima) (INBAR et al., 2007, SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008, DROR et al., 2009).

Para a criação desse modelo, foi utilizado uma molécula pivô retirada de um complexo cristalográfico de código PDB 3I4B, juntamente com um conjunto de 31 moléculas dentre as mais ativas selecionadas do **BindingDB**. O programa mantém a molécula pivô fixa, mantendo sua conformação (supostamente) bioativa, e permite que as moléculas do conjunto de ativas fiquem flexíveis e se alinhem estruturalmente à pose da molécula pivô, gerando um padrão farmacofórico mínimo e consensual comum a todas as moléculas.

Com o objetivo de refinar o modelo criado pelo **PharmaGist**, utilizou-se o protocolo “*Common Feature Pharmacophore Generation*” do programa **Discovery Studio** (Accelrys Software Inc., 2013). Através desse protocolo, diferentemente do **PharmaGist**, é possível manter mais de uma molécula em conformação fixa, ou seja, é possível utilizar os inibidores de vários complexos cristalográficos, em suas conformações cristalográficas, supostamente as bioativas.

3.5 Validação do modelo farmacofórico

Para validar o modelo farmacofórico obtido, foi feita uma triagem com o protocolo “*Screen Library*” do programa **Discovery Studio**.

Para o cálculo, foi utilizada uma pequena base de dados composta por moléculas com atividade descrita para o alvo. Dentre essas, estão presentes moléculas com alta atividade (valores de k_i de até 9 nM) juntamente com moléculas de baixa atividade (valores de k_i maiores do que 10 mM).

Na validação, busca-se comprovar a eficiência da metodologia através do sucesso na separação entre compostos mais e menos potentes, sendo que os mais potentes devem obter os maiores valores de *FitValue*, (parâmetro que avalia o ajuste das moléculas ao modelo), enquanto que os menos potentes, os menores valores.

3.6 Desenvolvimento do modelo de *docking*

Para a criação do modelo de *docking*, foram utilizadas as estruturas cristalográficas provenientes do **PDB**. Todas as estruturas de GSK-3 β disponíveis no servidor foram criteriosamente analisadas buscando entender toda a diversidade estrutural presente entre um complexo e outro e as particularidades de cada estrutura, bem como interação inibidor-enzima.

Dessa forma, é possível mapear cada região do sítio ativo, determinar as características mais comuns entre todas as estruturas e, assim, ser capaz de selecionar aquela que apresenta as melhores características estruturais e químicas para realizar as triagens virtuais.

3.7 Validação do modelo de *docking*

Para validar o modelo de *docking* obtido, foi feita uma triagem com o protocolo “*Virtual Screening*” do programa **GOLD** (JONES, et al., 1997).

Para o cálculo, foi utilizada uma pequena base de dados composta por moléculas com atividade descrita para o alvo. Dentre essas, estão presentes moléculas com alta atividade (valores de k_i de até 9 nM) juntamente com moléculas de baixa atividade (valores de k_i maiores do que 10 mM).

Na validação, busca-se comprovar a eficiência da metodologia através do sucesso na separação entre compostos mais e menos potentes, sendo que os mais potentes devem obter os maiores valores de *GoldScore* (avalia a eficiência

energética da interação ligante – alvo), enquanto que os menos potentes, os menores valores.

3.8 Geração de confôrmeros

O **OMEGA** (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) é um programa de geração de confôrmeros que possui um bom desempenho na geração de confôrmeros mais realistas. Para diferentes metodologias foram gerados 100 ou 300 confôrmeros para cada molécula, com limiar de tensão (diferença de energia do dado confôrmero para o mínimo global de energia) de até 9 kcal/mol e desvio médio quadrático (RMSD) – do inglês *root mean square deviation* de 0,6 Å (HAWKING et al., 2010).

3.9 Bases de dados utilizadas

Nesse projeto foram utilizadas 7 diferentes bases de dados de moléculas, provenientes de dois diferentes desenvolvedores, Chembridge (Chembridge Corporation – San Diego, CA / www.chembridge.com) e Zinc (IRWIN et al., 2012) que estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2: Bases de dados utilizadas no projeto e o número de compostos de cada uma.

Base de Dados	Número de compostos
Chembridge, subcoleção CNS (i)	63 005
Zinc, subcoleção CNS (ii)	377 655
Chembridge, subcoleção Diverset_CL (iii)	25 000
Chembridge, subcoleção Diverset_EXP (iv)	25 000
Chembridge, subcoleção Kinacore (v)	8 209
Chembridge, subcoleção Kinaset (vi)	11 000
Zinc, subcoleção Naturals (vii)	111 521
Total	621390

A bases “a” e “b” são duas subcoleções referentes a moléculas com características para serem ativas no Sistema Nervoso Central (*Central Nervous System* – CNS), “c” e “d” são subcoleções de moléculas com propriedades *drug-like*

de diversas classes químicas, “e” e “f” são subcoleções com moléculas com características para serem ativas para cinases e “g” é uma subcoleção de produtos naturais.

Essas bases são compostas de milhares de compostos, todos disponíveis comercialmente. São gratuitas e estão disponíveis para download nos sites de seus desenvolvedores. (Chembridge - <http://www.chembridge.com/index.php> / Zinc - <http://zinc.docking.org>).

3.10 Triagem virtual

De posse dos ligantes em suas conformações supostamente bioativas, bem como dos modelos de farmacóforo e de *docking*, foram, então, utilizadas duas metodologias de triagem virtual baseada em ligantes (similaridade e farmacóforo) e uma de triagem virtual baseada em estrutura (*docking*) para a elaboração de 5 diferentes estratégias, através da combinação dessas metodologias.

Na sequência, foram feitos os estudos de predição de farmacocinética, toxicidade e atividade biológica, *docking ensemble* como proposição de modo de ligação e, por fim, uma minuciosa inspeção visual como último filtro.

3.10.1 Estratégia 1: Triagem por similaridade de forma e eletrostática

As triagens por forma e eletrostática foram realizadas através dos programas **ROCS** e **EON** (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) utilizando-se os modelos de similaridade previamente selecionados (HAWKING et al., 2007).

Primeiramente, foi utilizado o programa **OMEGA** para gerar até 300 conformêros por molécula de cada uma das 7 bases de dados (Chembridge: CNS, Diverset_CL, Diverset_EXP, Kinacore, Kinaset; e Zinc: CNS e Naturals). Essas bases de dados geradas pelo OMEGA (“base_300”) foram utilizadas em todas as triagens por similaridade.

Foram realizadas triagens independentes para cada um dos três modelos de similaridade selecionados. Para cada modelo fez-se primeiro uma busca por similaridade de forma através do programa **ROCS** utilizando cada uma das 7 bases_300, selecionando os 2000 compostos mais bem ranqueados, e com esses

2000 melhores, foi feita uma triagem por similaridade eletrostática através do programa **EON**, selecionando os 100 compostos mais bem ranqueados, como descrito na Figura 9.

Figura 9: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 1. Utilizou-se as 7 bases de dados (300) para cada um dos 3 modelos de similaridade selecionados. Primeiro uma triagem por forma no programa **ROCS**, selecionando os 2000 melhores, depois no programa **EON**, selecionando os 100 melhores.

3.10.2 Estratégia 2: Triagem por docking

Utilizando o modelo de *docking* previamente selecionado e validado, foram realizadas as triagens por *docking* através do programa **GOLD** com as 7 bases de dados.

Primeiramente, foi aplicado o modo “*Virtual Screening*” para cada uma das bases de dados. Esse modo é mais rápido e menos preciso e demanda um menor desprendimento computacional. As moléculas foram então ranqueadas com base em seus valores de *GoldScore* e selecionados os 5000 melhores compostos.

Com esses 5000 melhores, foi utilizado agora o modo XP do **GOLD**, modo esse sim que é mais preciso e por isso requer uma demanda maior de tempo. Ao final, selecionou-se os 100 compostos mais bem classificados baseando-se em seus valores de *GoldScore*, como demonstrado na Figura 10.

Figura 10: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 2, utilizando-se as 7 bases de dados. Através do programa **GOLD**, primeiramente com o modo VS, selecionando os 5000 melhores, depois com o modo XP, selecionando os 100 melhores compostos.

3.10.3 Estratégia 3: Triagem por farmacóforo

O modelo farmacofórico, refinado e validado, foi utilizado para a realização do protocolo de triagem virtual (“*Screen Library*”) do programa **Discovery Studio** com cada uma das 7 base de dados.

Primeiramente, foi adotado o modo “*FAST*” para geração de confôrmeros, modo esse que utiliza parametrização mais simples e, em razão disso, desprende menor gasto computacional e consequentemente menos tempo. O protocolo prevê a geração de até 255 confôrmeros para cada molécula, com limiar de energia de tensão de 9 kcal/mol e RMSD de 0,6 Å.

Feito isso, foram selecionados os 5000 compostos mais bem classificados de acordo com os valores de *FitValue*. Na sequência, uma nova triagem virtual foi realizada, só que agora utilizando o modo “*BEST*” para geração de confôrmeros, mantendo também o limite de até 255 confôrmeros/molécula, até 9 kcal/mol de energia de tensão e RMSD de 0,6 Å. Diferente do primeiro, esse modo utiliza parâmetros mais apertados, com maior desprendimento computacional, sendo com isso mais refinado e preciso.

O resultado foi então ranqueado baseado nos valores de *FitValue*, e foram selecionados os 100 melhores compostos.

Através do programa **OMEGA** foi gerado até 100 confôrmeros para cada molécula, gerando um novo conjunto de cerca de 100 mil compostos. Com esse novo conjunto, foi utilizado novamente o protocolo “*Screen Library*” do programa **Discovery Studio** utilizando o modo “NONE” de geração de confôrmeros. Esse modo não gera confôrmeros pelo programa, são utilizados aqueles gerados pelo **OMEGA**.

