UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de Alzheimer

Evandro Pizeta Semighini

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de
Alzheimer**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientado(a): Evandro Pizeta Semighini

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em 13/06/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2013

SEMIGHINI, E. P.	Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de Alzheimer	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO FCFRPUSP 2013

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.

Semighini, Evandro Pizeta

Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de Alzheimer, 2013.

89 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: da Silva, Carlos Henrique Tomich de Paula.

1. Mal de Alzheimer. 2. Planejamento racional de Fármacos.
3. Beta-secretase 1.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Evandro Pizeta Semighini

Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de Alzheimer

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese a minha esposa Flávia, cujo apoio, amor, compreensão e ajuda foram vitais para o desenvolvimento do trabalho. Sem você, não teria aprendido como navegar pelo mar bravio para, assim, chegar às águas mais tranquilas.

Agradecimentos

A meus pais, Mara e Dirceu, meus irmãos, Camile e Dirceu, e minha esposa, Flávia, por todo o amor, alegria e suporte que me deram durante toda a vida e me tornaram a pessoa que sou.

A meu pai e a minha tia Zica (*in memoriam*) por terem plantado e semeado as sementes da curiosidade e do prazer em aprender.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Vinícius, Daniel, Jonathan, Ricardo, Flávio, João, e, com agradecimento especial, Susi, pelos momentos de descontração, troca de experiências, informações e orientações sobre o que fazer durante nossa convivência e desenvolvimento do projeto.

Ao professor Dr. Hamilton Cabral e à técnica de seu laboratório, Nathalia Gonsales da Rosa, pela colaboração para realização dos ensaios enzimáticos e análise fluorimétrica.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro sem o qual não teria concluído o doutorado.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, por todo o suporte e orientação prestados nos mais de sete anos que trabalho sob sua supervisão.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, pela infraestrutura, docentes, funcionários e ensinamentos passados nos mais de 11 anos em que sou seu aluno.

"Muito a aprender você ainda tem."

- Mestre Yoda

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

- Simone de Beauvoir

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser.. mas ainda bem, não somos o que éramos."

- Martin Luther King (adaptação)

RESUMO

SEMIGHINI, E. P. **Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de Alzheimer**. 2013. 106f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O Mal de Alzheimer é o maior causador de demência em idosos: acomete 10% da população mundial com idade em torno dos 65 anos e atinge cerca de 50% dos indivíduos com mais de 85 anos. A progressão dos sintomas da doença está associada a modificações estruturais nas sinapses colinérgicas em determinadas regiões cerebrais. A maior característica fisiopatológica do AD é a deposição de placas neuríticas extracelulares em áreas cerebrais relacionadas à memória, placas constituídas pelo peptídeo β -amiloide 40/42, que é formado pela clivagem da Proteína Precursora Amiloide, durante seu metabolismo pela via amiloidogênica, que começa com a enzima β -secretase. O objetivo do trabalho foi o planejamento e avaliação de novos inibidores de β -secretase. Para isso, foram utilizadas diferentes técnicas de modelagem molecular e planejamento de moléculas, tendo como base os inibidores da β -secretase descritos na literatura cujas estruturas estão depositadas no PDB. Posteriormente, foi realizada a avaliação *in vitro* da atividade inibitória de algumas destas moléculas, onde observou-se que três são capazes de satisfatoriamente inibir a atividade da β -secretase na concentração de 1 μ M.

Palavras chave: Mal de Alzheimer, beta-secretase-1, planejamento racional de fármacos.

ABSTRACT

SEMIGHINI, E. P. **Rational design of beta-Secretase inhibitors in Alzheimers disease**. 2013. 106f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The Alzheimer's disease is the major cause of elderly dementia: it affects 10% of global population with 65 years old and about 50% of individuals with 85 years old or more. The evolution of the disease symptoms is associated with structural changes in cholinergic synapses at certain brain regions. The major pathophysiological feature of AD is the deposition of extracellular neuritic plaques in areas of the brain related to memory. The β -amyloid peptide 40/42 constitutes the plaques. It's formed by cleavage of the amyloid precursor protein during its metabolism by the amyloidogenic pathway, which starts with the β -secretase enzyme. The goal of this project was the planning and evaluation of new β -secretase inhibitors activity. For this, we used different molecular modeling and drug design techniques, based on the β -secretase inhibitors described in the literature, whose structures are deposited in the PDB, with subsequent *in vitro* evaluation of this molecules activity. The *in vitro* assays showed three molecules able to inhibit β -secretase at 1 μ M.

Keywords: Alzheimer's, beta-secretase-1, rational drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clivagem da proteína precursora amiloide e formação da placa amiloide.	3
Figura 2. Sítio catalítico da BACE-1, mostrando a alça <i>flap</i> em uma estrutura complexada com ligante (2WF1, em azul) e uma estrutura sem ligante (2WGZ, em bordô).	4
Figura 3. Representação da clivagem da proteína precursora amiloide nas vias não amiloidogênica (A) pela alfa-secretase e (B) amiloidogênica pela beta-secretase e subsequentemente gama-secretase [83].	7
Figura 4. Representação da citopatologia do mal de Alzheimer, mostrando os agregados neurofibrilares (tangle), os oligômeros de peptídeos amiloides (A β) e as placas senis (placa amiloide) (SELKOE, J. D., 2004 a).	9
Figura 5. Resumo da metodologia utilizada no projeto.	11
Figura 6. “ <i>Scaffold</i> ” produzido a partir do ligante presente no complexo selecionado 2WF1 do PDB e utilizado para tendenciar alguns cálculos de triagem virtual.	14
Figura 7. Estruturas dos inibidores utilizados como <i>input</i> para geração do farmacóforo. 2WF2 (1), 2WF3 (2), 2VJ7 (3), 2VIY (4).	18
Figura 8. Estruturas dos inibidores utilizados como <i>input</i> para geração do farmacóforo. 2VJ6 (1), 2WF0 (2), 2IQG (3), 2QMD (4).	19
Figura 9. Estruturas dos inibidores utilizados como <i>input</i> para geração do farmacóforo. 3CIC (1), 2QMF (2), 3CID (3).	20
Figura 10: Estruturas dos inibidores utilizados como <i>input</i> para geração do farmacóforo. 2OAH (1), 2B8L (2) e 2WF1 (3).	21
Figura 11. Sobreposição de 12 complexos (2IS0, 1TQF, 1W51, 1XS7, 1YM2, 2B8L, 2B8V, 2EWY, 2F3E, 2F3F, 2FDP, 2G94), onde nota-se grande semelhança da disposição das estruturas secundárias da BACE-1 obtidas de complexos com origens diferentes.	26
Figura 12. Representação do sítio catalítico da BACE-1, indicando os átomos utilizados para a calibração dos programas de triagem virtual. A seta azul indica o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 93, a seta preta indica o Oxigênio da Glicina 95, a seta vermelha indica o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 289, e a seta verde indica a alça <i>flap</i> .	27

- Figura 13. Resultado do teste para a definição das configurações a serem empregadas no programa GOLD, para os ensaios de triagem virtual. Em verde, a conformação avaliada como a melhor das 10 geradas pelo GOLD, em lilás, a oriunda do complexo depositado no PDB e, com os carbonos em cinza, as demais nove conformações obtidas. 28
- Figura 14. Grupos farmacofóricos sobrepostos ao ligante 2WF1, em duas. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptores de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, hidrofóbico em azul claro. 30
- Figura 15. Grupos farmacofóricos dentro do sítio catalítico da BACE-1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptores de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, hidrofóbico em azul claro. 31
- Figura 16. Grupos farmacofóricos dentro do sítio catalítico da BACE-1 junto com o ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptores de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, hidrofóbico em azul claro. 31
- Figura 17. Grupos farmacofóricos sobrepostos ao ligante do complexo 2WF1. Grupos doadores de ligações de hidrogênio representados em rosa,ceptor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbicos aromáticos em azul escuro, hidrofóbicos em azul claro, anel aromático em laranja. 32
- Figura 18. Subfarmacóforo 1 sobreposto ao ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa,ceptor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, e hidrofóbico em azul claro. 33
- Figura 19. Subfarmacóforo 2 sobreposto ao ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa,ceptor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromáticos em azul escuro, hidrofóbico em azul claro e anel aromático em laranja. 34
- Figura 20. Subfarmacóforo 3 sobreposto ao ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa,ceptor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico em azul claro e anel aromático em laranja. 34
- Figura 21. Representação do grupo de prova C1= com contorno -3,2 kcal/mol e o 42