Após isso, as moléculas foram novamente ranqueadas pelos seus valores de *FitValue* e selecionadas as 100 melhores, como observado na Figura 11.

Figura 11: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 3. Cada uma das 7 bases de dados no programa **Discovery Studio**. Primeiro no modo FAST, selecionando os 5000 melhores, depois no modo BEST, selecionando os 100 melhores. Geração de confôrmeros pelo OMEGA e por último o modo NONE, selecionando os 100 melhores.

3.10.4 Estratégia 4: Triagem por docking + similaridade

Nessa metodologia foram combinadas as estratégias de *docking* e de similaridade.

Com o resultado inicial da triagem por *docking* (modo VS do **GOLD** / Estratégia 3), no qual foram selecionados os 5000 melhores compostos, foi feita uma busca por similaridade com cada um dos 3 modelos de similaridade selecionados através dos programas **ROCS** e **EON**.

Primeiramente, foi feita uma busca por similaridade de forma no programa **ROCS**, no qual foram selecionados os 2000 melhores compostos. Depois, com esses

2000, utilizou-se o **EON** para uma busca por similaridade eletrostática, selecionando assim, os 100 melhores compostos, como se observa na Figura 12.

Figura 12: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 4. Com o primeiro resultado do modo VS do **GOLD** (Estratégia 2) foi feita, para cada modelo, uma triagem por forma no programa **ROCS**, selecionando os 2000 melhores, depois uma triagem por eletrostática no programa **EON**, selecionando os 100 melhores compostos.

3.10.5 Estratégia 5: Triagem por farmacóforo + similaridade

Nessa metodologia foram combinadas as estratégias de farmacóforo e de similaridade.

Com o resultado inicial da triagem por farmacóforo (modo FAST do **Discovery Studio** / Estratégia 3), no qual foram selecionados os 5000 melhores compostos, foi feita uma busca por similaridade com cada um dos 3 modelos de similaridade selecionados através dos programas **ROCS** e **EON**.

Primeiramente, foi feita uma busca por similaridade de forma com as 5000 melhores no **ROCS**, no qual foram selecionados os 2000 melhores compostos. Depois, com esses 2000, utilizou-se o **EON** para uma busca por eletrostática, selecionando assim, os 100 melhores compostos (Figura 13).

Figura 13: Esquema dos passos utilizados na Estratégia 5. Com o primeiro resultado do modo FAST do **Discovery Studio** (Estratégia 3) foi feita, para cada modelo, uma triagem por forma no programa **ROCS**, selecionando os 2000 melhores, depois uma triagem por eletrostática no programa **EON**, selecionando os 100 melhores compostos.

3.11 Estudos de predição *in silico*

Os estudos de predição foram realizados com todos os resultados (100 melhores) provenientes de cada estratégia/base de dados/modelo de similaridade. Esses estudos visaram eliminar moléculas potencialmente indesejáveis, atuando como filtros. As predições realizadas foram: predição de farmacocinética, predição de toxicidade e predição de atividade biológica.

3.11.1 Predição de farmacocinética

A análise das propriedades farmacocinéticas foi realizada com o auxílio do programa **QikProp** (Schrödinger, LLC, 2015). O programa é capaz de prever com boa confiabilidade uma grande variedade de propriedades.

Para cada propriedade, além da predição, o programa ainda fornece um intervalo de valores tidos como ótimos. Esse intervalo corresponde à faixa de valores que abrange 95% dos fármacos já conhecidos, disponíveis no banco de dados do programa.

3.11.2 Predição de toxicidade

Utilizando o programa **Derek**, foram feitas as predições de toxicidade através do protocolo “*knowledge-based expert system*”. Esse protocolo utiliza um banco de

dados de estruturas químicas e seus respectivos relatos de toxicidade na literatura para fazer uma análise comparativa com os grupamentos químicos presentes nas moléculas analisadas (MARCHANT et al., 2008).

As toxicidades investigadas incluem: carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade, sensibilidade na pele, teratogenicidade, irritação, sensibilidade respiratória e toxicidade reprodutiva, entre outras.

Para cada grupamento potencialmente tóxico presente na molécula, o programa gera um alerta (provável, plausível, improvável, possível, certo, impossível, duvidoso). Ao final do processo, é emitido um parecer sobre a potencial toxicidade da molécula como um todo, de acordo com a base de dados do programa.

3.11.3 *Predição de atividade biológica*

Para a predição de atividade, foi utilizado o web servidor **SEA** (*Similarity Ensemble Approach*). Dois parâmetros principais são avaliados no **SEA**: Esperança (E), que avalia a significância estatística do resultado comparado a uma seleção aleatória do banco de dados, onde o menor valor é desejável; e Score, que avalia a similaridade da nova molécula com alguma presente no banco de dados do servidor (KEISER et al., 2007).

3.12 *Docking ensemble*

O *docking ensemble* é um dos protocolos de *docking* do **GOLD**. Nesse protocolo, é possível utilizar informações de mais de uma estrutura cristalográfica como base para a realização das triagens; dessa forma o programa realiza uma triagem para cada estrutura e, como resultado, ele fornece um valor de escore, que é o maior, considerando cada um dos alvos *input*.

Essa etapa foi feita para se propor um modo de ligação para os compostos selecionados e para avaliar o comportamento de cada molécula em cada um dos complexos utilizados, uma vez que cada um de seus inibidores se ligam de forma diferente no sítio ativo.

Dessa forma, cada composto terá seu valor de escore referente à estrutura que melhor aloja sua molécula. Essa metodologia é interessante pois como foram

utilizados 3 diferentes modelos de similaridade, provenientes de 3 estruturas distintas, os resultados são melhor avaliados se o *docking* é feito para todas essas estruturas.

Foram utilizadas as mesmas estruturas cristalográficas que também forneceram os inibidores utilizados como modelos de similaridade. Assim, por exemplo, um composto selecionado pela Estratégia 5 + similaridade com modelo “a”, terá maior probabilidade de reproduzir a conformação do seu resultado se o *docking* for feito utilizando-se a estrutura “a” (a qual forneceu o modelo “a”).

Para validar os modelos de *docking ensemble*, foram utilizadas os respectivos inibidores oriundos dos complexos, buscando-se, no cálculo, alcançar a mesma conformação cristalográfica.

3.13 Inspeção visual

Como última etapa do estudo *in silico*, após a aplicação dos outros filtros, foi feita uma minuciosa inspeção visual de cada molécula no sítio ativo da enzima. Essa inspeção visual como último filtro de moléculas é primordial para se certificar da qualidade da metodologia e para avaliar como é o encaixe (complementaridade química e estéreo-eletrônica) de cada molécula e sua viabilidade como futuro candidato à fármaco para DA. Todos os filtros aplicados podem ser visualizados na Figura 14.

Figura 14: Esquema dos estudos de predição (farmacocinética, toxicidade e atividade biológica), assim como as proposições de modo de ligação com o *docking ensemble* e a inspeção visual final como últimos filtros na seleção dos compostos.

3.14 Ensaio de atividade biológica

Os ensaios de inibição enzimática *in vitro* foram realizados com os compostos provenientes da Estratégia 3 de triagem por farmacóforo. O ensaio foi realizado com o objetivo de se avaliar a capacidade de cada composto selecionado de inibir a atividade de GSK-3 β .

Utilizou-se 10 μ L da solução de cada composto diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) juntamente com 10 μ L (20 ng) da solução da enzima, 10 μ L de uma solução substrato à 25 μ M, e 10 μ L de uma solução de ATP à 1 μ M. A concentração final utilizada nos ensaios para cada composto foi de 10 μ M. A solução foi então incubada por 30 minutos, a 30 °C e, após isso, interrompeu-se a ação da enzima através da adição de 40 μ L do reagente “Kinase-Glo®”. A luminescência foi medida após 10 minutos através do leitor multimodo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemanha). A atividade é medida pela diferença entre o ATP total e o consumido.

Os ensaios foram realizados em colaboração com o CSIC (*Consejo Superior de Investigaciones Científicas*) em Madrid – Espanha, com supervisão da pesquisadora Dra. Ana Martinez Gil.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Busca por compostos biologicamente ativos em bancos de dados

A busca por inibidores reportados na literatura detectou 2632 hits para GSK-3 β no web servidor **BindingDB**. Desse total, selecionou-se apenas moléculas com potente atividade inibitória para a enzima humana, considerando seus valores de constante de dissociação (k_i). Analisou-se, então, os inibidores desse conjunto e selecionou-se, para a geração do farmacóforo no **PharmaGist**, 30 compostos dentre os mais ativos, com valores de k_i menores ou iguais a 9,0 nM, alguns deles representados na Figura 15.

Figura 15: Estrutura 2D de alguns dos inibidores dentre os mais ativos selecionados do web servidor BindingDB.

4.2 Busca por complexos cristalográficos em bancos de dados

No **PDB** foram encontradas, na sua totalidade, 71 estruturas envolvendo GSK-3 β , de diversas espécies. Dessas, a grande maioria era de complexos com outras proteínas, estruturas híbridas, com mutações e sem estarem complexadas com um inibidor não-peptídico. As estruturas que correspondiam à espécie humana eram 41, e dessas 41, somente 14 eram complexadas com inibidores e possuíam valores de inibição reportados.

Analisando cuidadosamente todas elas, observou-se que 4 delas possuíam inibidores com estruturas menos comuns que poderiam prejudicar os estudos e

triagens, por exemplo com complexos de rutênio. Dessa forma, o conjunto final de complexos cristalográficos continha 10 estruturas, descritas na Tabela 3. Suas resoluções variam de 2,1 a 2,6 Å, e seus valores de atividade, de 4,0 a 210,0 nM, seja k_i ou IC_{50} . O complexo selecionado para fornecer o ligante “pivô” (mantido rígido) do **PharmaGist** foi o de código PDB 3I4B, com resolução de 2,3 Å e k_i de 7,0 nM.

Tabela 3: Os 10 complexos não mutados de GSK-3 β com inibidores não-peptídicos disponíveis no **PDB**, com respectivas resoluções (em ângstroms) e seus valores de atividade, seja k_i ou IC_{50} , em faixa nanomolar de concentração.

Código PDB	Resolução (Å)	Atividade Biológica (nM)
1Q3W	2,3	$IC_{50} = 4,0$
1Q41	2,1	$IC_{50} = 22,0$
3DU8	2,2	$IC_{50} = 146,0$
3GB2	2,4	$IC_{50} = 210,0$
4ACC	2,2	$IC_{50} = 58,0$
4ACD	2,6	$IC_{50} = 37,0$
4ACH	2,6	$IC_{50} = 22,0$
1Q5K	1,9	$k_i = 38,0$
3I4B	2,3	$k_i = 7,0$
4ACG	2,6	$k_i = 0,2$

4.3 Busca por modelos de similaridade

Dentre os 10 complexos cristalográficos selecionados no **PDB**, aqueles que apresentavam os melhores inibidores, considerando alta resolução, atividade e diferenças no posicionamento dentro do sítio ativo foram os ligantes IXM (a), Z48 (b) e 7YG (c) que correspondem respectivamente aos complexos de código PDB 1Q41, 3I4B e 4ACC.

A seguir, tem-se a representação 2D de cada um (Figura 16), a estrutura 3D na mesma conformação retirados dos respectivos complexos, que representa supostamente a conformação bioativa (Figura 17), e uma sobreposição dos 3

inibidores para demonstrar as diferentes regiões do sítio ativo que cada um explora, interagindo com diferentes aminoácidos (Figura 18).

Figura 16: Representação 2D dos 3 inibidores selecionados como modelos de similaridade: IXM (a), Z48 (b) e 7YG (c), referente aos complexos cristalográficos de código PDB 1Q41, 3I4B e 4ACC respectivamente.

Figura 17: Representação 3D dos 3 inibidores selecionados para buscas por similaridade em bancos de dados de moléculas. IXM (a) carbonos em azul, Z48 (b) em verde e 7YG (c) em cor laranja.

Figura 18: Sobreposição dos três inibidores selecionados como modelos de similaridade, evidenciando sua complementariedade graças à exploração de diferentes regiões do sítio ativo da enzima.

Analisando as 3 estruturas sobrepostas é possível perceber que existe uma boa relação estrutural entre elas. Os aminoácidos da enzimas, em sua grande maioria, ocupam a mesma região, exceto por um resíduo de Phe67, o qual possui grande flexibilidade e se ajusta conforme o tamanho do inibidor ligado.

Dessa forma, é possível se utilizar inibidores de diferentes tamanhos e ainda assim obter boas interações e bom encaixe no sítio ativo da GSK-3 β , justificando a utilização desses 3 inibidores/complexos no trabalho (Figura 19).

Figura 19: Estrutura dos três complexos selecionados, evidenciando a boa similaridade estrutural e sobreposição dos resíduos de aminoácidos. Os círculos pretos destacam a posição do resíduo Phe67 em cada complexo, que se ajusta no sítio ativo da GSK-3 β de acordo com o tamanho do inibidor ligado.

A seguir, tem-se demonstrado nas figuras 20, 21 e 22, as principais interações que cada um dos três modelos de similaridade realizam com suas respectivas enzimas.

Figura 20: Complexo cristalográfico do inibidor IXM (a) na estrutura de código PDB 1Q41, evidenciando as principais interações com a enzima.

Sendo o menor dos três inibidores selecionados como modelo de similaridade, o composto IXM (a) é o que realiza um número menor de interações com o sítio ativo. As interações mais importantes são 4 ligações de hidrogênio, sendo uma com o oxigênio carbonílico de cadeia principal do resíduo de Asp133, uma com o grupo amino e outra com o grupo carbonílico, ambos de cadeia principal do resíduo de Val135 além de uma com a carbonila de cadeia principal de Ile62.

Todas as outras interações são do tipo hidrofóbicas de van der Waals. Os aminoácidos que ajudam a ancorar a molécula no sítio são: Val70, Ala83, Val110, Thr138, Leu188 e Cys199.

Figura 21: Complexo cristalográfico do inibidor 7YG (c) da estrutura de código PDB 4ACC, evidenciando as principais interações com a enzima.

O inibidor 7YG (c) é maior que o primeiro e, por isso, além dos aminoácidos que interagem com o inibidor IXM (a), 7YG também é capaz de interagir em um sítio adicional, através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Lys85.

Figura 22: Complexo cristalográfico do inibidor Z48 (b) na estrutura de código PDB 3I4B evidenciando as principais interações com a enzima.

O inibidor Z48 (b) é o que realiza o maior número de interações com o sítio ativo da enzima. Sua estrutura é alongada e ele consegue explorar, além do sítio da Lys85, uma outra região que através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Asp200.

4.4 Desenvolvimento e validação do modelo farmacofórico

O melhor modelo de padrão farmacofórico sugerido pelo servidor **PharmaGist** inclui um conjunto de 29 inibidores, que correspondem ao pivô do complexo 3I4B e mais 28 das 30 moléculas mais ativas selecionadas do **BindingDB**. O modelo possui um (alto) escore de 67.88, e contém 3 grupos aromáticos, 1 grupo doador de ligação de hidrogênio e 1 grupo aceitador (Figura 23).

Figura 23: Resultado obtido com o uso do web servidor **PharmaGist**, mostrando a sobreposição das 29 moléculas utilizada para gerar o modelo farmacofórico utilizado: 3 grupos aromáticos (esferas azuis), 1 doador de ligação de hidrogênio (esfera amarela) e 1 aceitador de ligação de hidrogênio (esfera verde).

PharmaGist

[About] [WebServer] [FAQ] [Help / Getting Started] Contact: ppdock@tau.ac.il

Utilizando o modelo selecionado e gerado pelo **PharmaGist**, realizou-se um refinamento desse padrão farmacofórico com o programa **Discovery Studio**. Esse refinamento levou em consideração tanto as conformações dos ligantes nas suas conformações bioativas (retirados dos 8 complexos do **PDB**), quanto o posicionamento dos principais aminoácidos responsáveis pelas interações no sítio ativo da enzima. Conhecendo o posicionamento dos aminoácidos, foi possível gerar e orientar as chamadas “esferas de exclusão” (que indicam a presença e orientação de um potencial resíduo de aminoácido da GSK-3 β que estaria interagindo com o grupamento da molécula indicado pelo farmacóforo, cuja região a molécula do inibidor não poderia ocupar).

O modelo final assim refinado inclui 1 grupo hidrofóbico aromático, 1 grupo aromático e 1 aceitador de ligação de hidrogênio (Figura 24).

Figura 24: Padrão farmacofórico comum obtido para 10 inibidores cristalográficos, aqui sobrepostos no interior do sítio ativo da GSK-3 β . O modelo contém 1 grupo hidrofóbico aromático (esfera azul escura), 1 hidrofóbico (esfera azul clara) e 1 grupo aceitador de ligação de hidrogênio (esfera verde). O grupo aceitador de ligação de hidrogênio contém duas esferas, onde a menor deve-se aos inibidores, enquanto a maior (dita “esfera de exclusão”) indica a posição do resíduo (Val135, via nitrogênio de cadeia principal) que doa ligação de hidrogênio aos inibidores.

O modelo farmacofórico foi então validado através do protocolo *Screen Library* do programa **Discovery Studio**. Foi utilizada uma base contendo moléculas muito potentes e outras pouco potentes.

O modelo foi capaz de recuperar 8 moléculas mais potentes entre as 10 melhores ranqueadas (*FitValue*) e 5 delas nas 5 primeiras posições, assim obtendo-se uma eficiência de 80%. Dessa forma, o modelo está hábil para a realização da triagem por farmacóforo.

4.5 Desenvolvimento e validação do modelo de *docking*

De posse de todas as estruturas selecionadas do PDB, foi feito um estudo de seus sítios ativos, o posicionamento de cada resíduo de aminoácido e suas interações com cada inibidor. Com isso, foi possível se eliminar diversas estruturas que não

possuíam boa complementariedade química e estereo-eletrônica com resíduos da enzima.

Selecionadas todas as estruturas com um elevado padrão de interações no sítio ativo, foram feitas diversas validações com cada uma, buscando uma boa reprodutibilidade do método e boa recuperação de moléculas sabidamente ativas.

Após todas as validações, variações de posicionamento do centro e raio da esfera, variações das metodologias do **GOLD** e variações no posicionamento de alguns aminoácidos, foi possível selecionar a estrutura de código PDB 4ACC (Figura 25) para a realização dos estudos de *docking*, como aquela que reuniu o melhor conjunto de características e os melhores resultados de validação.

O melhor resultado de validação foi obtido com a utilização da metodologia “Escore_ASP” com o template “Kinase_VS” e modo alta eficiência. O ponto central possui coordenadas: X: 37,67 / Y: 6,72 / Z: 34,29, e o raio da esfera foi 8,5 Å. Com esses parâmetros a validação foi capaz de recuperar 8 inibidores dentre os mais potentes nos primeiros 10 ranqueados (*GoldScore*) e 6 deles aparecendo nas seis primeiras posições.