ligante do complexo 2WF1. A seta amarela indica a sobreposição do anel com a região indicada como favorável a interagir com anéis aromáticos.

Figura 22. Representação do grupo de prova N2+ com contorno -10,5 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. A seta amarela indica a sobreposição de um nitrogênio com a região indicada como favorável a interagir com nitrogênios. 42

Figura 23. Representação do grupo de prova O.. com contorno -8 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. As setas amarelas indicam a sobreposição de oxigênios carbonílicos com as regiões indicadas como favoráveis a interagir com oxigênios carbonílicos. 43

Figura 24. Representação do grupo de prova O com contorno -6 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. As setas amarelas indicam a sobreposição de oxigênios carbonílicos com as regiões indicadas como favoráveis a interagir com oxigênios carboxílicos. 43

Figura 25. Representação do grupo de prova OH2 com contorno -10 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. A seta amarela indica a sobreposição de uma amida com a região indicada como favorável a interagir com moléculas de água. 44

Figura 26. Estruturas bidimensionais dos compostos F2_1, ZINC_8, F3_1 e F1_ZINC_7 67

Figura 27. Estruturas bidimensionais dos compostos F1_Chembridge_4, F2_Diverset_3, F2_Chembridge_7, F2_Chembridge_7, F1_Chembridge_3 e Chembridge_1. 68

Figura 28. Gráfico representando a atividade inibitória do composto F2_1. 69

Figura 29. Gráfico representando a atividade inibitória do composto ZINC_8. 70

Figura 30. Gráfico representando a atividade inibitória do composto F1_ZINC_7. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Listagem dos códigos PDB dos 86 complexos que foram utilizados para a escolha dos parâmetros a serem empregados nos cálculos de triagem virtual.	12
Tabela 2 - Resultados dos cálculos de triagem virtual realizados com os três subfarmacóforos, em cada base de dados.	35
Tabela 3 - Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada no subfarmacóforo 1 e o sítio catalítico da BACE-1.	37
Tabela 4 - Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada no subfarmacóforo 2 e o sítio catalítico da BACE-1.	38
Tabela 5 - Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada no subfarmacóforo 3 e o sítio catalítico da BACE-1.	39
Tabela 6 - Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura e em farmacóforo, e o sítio catalítico da BACE-1.	40
Tabela 7 - Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura e o sítio catalítico da BACE-1.	40
Tabela 8 - Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais com o sub-farmacóforo 1.	45
Tabela 9 - Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais com o sub-farmacóforo 1.	45
Tabela 10 - Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais com o sub-farmacóforo 3.	46
Tabela 11 - Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais baseadas em estrutura.	46
Tabela 12 - Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais baseadas em estrutura e em farmacóforo.	46
Tabela 13 - Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante e por farmacóforo.	47

Tabela 14 - Resultados da análise do Pharmmapper para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 1.	48
Tabela 15 - Resultados da análise do Pharmmapper para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 2.	49
Tabela 16 - Resultados da análise do Pharmmapper para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 3.	52
Tabela 17 - Resultados da análise do Pharmmapper para os compostos selecionados pela triagem baseada em estrutura	56
Tabela 18 - Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 1.	57
Tabela 19 - Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 2.	58
Tabela 20 - Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 3.	59
Tabela 21 - Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelas triagens virtuais baseadas em estrutura e em farmacóforo.	60
Tabela 22 - Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelas triagens virtuais baseadas em estrutura.	60
Tabela 23 - Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 1.	62
Tabela 24 - Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 2.	63
Tabela 25 - Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 3.	64
Tabela 26 - Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante e em sub-farmacóforo.	65
Tabela 27 - Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante.	66