Figura 25: Representação do complexo cristalográfico código PDB 4ACC selecionado para os estudos de *docking* juntamente com seu ligante 7YG e os principais resíduos de aminoácido responsáveis pela interação no sítio ativo da GSK-3 β . A esfera em vermelho represente o ponto central da esfera.

Com uma eficiência de 80%, esse modelo de esfera foi considerado hábil para validar a metodologia de *docking* e, dessa forma, maximizar as chances de se selecionar boas moléculas por triagem virtual baseada em estrutura.

4.6 Triagem Virtual

Os resultados provenientes de cada uma das estratégias estão resumidamente descritos nas figuras 26, 27, 28, 29 e 30. Cada uma das estratégias estão numeradas de 1 a 5, cada uma das bases de dados de compostos estão numeradas de “i” a “vii” (como descritos na Tabela 2) e cada um dos modelos de similaridade estão nomeados de “a” a “c” (como descritos na Figura 17).

Figura 26: Descrição da Estratégia 1, os resultados provenientes das triagens em cada base de dados para cada um dos 3 modelos de similaridade.

Estratégia 1 - Similaridade

Figura 27: Descrição da Estratégia 2, com todos os resultados provenientes de cada base de dados.

Estratégia 2 - Docking

7 Bases

Modo VS (GOLD)

5000 melhores

Modo XP (GOLD)

100 melhores

Figura 28: Descrição da Estratégia 3, com todos os resultados provenientes de cada base de dados.

Figura 29: Descrição da Estratégia 4, os resultados provenientes das triagens em cada base de dados para cada um dos 3 modelos de similaridade.

Estratégia 4 – Docking + Similaridade

Figura 30: Descrição da Estratégia 5, os resultados provenientes das triagens em cada base de dados para cada um dos 3 modelos de similaridade.

Estratégia 5 – Farmacóforo + Similaridade

Os conjuntos de resultados de cada etapa foram reunidos em um único conjunto de 7700 compostos, sendo que cada molécula possui em seu nome uma terminologia que a identifica referente à estratégia, à base de dados e à similaridade, e esse conjunto passou posteriormente pelos filtros de farmacocinética, toxicidade, atividade biológica, *docking ensemble* e inspeção visual no sítio ativo.

4.7 Estudos de predição

No **QikProp**, foram analisadas propriedades farmacocinéticas que são requisitos para o sucesso no tratamento de DA. Essas propriedades são: violação do intervalo comum a 95% dos fármacos, log BB (*brain blood*) e qualidade da absorção oral humana, que dizem respeito respectivamente a garantir propriedades comuns à fármacos, a capacidade de atravessar a BHE e boa absorção oral. Dessa forma, todas as moléculas que não se encaixavam nesses requisitos foram eliminadas.

No **Derek**, foram analisadas todos os alertas de toxicidade e seus respectivos grupamentos de cada uma das moléculas que passaram pelo filtro de farmacocinética. Foi feita uma busca por alertas plausíveis, prováveis ou certos para as seguintes toxicidades: carcinogenicidade, mutagenicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade, nefrotoxicidade e dano cromossomal. As moléculas que apresentavam essas predições foram eliminadas.

No **SEA**, cada molécula foi analisada buscando-se relatos de provável inibição de cinases, atividade no SNC, inibição de GSK-3 β , atividade para DA, tratamento de doenças neurodegenerativas, entre outras. Entre as moléculas que passaram pelo filtro de toxicidade, somente aquelas que possuíam alguma das predições de atividade citadas acima que foram mantidas, o restante delas foi eliminado.

4.8 Docking ensemble

O *docking ensemble* foi feito como mecanismo de se propor um modo de ligação para as moléculas selecionadas. Essa é uma etapa interessante que, além de funcionar como filtro de moléculas, atua como mais uma forma de validação dos métodos. Desse modo, diferentes metodologias se inter-relacionam dentro de uma mesma estratégia, aumentando assim as chances de sucesso na busca por novos inibidores de GSK-3 β .

As moléculas que “sobreviveram” a todos os filtros anteriores foram utilizadas como conjunto no modo *ensemble* do **GOLD** com as 3 estruturas que também forneceram os modelos de similaridade. A estrutura “A”, de código PDB 1Q41, que forneceu o modelo “a” (IXM); a estrutura “B”, de código PDB 3I4B, que forneceu o modelo “b” (Z48); e a estrutura “C”, de código PDB 4ACC, que forneceu o modelo “c” (7YG).

4.9 Inspeção visual

Como último passo na filtragem de moléculas, após a proposição do modo de ligação através do *docking ensemble*, foi feita uma minuciosa inspeção visual de cada molécula no sítio ativo da GSK-3 β , checando seus posicionamentos, conformações e interações e comparando seu resultado na estratégia com seu resultado obtido no *docking ensemble*. Nessa etapa, foram selecionadas somente aquelas que possuíam um bom padrão de encaixe no sítio ativo, com boa relação grupamento-resíduo de aminoácido, maximizando as chances de interação com a enzima.

Após todos os filtros e inspeção visual, foi obtido um conjunto final de 19 compostos (cinco referentes à Estratégia 1, dois referentes à Estratégia 2, três referentes à Estratégia 3, quatro referentes à Estratégia 4 e quatro referentes à Estratégia 5) como descrito na Tabela 4. Os números de 1 a 5 são referentes à cada uma das 5 estratégias, os números romanos de “i” a “vii” referentes a cada uma das 7 bases de dados e as letras de “a” a “c” referentes a cada um dos três modelos de similaridade. Pode-se observar as estruturas 2D dos 19 compostos representadas na Figura 31.

Figura 31: Representação 2D dos 19 compostos selecionados através das 5 Estratégias.

A seguir, descrito na Tabela 4, estão os valores de predição da qualidade da absorção oral humana de cada composto selecionado e o valor de referência obtidos

com o **QikProp**. Uma molécula com absorção de até 25% possui baixa qualidade de absorção oral humana, moléculas com absorção entre 25 e 80% possuem qualidade média e moléculas com absorção maior que 80% possuem alta qualidade.

Tabela 4: Valores de predição de % absorção oral para as 19 moléculas selecionadas.

	Composto	Predição	Intervalo
1	1_ii_a_ZINC00186507	86	>80% alta
2	1_ii_b_ZINC12773574	100	>80% alta
3	1_iii_a_CHEMBRIDGE_#90289965	87	>80% alta
4	1_iv_a_CHEMBRIDGE_#7921247	100	>80% alta
5	1_v_c_CHEMBRIDGE_#12751728	81	>80% alta
6	2_i_CHEMBRIDGE_#7495697	95	>80% alta
7	2_iv_CHEMBRIDGE_#7489722	100	>80% alta
8	2_vi_CHEMBRIDGE_#6031822	100	>80% alta
9	3_ii_ZINC00157747	100	>80% alta
10	3_ii_ZINC08581401	96	>80% alta
11	3_ii_ZINC08581599	96	>80% alta
12	4_ii_b_ZINC11785021	94	>80% alta
13	4_iv_b_CHEMBRIDGE_#9035778	100	>80% alta
14	4_v_b_CHEMBRIDGE_#87065668	97	>80% alta
15	4_v_c_CHEMBRIDGE_#35849521	90	>80% alta
16	5_iii_b_CHEMBRIDGE_#22223466	100	>80% alta
17	5_v_b_CHEMBRIDGE_#89094026	100	>80% alta
18	5_vi_b_CHEMBRIDGE_#7658352	96	>80% alta
19	5_vii_a_ZINC28182496	100	>80% alta

Nota-se que, dentre as moléculas selecionadas, todas possuem alta qualidade de absorção oral humana. Esta é uma característica essencial no caso de DA que, por se tratar de uma doença crônico-degenerativa sem cura, necessita de uma terapia oral. 9 das 19 moléculas possuem absorção de 100%, isso representa 47% do conjunto e 16 delas possuem mais que 90% de absorção, representando 84% das moléculas.

Os valores de predição de log BB, que avalia a capacidade da molécula em atravessar a BHE, está descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de predição de log BB para as 19 moléculas selecionadas.

	Composto	Predição	Intervalo
1	1_ii_a_ZINC00186507	-0.473	-3.0 / 1.2
2	1_ii_b_ZINC12773574	-0.367	-3.0 / 1.2
3	1_iii_a_CHEMBRIDGE_#90289965	-0.528	-3.0 / 1.2
4	1_iv_a_CHEMBRIDGE_#7921247	0.536	-3.0 / 1.2
5	1_v_c_CHEMBRIDGE_#12751728	-0.484	-3.0 / 1.2
6	2_i_CHEMBRIDGE_#7495697	-0.634	-3.0 / 1.2
7	2_iv_CHEMBRIDGE_#7489722	-0.304	-3.0 / 1.2
8	2_vi_CHEMBRIDGE_#6031822	-0.754	-3.0 / 1.2
9	3_ii_ZINC00157747	-0.221	-3.0 / 1.2
10	3_ii_ZINC08581401	-0.473	-3.0 / 1.2
11	3_ii_ZINC08581599	-0.535	-3.0 / 1.2
12	4_ii_b_ZINC11785021	-0.403	-3.0 / 1.2
13	4_iv_b_CHEMBRIDGE_#9035778	-0.245	-3.0 / 1.2
14	4_v_b_CHEMBRIDGE_#87065668	-0.369	-3.0 / 1.2
15	4_v_c_CHEMBRIDGE_#35849521	0.240	-3.0 / 1.2
16	5_iii_b_CHEMBRIDGE_#22223466	-0.885	-3.0 / 1.2
17	5_v_b_CHEMBRIDGE_#89094026	0.004	-3.0 / 1.2
18	5_vi_b_CHEMBRIDGE_#7658352	-0.799	-3.0 / 1.2
19	5_vii_a_ZINC28182496	-0.275	-3.0 / 1.2

Analisando os valores de log BB, observa-se que todas as moléculas estão dentro do intervalo usual de fármacos, possuindo valores entre -3.0 e 1.2. Porém, esse intervalo corresponde à faixa de fármacos de uma maneira geral. Para se avaliar a capacidade de atravessar BHE, o **QikProp** fornece uma outra predição, que nada mais é do que a interpretação dos valores de log BB.

Usualmente, um bom valor de log BB que facilitará a travessia sangue-cérebro, está na faixa entre -0,5 e 1.2. Esses valores garantem uma boa lipofilicidade, fator intimamente ligado à travessia de BHE. Porém, em DA, existe um dilema quanto à lipofilicidade (que garante a transposição de BHE) *versus* hidrofiliicidade (que é idealizada para um bom modelo de absorção oral). Esses dois fatores são importantes e opostos, sendo necessário um balanceamento dessas propriedades para se

conseguir ao mesmo tempo uma boa absorção oral e uma capacidade de atravessar BHE.

Os valores para a predição de capacidade de atravessar BHE estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de predição de capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica para as 19 moléculas selecionadas.

	Composto	Predição	Intervalo
1	1_ii_a_ZINC00186507	+/-	-- / ++
2	1_ii_b_ZINC12773574	+/-	-- / ++
3	1_iii_a_CHEMBRIDGE_#90289965	+/-	-- / ++
4	1_iv_a_CHEMBRIDGE_#7921247	++	-- / ++
5	1_v_c_CHEMBRIDGE_#12751728	+	-- / ++
6	2_i_CHEMBRIDGE_#7495697	-	-- / ++
7	2_iv_CHEMBRIDGE_#7489722	+/-	-- / ++
8	2_vi_CHEMBRIDGE_#6031822	-	-- / ++
9	3_ii_ZINC00157747	+/-	-- / ++
10	3_ii_ZINC08581401	+/-	-- / ++
11	3_ii_ZINC08581599	+/-	-- / ++
12	4_ii_b_ZINC11785021	+/-	-- / ++
13	4_iv_b_CHEMBRIDGE_#9035778	+/-	-- / ++
14	4_v_b_CHEMBRIDGE_#87065668	+/-	-- / ++
15	4_v_c_CHEMBRIDGE_#35849521	+	-- / ++
16	5_iii_b_CHEMBRIDGE_#22223466	-	-- / ++
17	5_v_b_CHEMBRIDGE_#89094026	+	-- / ++
18	5_vi_b_CHEMBRIDGE_#7658352	-	-- / ++
19	5_vii_a_ZINC28182496	+/-	-- / ++

Os compostos **4**, **5**, **15** e **17** foram os que tiveram a melhor predição para atravessar BHE, com um intervalo de variação de log BB de -0,5 até 0,6. Contudo, como já discutido, quanto maior a capacidade de atravessar barreira de um composto, menor a taxa de absorção oral. Assim sendo, as predições dos compostos **1**, **2**, **3**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14** e **19**, por possuírem valores intermediários para essa predição, também são considerados bons resultados.

Os compostos **6**, **8**, **16** e **18** obtiveram predições não tão boas, mas que, por apresentar bons resultados nos estudos de docking e farmacóforo, bem como por apresentarem bons resultados de predição de atividade, foram mantidos no conjunto final.

Pode-se observar, a seguir, na Figura 32, o *layout* do programa **Derek**, evidenciando o cálculo das predições de toxicidade e as apresentações dos alertas.

Figura 32: *Layout* do programa **Derek**, mostrando as moléculas analisadas, o progresso das predições e todos os alertas para cada uma delas.

The screenshot displays the Derek software interface. The main window is titled 'Derek Batch Prediction'. It features a 'Predictions' pane on the left listing various compounds and their progress. The central area shows a 'Batch Progress' table with columns for Name, Progress, and Results. The bottom section, 'Batch Progress Results', shows a table of results for the first 500 compounds, including chemical structures, names, endpoints, species, and reasoning outcomes.

Structure	Name	Endpoint	Species	Reasoning outcome
	1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroethane	Phototoxicity	human	EQUIVOCAL
	1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroethane	Nephrotoxicity	human	EQUIVOCAL
	1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroethane	Nephrotoxicity	human	EQUIVOCAL
	1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroethane	Peroxisome proliferation	human	IMPROBABLE
	1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroethane	Phototoxicity	human	PLAUSIBLE

Na primeira parte do programa está evidenciado o sucesso na predição dos 19 compostos. Na parte de baixo, a descrição dos alertas obtidos para cada um. Nenhum composto obteve predição significativa de toxicidade (plausível, provável ou certo) para nenhuma das características a seguir: carcinogenicidade, mutagenicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade, nefrotoxicidade ou dano cromossomal, como pode-se observar na Tabela 7.

Tabela 7: Predições de toxicidade para os 19 compostos selecionados.

	Composto	Predição	Alerta
1	1_ii_a_ZINC00186507	Fototoxicidade	Equivocado
2	1_ii_b_ZINC12773574	Nefrotoxicidade	Equivocado
4	1_iv_a_CHEMBRIDGE_#7921247	Nefrotoxicidade	Equivocado
8	2_vi_CHEMBRIDGE_#6031822	Proliferação de peroxissomo	Improvável
9	3_ii_ZINC00157747	Fototoxicidade	Plausível
10	3_ii_ZINC08581401	Sensibilidade na pele	Plausível
11	3_ii_ZINC08581599	Nefrotoxicidade	Equivocado
		Sensibilidade na pele	Plausível
		Dano cromossomial <i>in vitro</i>	Equivocado
13	4_iv_b_CHEMBRIDGE_#9035778	Fototoxicidade	Equivocado
		Sensibilidade na pele	Plausível
15	4_v_c_CHEMBRIDGE_#35849521	Hepatotoxicidade	Equivocado
16	5_iii_b_CHEMBRIDGE_#22223466	Hepatotoxicidade	Equivocado
19	5_vii_a_ZINC28182496	Dano cromossomial <i>in vitro</i>	Equivocado

Do conjunto final de 19 moléculas, 8 delas (42%) não apresentaram qualquer tipo de alerta. Das 11 restantes, 9 (82%) apresentaram alertas equivocados de toxicidade. O restante dos alertas descritos (improvável e plausível) são alertas para características menos relevantes e/ou irrelevantes para o caso de DA (fototoxicidade e sensibilidade da pele).

Na Tabela 8 pode-se observar os resultados positivos de predição de atividade para as 19 moléculas selecionadas obtidos com o **SEA**, juntamente com a descrição de qual o tipo de predição e também os valores de esperança e de escore.

Tabela 8: Valores de predição de atividade biológica obtidas para as 19 moléculas selecionadas.

	Composto	Predição	Esperança	Escore
1	1_ii_a_ZINC00186507	Serine/threonine-protein kinase 33	1,93e-19	0,35
2	1_ii_b_ZINC12773574	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3	3,01e-10	0,29
		Serine/threonine-protein kinase Sgk2	4,99e-8	0,40
3	1_iii_a_CHEMBRIDGE_#90289965	Serine/threonine-protein kinase 32B	4,44e-16	0,36
		Casein kinase I isoform alpha-like	8,53e-14	0,36
		Serine/threonine-protein kinase	8,53e-14	0,36
4	1_iv_a_CHEMBRIDGE_#7921247	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	2,06e-92	0,50
5	1_v_c_CHEMBRIDGE_#12751728	Serine/threonine-protein kinase 32B	2,55e-14	0,31
		Casein kinase I isoform alpha-like	2,68e-12	0,31
		Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	2,68e-12	0,31
6	2_i_CHEMBRIDGE_#7495697	Rho-associated protein kinase 2	7,77e-16	0,44
7	2_iv_CHEMBRIDGE_#7489722	Glycogen synthase kinase-3 beta	3,02e-17	0,53
		Glucose-dependent insulinotropic receptor	1,65e-10	0,31
8	2_vi_CHEMBRIDGE_#6031822	G protein-coupled receptor kinase 5	5,01e-12	0,35
		RAF proto-oncogene serine threonine-protein kinase	1,25e-10	0,33
9	3_ii_ZINC00157747	Glycogen synthase kinase-3 beta	1,44e-15	0,32
10	3_ii_ZINC08581401	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	5,37e-7	0,28
		Cyclin-dependent kinase 3	1,22e-6	0,28
11	3_ii_ZINC08581599	Serine/threonine-protein kinase WNK3	5,81e-20	0,28
12	4_ii_b_ZINC11785021	Mitogen-activated protein kinase 12	1,39e-21	0,31
13	4_iv_b_CHEMBRIDGE_#9035778	Glycogen (starch) synthase, muscle	2,75e-11	0,34
		Mitogen-activated protein kinase 11	4,68e-10	0,28

14	4_v_b_CHEMBRIDGE _#87065668	Casein kinase II subunit alpha	4,12e-31	0,28
		Dual specificity protein kinase CLK3	8,88e-16	0,35
15	4_v_c_CHEMBRIDGE _#35849521	Mitogen-activated protein kinase 1	5,47e-18	0,35
		Serine/threonine protein kinase/endoribonuclease IRE1	5,09e-14	0,30
16	5_iii_b_CHEMBRIDGE _#22223466	Tyrosine-protein kinase Mer	5,88e-21	0,33
		Mitogen-activated protein kinase 9	1,55e-12	0,36
17	5_v_b_CHEMBRIDGE _#89094026	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	1,06e-8	0,29
18	5_vi_b_CHEMBRIDGE _#7658352	Serine/threonine-protein kinase SMG1	2,94e-19	0,36
		Tyrosine-protein kinase SYK	2,04e-9	0,39
19	5_vii_a_ZINC28182496	Protein kinase C alpha type	1,93e-11	0,38
		Glycogen synthase kinase- 3 beta	3,80e-8	0,38

Nota-se a predominância das predições para atividade em cinases. Como um dos principais grupos de enzimas regulatórias do organismo, as proteínas cinases formam um conjunto bastante amplo de enzimas, todas elas com alto grau de similaridade do sítio ativo.