Tabela 28 - Resultados dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da BACE-1 realizados com o composto F2_1, mostrando as concentrações utilizadas, os valores de fluorescência aferidos e o percentual de inibição da atividade da BACE-1 que a média destes valores representa.	69
Tabela 29 - Resultados dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da BACE-1 realizados com o composto ZINC_8, mostrando as concentrações utilizadas, os valores de fluorescência aferidos e o percentual de inibição da atividade da BACE-1 que a média destes valores representa.	70
Tabela 30 - Resultados dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da BACE-1 realizados com o composto F1_ZINC_7, mostrando as concentrações utilizadas, os valores de fluorescência aferidos e o percentual de inibição da atividade da BACE-1 que a média destes valores representa.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	<i>Alzheimer's Disease</i> (Mal de Alzheimer)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
AIDS	<i>Aquired Imuno Deficiencie Sindrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida)
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Proteína Precursora Amiloide)
A β	Peptídeos β -amiloide 40/42
BACE-1	<i>Beta site APP Cleaving Enzyme</i> , ou β -Secretase
BChE	Butirilcolinesterase
CNS	<i>Central Nervous System</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i> (Mal de Alzheimer Familiar)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLIDE	<i>Grid-based Ligand Docking with Energetics</i>
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTVS	<i>High Troughput Virtual Screening</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
log BB	Coeficiente de partição cérebro/sangue
log P	Coeficiente de partição octanol/água
MIF	<i>Molecular Interaction Field</i> (Campo de Interação Molecular)
NFTs	<i>Neuro Fibrillary Tangles</i> (Emaranhados Neurofibrilares)
NMDA	N-Metil D-Aspartato, ou Glutamato
PASS	<i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root Meansquare Deviation</i> (Desvio Médio Quadrático)
ROCS	<i>Rapid Overlay of Chemical Structures</i>
SEA	<i>Similarity Ensenble Approach</i>
SII	Sistema Imune Inato
SNC	Sistema Nervoso Central (CNS)
SP	<i>Standard Precision</i>
UF	Unidades de Fluorescência
XP	<i>Extra Precision</i>
ZINC	<i>ZINC Is Not Comercial</i>

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviatuas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Mal de Alzheimer	01
1.2 β -Secretase como alvo para o planejamento de potenciais fármacos para o tratamento do Mal de Alzheimer	03
1.3 A Proteína Precursora Amiloide	06
1.4 O peptídeo beta-amiloide	07
1.5 Terapêutica Atual	09
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Preparação das bases de dados	12
3.2 Definição do sítio para experimentos de triagem virtual	12
3.3. Seleção do complexo de referência	13
3.4 Triagem Virtual	13
3.4.1 Triagem Virtual baseada em estrutura	13
3.4.1.1 O programa GOLD	13
3.4.1.1.1 Triagem virtual de bases de dados com a <i>constraint</i> Scaffold	14
3.4.1.2 O programa GLIDE	14
3.4.2 Triagem Virtual baseada em ligante	15
3.4.2.1 Uso do índice de Tanimoto, PASS e SEA	15
3.4.2.2 Omega, EON e ROCS	16
3.4.2.3 Triagem Virtual baseado em farmacóforo	16
3.4.3 Triagem Virtual baseado em estrutura e baseado em ligante	17
3.5 Métodos de Seleção de compostos	17
3.5.1 Filtragem por Farmacóforo	17
3.5.2 Análise das interações realizadas com o sítio ativo da BACE-1	22
3.5.3 Campos de Interação Molecular MIF	22
3.5.4 Cálculo de propriedades “drug like”, ADME e físico-químicas com o QikProp	23
3.5.6 PharmMapper	23
3.5.7 Predição de Toxicidade	24
3.6 Ensaios enzimáticos	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Análise dos complexos existentes no PDB	25
4.2. Seleção do complexo de referência	26
4.3. Definição de configurações dos cálculos de Triagem Virtual com o GOLD	27