Algumas das cinases descritas com potencial de atividade além de GSK-3 β são: tirosinas cinases (TKs), proteínas cinases ativadoras de mitógenos (MAPKs), caseína cinases (CKs), proteínas cinases dependentes de ciclina (CDKs), entre outras.

A maioria dessas proteínas possui alguma relação com GSK-3 β , com DA ou com alguma outra enfermidade também relacionada com GSK-3 β . Além disso, as características que determinam um potencial de atividade para uma única classe de enzima formam um conjunto muito restrito de parâmetros que dificilmente serão alcançados.

Dessa forma, devido à grande similaridade existente entre a maioria das proteínas cinases, uma predição de atividade positiva para essas cinases foi considerado um resultado significativo/promissor.

Os compostos **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **8**, **10**, **11**, **15** e **18** (47%) apresentaram predição de atividade para serino-treonina cinases, classe de cinases essa que inclui a GSK-3 β . Essa predição coloca esses compostos um passo à frente dos outros (inibidores de cinases), uma vez que a semelhança com GSK-3 β é ainda maior.

Os compostos **7**, **9**, **13** e **19** apresentaram predição de atividade específica para GSK-3 β . Nesse tipo de estudo de predição, quando se alcança um resultado específico para o alvo estudado, pode-se considerar um excelente resultado e esse conjunto de moléculas torna-se o foco principal dos estudos na busca por inibidores de GSK-3 β .

Os compostos **4** e **17** apresentam predição para CDK-1, o composto **12** para MAPK, o composto **14** para CK-2 α e o composto **16** para MAPK e para TK. Todos eles estão direta ou indiretamente envolvidos com DA, GSK-3 β ou alguma outra doença que também envolve GSK-3 β . Dessa forma, também é interessante se manter elas no conjunto de compostos selecionados nessa etapa.

A seguir tem-se nas figuras 33, 34 e 35 os resultados das validações do *docking ensemble* para as 3 estruturas utilizadas.

Figura 33: Validação do inibidor IXM (a), referente ao complexo de código PDB 1Q41 para os estudos de *docking ensemble*. Com carbonos em azul, o inibidor na conformação cristalográfica e, em cinza, o resultado obtido na validação.

Figura 34: Validação do inibidor Z48 (b), referente ao complexo de código PDB 3I4B para os estudos de *docking ensemble*. Com carbonos em verde, o inibidor na conformação cristalográfica e, em cinza, o resultado obtido na validação.

Figura 35: Validação do inibidor 7YG (c), referente ao complexo de código PDB 4ACC para os estudos de *docking ensemble*. Com carbonos em cor laranja, o inibidor na conformação cristalográfica e, em cinza, o resultado obtido na validação.

A validação do *docking ensemble* revelou a eficácia dessa metodologia em buscar atingir a conformação cristalográfica de cada um dos três inibidores IXM (a), Z48 (b) e 7YG (c). Dessa forma, foi possível utilizar essa metodologia como forma de se propor modos de ligação para as 19 moléculas selecionadas no trabalho.

Foi feito então o estudo de *docking ensemble* com as moléculas “sobreviventes” das etapas anteriores. A seguir, pode-se observar os resultados das sobreposições dos resultados de cada uma das estratégias com a proposição do modo de ligação para os 19 compostos selecionados.

Em evidência estão apenas as ligações de hidrogênio, que são as principais interações responsáveis pela determinação do modo de encaixe das moléculas no sítio ativo da GSK-3 β . Para todos os casos, todas as moléculas também são estabilizadas pelas interações hidrofóbicas de van der Waals através dos aminoácidos Ile62, Val70, Ala83, Val110, Leu132, Thr138, Leu188 e Cys199.

Figura 36: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **1**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Para o composto **1**, observa-se que houve uma inversão do modo de ligação obtido na triagem por similaridade. As duas poses são proposições válidas, uma vez que ambas mantêm duas ligações de hidrogênio principais. Primeira, a carbonila central interagindo com Val135, que é a principal interação, e a segunda interação, invertendo a posição da amina que no primeiro caso interage com Pro136 e no segundo caso, com Asp133.

A proposição de modo de ligação para o composto **1** é válida pois, mesmo estando em posições invertidas, ambas poses são possíveis, visto que essa molécula possui alto grau de rigidez (nenhuma ligação rotacionável) e, por isso, seu padrão de ligação possui menos incertezas.

Figura 37: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **2**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

A proposição de modo de ligação para o composto **2** é bastante satisfatória. O estudo de *docking ensemble* foi capaz de encontrar com precisão a pose obtida nos estudos de similaridade, mantendo as mesmas ligações de hidrogênio com Val135 e Lys85.

Figura 38: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **3**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Como no caso do composto **1**, no resultado do composto **3** também houve uma inversão da molécula, mantendo também as mesmas interações. A pose do estudo de similaridade mantém 2 ligações de hidrogênio, uma com a cadeia principal de Val135 e outra com a cadeia principal de Asp133. A diferença ocorre pela inversão

das aminas. No primeiro caso a amina do grupo imidazol (condensado) interage com Val135, já no segundo, o mesmo grupo interage com Asp133.

Por manter as mesmas características do composto **1**, tanto na questão das interações quanto na estrutura e rigidez da molécula, o resultado para o composto **3** também foi considerado válido como proposição de modo de ligação.

Figura 39: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **4**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Analisando o resultado de proposição de modo de ligação para o composto **4**, observa-se que se encaixa no mesmo caso já descrito para os compostos **1** e **3**. Ambas as ligações de hidrogênio são feitas com a carbonila de cadeia principal de Val135, e a inversão ocorre lateralmente (invertendo as posições dos grupos tiol e tiofeno).

No primeiro caso (estudo de similaridade) o grupo tiofeno que está realizando ligação de hidrogênio com a amina de cadeia principal de Val135 e, no segundo caso (*docking ensemble*), essa interação é feita pelo grupo tiol. Ambos os nitrogênios pirimidínicos são igualmente capazes de interagir com a amina de cadeia principal de Val135.

Figura 40: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **5**. A pose obtida no estudo de similaridade (Estratégia 1) representado em laranja e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Para o composto **5** podemos notar que houve uma adequada proposição de modo de ligação, mantendo as ligações de hidrogênio com Val135 e Lys85. No *docking ensemble* ocorreu um pequeno desvio na porção da molécula que possui a amina terciária, porém, esse desvio não prejudica o resultado uma vez que essa região do sítio ativo está na extremidade da enzima e é uma região bastante espaçosa que permite esse deslocamento.

Figura 41: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **6**. A pose obtida no estudo de *docking* (Estratégia 2) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

O resultado do *docking ensemble* para o composto **6** manteve rigorosamente a pose de *docking* (Estratégia 2). A proposta de modo de ligação foi bem próxima do

resultado da Estratégia 2, mantendo as ligações de hidrogênio com Val135 e com a hidroxila de Tyr134.

Figura 42: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **7**. A pose obtida no estudo de *docking* (Estratégia 2) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

A proposta de modo de ligação para o composto **7** também foi bastante fiel ao resultado proveniente da Estratégia 2, mantendo a mesma pose e ligações de hidrogênio com Val135.

Figura 43: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **8**. A pose obtida no estudo de *docking* (Estratégia 2) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Observando-se a proposta de modo de ligação para o composto **8**, nota-se uma boa sobreposição entre os dois resultados. O *docking ensemble* corrigiu a orientação

do anel de piridina, permitindo a interação com Lys85, porém, inverteu a orientação do anel aromático, impedindo a ligação de hidrogênio do oxigênio com a hidroxila de Tyr134. Essa última inversão não interfere na qualidade do resultado pois depende apenas de uma ligação rotacionável que não altera significativamente a área ou o volume da molécula.

Figura 44: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **9**. A pose obtida no estudo de farmacóforo (Estratégia 3) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

O *docking ensemble* não foi capaz de propor um modo de ligação satisfatório para o composto **9**. A possível explicação para esse caso pode estar envolvida com o posicionamento do grupo sulfonamida, que no resultado de farmacóforo ficou posicionado para realizar ligação de hidrogênio com Val135 aparentemente desfavorável.

Outra explicação para o resultado pode ser a flexibilidade da molécula, a qual possui 5 ligações rotacionáveis em sequência, podendo, com isso, ser um ponto negativo para o estudo de *docking ensemble*.

Figura 45: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **10**. A pose obtida no estudo de farmacóforo (Estratégia 3) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Já para o caso do composto **10**, a proposição de modo de ligação não manteve a pose do resultado de farmacóforo, porém, ao se fazer uma análise comparativa dos outros ligantes e de suas poses, podemos concluir que o resultado do *docking ensemble* foi melhor que o resultado da Estratégia 3, pois ocupou regiões conhecidas do sítio (com maior frequência de encaixe de inibidores), mantendo as ligações de hidrogênio com Val135 e Asp133.

Figura 46: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **11**. A pose obtida no estudo de farmacóforo (Estratégia 3) representado em amarelo e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

O resultado para o composto **11** é semelhante ao observado para o composto **10**, em que a proposição de modo de ligação posicionou a molécula de forma mais

satisfatória do que propriamente o que foi obtido na Estratégia 3. Houve uma inversão do posicionamento da molécula, alterando o posicionamento da amina no anel quinolínico, que no primeiro caso (Estratégia 3) faz ligação de hidrogênio com Asp133 e, no segundo caso (*docking ensemble*), com Val135.

Figura 47: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **12**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

O composto **12** foi bem posicionado nos estudos de *docking ensemble*, havendo boa sobreposição com o resultado obtido na Estratégia 4. As principais ligações de hidrogênio com Val 135, Asp133, Lys85 e Asp200 foram mantidas.

Figura 48: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **13**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Podemos observar que, para o composto **13**, a sobreposição do resultado de *docking ensemble* com o resultado obtido na Estratégia 4 também foi eficaz em se propor um modo de ligação. Somente uma rotação no grupo dimetoxibenzeno, que permite uma ligação de hidrogênio adicional com Asp200, obtida no resultado da Estratégia 4, que não é mantida no resultado de *docking ensemble*. Essa diferença também envolve uma única ligação rotacionável e sua inversão não gera grandes alterações conformacionais, de área superficial ou volume.

Figura 49: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **14**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

O composto **14** obteve um resultado para proposição de modo de ligação mais favorável do que o próprio resultado obtido com a Estratégia 4. O *docking ensemble* foi capaz de corrigir o posicionamento da molécula, melhorando as ligações de hidrogênio realizadas com Tyr134, Val135, Asp133 e Lys85.

Figura 50: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **15**. A pose obtida no estudo de *docking* + similaridade (Estratégia 4) representado em laranja e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Da mesma forma do que o ocorrido para os compostos **12**, **13** e **14**, a proposição de modo de ligação para o composto **15** também conseguiu manter o resultado obtido na Estratégia 4. As ligações de hidrogênio com os resíduos de Val135 e Lys85 também foram mantidas.

Figura 51: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **16**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

O resultado de *docking ensemble* foi capaz de propor um bom modo ligação para o composto **16**. As principais interações com os resíduos de Val135, Tyr134 e Lys85 foram mantidas. Observe uma ligeira mudança na orientação do anel alquílico,

o qual obteve uma conformação mais favorável na proposta do que aquela obtida pela Estratégia 5.

Figura 52: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **17**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

A proposta de modo de ligação para o composto **17** foi capaz de melhorar o posicionamento obtido na Estratégia 5. O encaixe da molécula está mais favorável, bem como as ligações de hidrogênio com Val135 e Lys85.

Figura 53: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **18**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em verde e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

De acordo com os resultados, o *docking ensemble* para o composto **18** foi capaz de propor um bom modo de ligação, mantendo a pose obtida na Estratégia 5 e as principais interações com Val135, Asp133 e Lys85. A única alteração foi no posicionamento no anel pirimidínico, sendo que, no *docking ensemble*, o modo de ligação representa uma conformação mais realista do que aquele obtido na Estratégia 5.

Figura 54: Resultado da proposição de modo de ligação para o composto **19**. A pose obtida no estudo de farmacóforo + similaridade (Estratégia 5) representado em azul e o resultado do *docking ensemble* em cinza.

Para o composto **19**, a proposição de um modo de ligação também foi capaz de alcançar a pose obtida através da Estratégia 5 e manter a ligação de hidrogênio com Val135, porém, com duas pequenas alterações pontuais ocasionadas por uma simples rotação de uma ligação simples. Essas duas alterações não comprometem a qualidade do modelo e ambas são igualmente possíveis e energeticamente favoráveis.

4.10 Ensaio de inibição enzimática *in vitro*

O ensaio de inibição enzimática *in vitro* foi realizado somente com os compostos remanescentes oriundos da Estratégia 3. Os três compostos foram adquiridos comercialmente e submetidos ao ensaio biológico. Seu resultado pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados do ensaio de inibição enzimática dos três compostos selecionados através da Estratégia 3. Seus nomes e respectivas porcentagens de inibição de GSK-3 β , à concentração de 10 μ M.

	Composto	% Inibição GSK-3 β 10 μ M
9	3_ii_ZINC00157747	12,14 $\pm$ 0,95
10	3_ii_ZINC08581401	7,44 $\pm$ 1,13
11	3_ii_ZINC08581599	34,25 $\pm$ 2,26

Figura 55: Representação 2D dos compostos **9**, **10** e **11**.

O composto **11** foi o mais ativo, com uma boa atividade para GSK-3 β , sendo capaz de inibir 34,25% da enzima, em uma concentração de 10 μ M. O composto **9** demonstrou uma atividade intermediária inibindo 12,14% a 10 μ M, e o composto **10** foi o de menor atividade, inibindo apenas 7,44% da enzima.

O resultado do ensaio para o composto **11** é bastante interessante, de 35% de inibição à 10 μ M. Os resultados dos compostos **9** e **10** também são válidos, pois uma inibição branda de GSK-3 β é capaz regular sua atividade sem a presença de efeitos adversos.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste projeto teórico-experimental abordou-se um extenso protocolo de planejamento de fármacos baseado em ligantes e/ou planejamento de fármacos baseado em estrutura, com aplicação de protocolos de triagem virtual em banco de dados de milhares de moléculas, com posteriores estudos de predição de farmacocinética, predição de toxicidade, predição de atividade biológica, estudos de *docking ensemble* e ensaio de inibição enzimática *in vitro*.

Através da elaboração e aplicação de 5 diferentes estratégias, obteve-se como resultado um conjunto de 19 compostos, dos quais 3 deles (compostos **9**, **10** e **11**) já passaram por ensaio de inibição enzimática *in vitro* e demonstraram valores aceitáveis de inibição para GSK-3 β (composto **9** 12,14%; composto **10** 7,44%; composto **11** 34,25%).

Como perspectivas futuras tem-se a aquisição e aplicação do mesmo protocolo de ensaio *in vitro* para os 16 compostos restantes, novos estudos de propostas de modificação molecular visando uma melhora das propriedades dos compostos que obtiveram os melhores resultados, bem como um aumento na afinidade com a enzima e consequentemente na atividade inibitória.

Adicionalmente, o planejamento *in silico* será também direcionado ao sítio alostérico da GSK-3 β , para o qual pouco inibidores têm sido reportados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., *EMBO J.*, **1997**, 16, 3797-3804.
- Accardi, G., Caruso, C., Colonna-Romano, G., Camarda, C., Monastero, R., Candore, G. *Rejuven. Research*, **2012**, 15(2), 217-221.
- Accelrys Software Inc. Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., **2013**.
- Aghdam, S.Y., Barger, S.W., *Curr. Alzheimer Res.*, **2007**, 4, 21-31.
- Alzheimer A. (1907) Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin, **1907**, 64, 3.
- Avila, J., Hernández, F., *Expert Rev. Neurother.*, **2007**, 7(11), 1527-1533.
- Bartus, R.T., Dean III, R.L., Beer, B., Lippa, A.S. *Science*, **1982**, 217, 408-417.
- Bax, B., Carter, P.S., Lewis, C., Guy, A.R., Bridges, A., Tanner, R., Pettman, G., Mannix, C., Culbert, A.A., Brown, M.J., Smith, D.G., Reith, A.D., *Structure (Camb)*, **2001**, 9, 1143-1152.
- Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormo, M., Nilsson, Y., Radesater, A.C., Jerning, E., Markgren, P.O., Borgegard, T., Nylof, M., Gimenez-Cassina, A., Hernandez, F., Lucas, J.J., Diaz-Nido, J., Avila, J., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(46), 45937-45945.
- Bennett, B.M., Reynolds, J.N., Prusky, G.T., Douglas, R.M., Sutherland, R.J., Thatcher, G.R.J. *Neuropsychopharm.*, **2007**, 32, 505-513.
- Bertrand, J.A., Thieffine, S., Vulpatti, A., Cristiani, C., Valsasina, B., Knapp, S., Kalisz, H.M., Flocco, M., *J. Mol. Biol.*, **2003**, 333, 393-407.
- Bian, H., Bian, W., Lin, X., Ma, Z., Chen, W., Pu, Y. *Neurochem Res*, **2016**, 41:2470–2480.
- Bouskila, M., Hirshman, M.F., Jensen, J., Goodyear, L.J., Sakamoto, K. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2008**, 294, E28-E35.
- BrightFocus Foundation, 2000. Disponível em: <http://www.brightfocus.org/alzheimers/infographic/brain-alzheimers-disease>. Acesso em: 2 de fev. 2017.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. *Brain Research Rev.*, **2000**, 33, 95-130.
- Caballero, J., Muñoz, C., Alzate-Morales, J.H., Cunha, S., Gano, L., Bergman, R., Steinbach, J., Kniess, T., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 58, 272-280.

Chalecka-Franaszek, E., Chuang, D.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 8745-8750.

Chen, X., Lin, Y., Gilson, M.K., *Biopolymers Nucleic Acid Sci.*, **2002**, 61, 127-141.

Chen, X., Lin, Y., Liu, M., Gilson, M.K., *Bioinf.*, **2002**, 18, 130-139.

Chen, X., Liu, M., Gilson, M.K., *J. Combi. Chem. High-Throughput Screen.*, **2001**, 4, 719-725.

Chen, X., Reynolds, C.H. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2002**, 42, 1407-1414.

Cho, J.H., Johnson, G.V., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 187-193.

Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W. *J. Mol. Biol.* **1977**, 116(2), 207-225.

Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R. *Science*, **1983**, 219, 1184-1190.

Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C. and Pearl, L.H., *Cell*, **2001**, 105(6), 721-732.

Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P., *Biochem. J.*, **2000**, 351, 95-105.