4.4 Triagens virtuais baseadas em estrutura	29
4.5 Índice de Tanimoto, PASS e SEA	29
4.6 Derivação de Farmacóforo	29
4.7 Filtragem por Farmacóforo	32
4.8 Derivação do Farmacóforo para triagens virtuais	32
4.9 Triagem Virtual por Farmacóforo	35
4.10 Triagem Virtual baseada em estrutura e em Farmacóforo	35
4.11 Interações intermoleculares com o sítio da BACE-1	36
4.12 Campos de Interação Molecular	41
4.13 Pharmapper	47
4.14 Derek	57
4.15 QikProp	61
4.16 Omega, EON e ROCS	67
4.17 Ensaios Enzimáticos	67
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mal de Alzheimer

O Mal de Alzheimer (Alzheimer's Disease ou AD) é uma doença que está em foco no meio acadêmico e nas indústrias farmacêuticas, pois, mesmo sendo conhecido desde 1906, após descrição pelo patologista alemão Alois Alzheimer (SMITH, M. A. C., 1999; BERCHTOLD, N. C., 1998) e estudado com afinco há quase 70 anos (GUTIERREZ, L. J., 2010; JIN, M., 2011), ainda não existe uma explicação definitiva acerca de sua patologia, e não há um tratamento eficaz para combatê-lo em seu cerne, que é a neurodegeneração causada pelo acúmulo de peptídeos β -amiloide 40/42 ($A\beta$) (JIN, M., 2011) nos neurônios (principalmente os colinérgicos) do hipocampo, núcleo basal, córtex entorhinal e córtex associativo. Esta degeneração leva os pacientes a disfunções cognitivas, fisiológicas e comportamentais, perda de memória (FAGHIHI, M. A., 2008; DVIR, H., 2002), eventualmente incontinência, demência, acamação e morte nos estágios mais avançados (KOBAYASHI, D., 2008; CITRON, M., 2004; COLE, S. L. 2007, JAN, A., 2011).

A prevalência populacional do AD é de aproximadamente 1% abaixo da idade de 60 anos, 10% até 65 anos de idade, 40 a 50% com mais de 85 anos de idade (XU, W., 2010 a) e a doença afeta um membro da família de pelo menos 10% da população mundial (VAN DER BEEK, E. M. 2008; JOHN, S., 2011). No Brasil, não existem dados objetivos em relação à epidemiologia do AD até o momento, mas, estima-se que, nos Estados Unidos, ocorreram cerca de cinco milhões de casos no ano de 2010 (BROOKMEYER, R., 1998) e de 12 a 29 milhões de casos mundialmente (CITRON, M., 2004; COLE, S. L. 2007)

Com o crescente aumento da expectativa de vida da população mundial, associado ao aumento do número de casos da doença (JIN, N., 2011), o AD torna-se um sério caso de saúde pública e de interesses financeiros coletivos. Estima-se que, mundialmente, foram gastos 422 bilhões de dólares no tratamento de demências em 2009 (KLAVER, D. W., 2010), sendo o AD a causa mais comum de demência senil (SAMBAMURTI K., 2011; BLOCH, L., 2009).

O AD é caracterizado, microscopicamente, pela presença de placas amiloides extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares (Neuro Fibrillary Tangles, NFTs), associados à redução da eficiência e do número dos neurônios (principalmente os que usam a Acetilcolina como neurotransmissor) do Sistema Nervoso Central, causando o chamado “déficit colinérgico” (SHINTANI, E. Y., 1997; DVIR, H., 2002). Desta forma, o aumento da

capacidade de neurotransmissão colinérgica constitui atualmente o principal mecanismo de ação dos fármacos utilizados para o tratamento do AD. Esta abordagem ocorre através da inibição da enzima Acetilcolinesterase (AChE), que atua fisiologicamente nas sinapses dos neurônios colinérgicos para degradar o neurotransmissor Acetilcolina (ACh) após sua liberação e assim evitar que a neurotransmissão dure além do necessário. (DVIR, H., 2002), mas é uma abordagem paliativa, pois não interfere na progressão da doença.

Embora o conhecimento neurofisiopatológico gerado até o momento seja inconclusivo em relação ao nível de participação da proteína A β na gênese do Mal de Alzheimer, existem fortes indícios de que a produção anormal de A β seja protagonista e/ou esteja diretamente relacionada ao desenvolvimento da doença (JENNINGS, L. D., 2008; LIU, W. W., 2007).

A favor desta hipótese, conhecida como “Hipótese Amiloide”, sabe-se que os portadores da Síndrome de Down (que possuem uma cópia extra do cromossomo 21, local do gene APP, que codifica a Proteína Precursora Amiloide, APP) e famílias portadoras de mutações no gene APP (Mal de Alzheimer Familiar, FAD) apresentam altos níveis do peptídeo A β no Sistema Nervoso Central (SNC), e, em ambos os casos, incidência alta e precoce do AD. No FAD, há acúmulo do peptídeo A β anos antes do surgimento dos primeiros sintomas da doença, sugerindo que o A β é seu iniciador fisiopatológico, já que, as formas fibrilares e oligoméricas do A β , são neurotóxicas tanto *in vitro* como *in vivo*. (COLE, S. L. 2007; JIN, M., 2011)

A proteína A β tende a se agregar na forma de oligômeros, e estes, após serem excretados pelos neurônios, levam à formação das placas amiloides. Sabe-se que as placas amiloides afetam de sobremaneira a função neuronal e contribuem para a formação de lesões nas estruturas cerebrais (FUJIMOTO, T., 2000; LIU W. W., 2007; MEYER, E. P., 2008; FLIGHT, M. H., 2008), mas ainda não se sabe ao certo se o AD é causado diretamente pelas placas, pelo processo inflamatório decorrente do acúmulo de oligômeros de A β solúveis no citoplasma, pela indução da formação dos NFTs pelos oligômeros de A β (SELKOE, D. J., 2004b), pelo acúmulo extracelular de A β na forma de placas, pelo estresse oxidativo causado pelo A β nas células, pela saturação das vias de excreção do A β (DEANE, R., 2008), por uma conjunção destes fatores ou alguma outra razão ainda desconhecida, mas que o A β está diretamente envolvido com a doença, não restam dúvidas (JIN, M., 2011).

Em consequência do exposto anteriormente e da importância do A β apontada pela comunidade científica, nota-se um grande esforço no desenvolvimento de compostos químicos capazes de inibir as proteases responsáveis por sua produção, incluindo neste

contexto a enzima β -secretase. (CITRON, M., 2004; COLE, S. L. 2007; FUJIMOTO, T., 2000; GHOSH, A. K. 2008; HOOK, V., 2008)

1.2 β -Secretase como alvo para o planejamento de potenciais fármacos para o tratamento do Mal de Alzheimer

A proteína β -secretase (Beta site APP Cleaving Enzyme, ou BACE-1) é uma aspartil-protease, assim como a Pepsina do suco gástrico, a HIV Protease e a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). A diferença é que a BACE-1 é ancorada à membrana lisossômica. A BACE-1 media a primeira clivagem da APP no resíduo 671, gerando o fragmento C-terminal C99 ligado à membrana, o qual é, posteriormente, clivado pela γ -secretase, resultando na liberação do peptídeo A β , na chamada via amiloidogênica, ilustrado na Figura 1. Em virtude das múltiplas funções celulares que a proteína γ -secretase assume, pode-se considerar que a BACE-1 é um alvo molecular mais adequado para intervenção farmacológica (RAJENDRAN, L., 2008; HU, X., 2008), embora vários inibidores de γ -secretase já tenham sido desenvolvidos, com vários chegando à fase dois de testes clínicos, até o momento todos foram descontinuados devido aos efeitos adversos e/ou baixa atividade (IMBIMBO, B. P., 2008, GHOSH, A. K., 2012).

Figura 1: Clivagem da proteína precursora amiloide e formação da placa amiloide na chamada via amiloidogênica.