De la Monte, S.M., Wands, J.R. *J. Diabetes Sci. Technol.*, **2008**, 2(6), 1101-1113.

Dickson D. W., Crystal H. A., Bevona C., Honer W., Vincent I., Davies P. *Neurobiol. Aging* **1995**, 16, 285-304.

Dror, O., Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J., *J. Chem. Inf. Model.*, **2009**, 49(10), 2333-2343.

Dvir, H., Jiang, H.L., Wong, D.M., Harel, M., Chetrit, M., Jin, G.Y., Tang, X.C., Silman, I., Bai, D.L., Sussman, J.L., *Biochem.*, **2002**, 41, 10810-10816.

Ferreira, S.T., Clarke, J.R., Bomfim, T.R., De Felice, F.G. *Alzheimer's & Dementia*, **2014**, 10, 576-583.

Filimonov, D.A., Lagunin, A.A., Glorizova, T.A., Rudik, A.V., Druzhilovskii, D.S., Pogodin P.V., Poroikov, V.V., *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2014**, 50(3), 444-457.

Fiol, C.J., Haseman, J.H., Wang, Y.H., Roach, P.J., Roeske, R.W., Kowalczyk, M., Depaoliroach, A.A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1988**, 267, 797-802.

Fiol, C.J., Wang, A.Q., Roeske, R.W., Roach, P.J., *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 6061-6065.

Foudah, A.I., Sallam, A.A., Akl, M.R., El Sayed, K.A., *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 73, 310-324.

- Frame, S., Cohen, P., *Biochem. J.*, **2001**, 359, 1-16.
- Greenamyre, J.T., Maragos, W.F., Albin, R.L., Penney, J.B., Young, A.B. *Prog. Neuro-psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, **1988**, 12, 421-430.
- Grimes, C.A., Jope, R.S., *Prog. Neurobiol.*, **2001**, 65, 391-426.
- ter Haar, E., Coll, J.T., Austen, D.A., Hsiao, H.M., Swenson, L., Jain, J., *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, 8, 593-596.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P. and Anderton, B.H., *Neurosci. Lett.*, **1992**, 147, 58–62.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T., *Science*, **1988**, 241, 42–52.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., *Methods Enzymol.*, **1991**, 200, 38–62.
- Hawkins, P.C.D., Nicholls, A., *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, 52, 2919–2936.
- Hawkins, P.C.C., Skillman, A.G., Nicholls, A., *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 74.
- Hawkins, P.C.C., Skillman, A.G., Warren, G.L., Ellingson, B.A., Stahl, M.T., *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 572-584.
- Hers, I., Tavaré, J.M., Denton, R.M., *FEBS Lett.*, **1999**, 460, 433-436.
- Hong, M., Chen, D.C., Klein, P.S., Lee, V.M., *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 25326-25332.
- Hopper, C., Killick, R., Lovestone, S., *J. Neurochem.*, **2008**, 104(6), 1433-1439.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F., Woodgett, J.R., *EMBO J.*, **1993**, 12, 803-808.
- Inbar, Y., Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Nussinov, R., Wolfson, H.J., *Lect. Notes Comput. Sc.*, **2007**, 3692, 423-434.
- Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M.M., Bolstad, E.S., Coleman, R.G., *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, 52, 1757-1768.
- Johnson, J.W., Kotermanski, S.E. *Curr. Op. Pharmacol.*, **2006**, 6, 61-67.
- Johnson, L.N., Noble, M.E.M., Owen, D.J., *Cell*, **1996**, 85, 149–158.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., Taylor, R. *J. Mol. Biol.*, **1997**, 267, 727-748.
- Jorgensen, W.L., *Science*, **2004**, 303, 1813-1818.
- Joshi, P., McCann, G.J.P., Sonawane, V.R., Vishwakarma, R.A., Chaudhuri, B., Bharate, S.B. *J. Chem. Info. Model.*, **2017**, 57, 1309-1320.

- Kandimalla, R., Thirumala, V., Reddy, P. H. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.08.018>).
- Keiser, M.J., Roth, B.L., Armbruster, B.N., Ernsberger, P., Irwin, J.J., Shoichet, B.K., *Nat. Biotech.*, **2007**, 25(2), 197-206.
- Keserü, G.M., Makara, G.M., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2009**, 8(3), 203-212.
- Khan, K.M., Wadood, A., Ali, M., Zia-Ullah, Ul-Haq, Z., Lodhi, M.A., Khan, M., Perveen, S., Choudhary, M.I. *J. Mol. Graph. Model.*, **2010**, 28, 792-798.
- Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Schuster, D., Spitzer, G.M., Liedl, K.R., *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 7021-7040.
- Klein, P. S., Melton, D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 8455-8459.
- Kunrungsee, T., Saiki, T., Akiyama, S., Nakashima, K., Tanaka, M., Kobayashi, Y., Matsui, T., *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1840, 3073-3078.
- Larson, M.E., Lesné, S.E. *J. Neurochem.*, **2012**, 120, 125-139.
- Lather, V., Kristam, R., Saini, J.S., Kristam, R., Karthikeyan, N.A., Balaji, V.N., *QSAR Comb. Sci.*, **2008**, 27(6), 718-728.
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G., Meijer, L., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 251-260.
- Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.Z., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Kunick, C., Meijer, L., *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 5983-5994.
- Liu, T., Lin, Y., Wen, X., Jorissen, R.N. and Gilson, M.K., *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, D198-D201.
- Lourenco, M.V., Ferreira, S.T., De Felice, F.G. *Prog. Neurobiol.*, **2015**, 129, 37-57.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J., Anderton, B.H., *Neuroscience*, **1996**, 73, 1145-1157.
- Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S., *Curr. Biol.*, **1994**, 4, 1077-1086.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E. *Am. J. Pathol.*, **1999**, 155, 853-862.
- Marchant, C.A., Briggs, K.A., Long A., *Toxicol. Mech. Methods*, **2008**, 18(2-3), 177-187.
- Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Perez, C., Moreno, F.J., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1292-1299.

Martinez, A., *Med. Res. Rev.*, **2008**, 28(5), 773-796.

McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L. *Ann. Neurol.*, **1999**, 46, 860-866.

Muñoz-Montaño, J.R., Moreno, F.J., Avila, J., Diaz-Nido, J., *FEBS Lett.*, **1997**, 411, 183-188.

National Institute on Aging 31 Center Drive, MSC2292, Bethesda, MD 20892.

Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Mudaliar, S., Mohideen, P., Carter, L., Henry, R.R. *Diabetes*, **2000**, 49, 263-271.

Oprea, T.I., (ed). In *Chemoinformatics in Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.

Perola, E., Charifson, P.S., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 2499-2510.

Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M., Klein, P.S., *Nature*, **2003**, 423, 435 - 439.
Reichman, W.E., *Ann. Gen. Hosp. Psychiatry*, **2003**, 2, 1-12.

Phukan, S., Babu, V.S., Kannoji, A., Hariharan, R., Balaji, V.N. *British J. Pharmacol.*, **2010**, 160, 1-19.

Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J., *Nucleic Acid Res.*, **2008**, 36, W223-W228.

Schrödinger, LLC, Small-Molecule Drug Discovery Suite **2015-4**: QikProp, version 4.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2015**.

Shintani, E.Y., Uchida, K.M., *Am. J. Health-Syst. Ph.*, **1997**, 54, 2805-2812.

Smith, D.G., Buffet, M., Fenwick, A.E., Haigh, D., Ife, R.J., Saunders, M., Slingsby, B.P., Stacey, R., Ward, R.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 635-639.

Stambolic, V., Ruel, L., Woodgett, J.R., *Curr. Biol.*, **1996**, 6, 1664-1668.

Sun, H., Pan, P., Tian, S., Xu, L., Kong, X., Li, Y., Li, D., Hou, T., *Sci. Rep.*, **2016**, 6(24817) 1-12.

Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R. *Ann. Neurol.*, **1991**, 30, 572-580.

Verdonk, M.L., Chessari, G., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., Nissink, J.W.M., Taylor, R.D., Taylor, R., *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 6504-6515.

Wagner, U., Utton, M., Gallo, J.M., Miller, C.C., *J. Cell. Sci.*, **1996**, 109, 1537-1543.

Wang, H., Duffy, R.A., Boykow, G.C., Chackalamannil, S., Madison, V.S., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 2439-2446.

Wang, Y.H., Roach, P.J., *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 23876-23880.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, *72*(5), 1858–1862.

Wermuth, C.G., Ganellin, C.R., Lindberg, P., Mitscher, L.A., *Pure Appl. Chem.*, **1998**, *70*(5), 1129-1143.

Wikipedia, The Free Encyclopedia, 2017. Disponível em: <
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Neurofibrillary_tangle&oldid=777831910>
Acesso em: 03 de fev. 2017.

Williams, R.S.B., Harwood, A.J., *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, *21*, 61-64.

Woodgett, J.R., *Embo J.*, **1990**, *9*(8), 2431-2438.

Xu, Z., Yu, Z., Nai, S., Shi, R., Tang, Q., Zhang, H., Ye, L., Wang, L., Hong, Y. *Bioorg. Chem.*, **2017**, *74*, 115-121.

Yan, C., Liu, D., Li, L., Wempe, M.F., Guin, S., Khanna, M., Meier, J., Hoffman, B., Owens, C., Wysoczynski, C.L., Nitz, M.D., Knabe, W.E., Ahmed, M., Brautigan, D.L., Paschal, B.M., Schwartz, M.A., Jones, D.N.M., Ross, D., Meroueh, S.O., Theodorescu, D., *Nature*, **2014**, *515*, 443-457.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).