A pepsina, a HIV Protease e a ECA indicam como é o mecanismo de ação da BACE-1, onde dois aspartatos (no caso da BACE-1, 32 e 228) catalisam a hidrólise de uma ligação

peptídica (GOODSELL, D., 2009) e nos indica um ponto muito importante da BACE-1 para ser bloqueado, seu sítio ativo. A pepsina também mostra que a abertura e fechamento da “alça *flap*” (figura 2) é muito importante para permitir a entrada do substrato e a catálise, respectivamente (GORFE, A. A., 2005). A HIV protease e a ECA nos mostram que as aspartil proteases podem ser inibidas com sucesso *in vivo*, e que a ECA, enzima fundamental na regulação da pressão arterial, tem alta especificidade para seu substrato e provavelmente não será afetada pelos inibidores da BACE-1 (GHOSH, A. K., 2008), implicando em menos efeitos adversos, mesmo que isso possa ser interessante para o tratamento de pacientes com AD e Hipertensão, outra doença com alta incidência em idosos.

Figura 2: Sítio catalítico da BACE-1, mostrando a alça *flap* em uma estrutura complexada com ligante (2WF1, em azul) e uma estrutura sem ligante (2WGZ, em bordô).

O grande interesse no estudo e na busca de inibidores efetivos da BACE-1 para intervenção terapêutica no AD se torna relevante pelo fato de não existir, até o presente momento, um tratamento farmacoterápico eficiente no combate à causa da doença. A possibilidade de planejar inibidores que tenham como alvo molecular a BACE-1 no AD pode ser nutrida pelo sucesso no desenvolvimento de fármacos contra outras aspartil-proteases, como a HIV protease (HONG, L., 2002) e a ECA (GHOSH, A. K., 2008).

As enzimas e fatores envolvidos na via amiloidogênica são apontados como principal causa do AD, atraindo grande interesse de pesquisadores e indústrias, em especial a BACE-1 pois:

- Ela protagoniza a etapa limitante da via amiloidogênica (RAJENDRAN, L., 2008; EDWARDS, P. D., 2007)
- A γ -secretase também catalisa várias outras proteínas com papel fisiológico importante, como a Notch, Calderina-E, Nectina-1, Delta e Apolipoproteínas, o que pode gerar muitos efeitos colaterais (ALZHEIMERS DISEASE, 2010; ELVANG, A. B., 2009; WALSH, D. M., 2003; IMBIMBO, B. P., 2008)
- Animais que tiveram removidos os genes que codificam a BACE-1 não apresentaram acúmulo de peptídeos A β (HU, X., 2008) e os que foram tratados com inibidores de BACE-1 apresentaram redução drástica dos níveis de A β em seus cérebros (GHOSH, A. K., 2008, GHOSH, A. K., 2012; HOOK, V., 2008)
- A ausência da BACE-1 em camundongos Knock-out não mostrou inicialmente nenhum efeito deletério ou sistêmico (CITRON, M., 2004; BARROW, J. C., 2008; CAI, H., 2001; ROBERDS, S. L., 2001; TURNER, R. T., 2001; STOCKLEY, J. H., 2007), fato contestado posteriormente por outros estudos, que mostram leve déficit cognitivo nestes animais devido baixa mielinização dos neurônios, indicando que a BACE-1 exerce algum papel no desenvolvimento e maturação do SNC (FAGHIHI, M. A., 2008), mas com pouca atividade no organismo adulto (CAI, H., 2001; GHOSH, A. K., 2008).

Sabe-se que a BACE-1 está envolvida no processamento de outras proteínas além do APP e sua inibição poderá causar efeitos adversos nos pacientes, mas, até o momento, não se sabe o alcance desta possibilidade se tornar realidade, mantendo assim a dúvida existente sobre a viabilidade desta enzima como alvo terapêutico no AD. Um dos fatores que pesam contra a atividade *in vivo* dos inibidores desenvolvidos até o momento é sua estrutura volumosa, o que dificulta sua permeação pela Barreira Hematoencefálica e consequentemente reduz sua efetividade (KLAVER, D. W., 2010; GHOSH, A. K., 2012). Esta característica estrutural foi considerada para a seleção de compostos neste trabalho.

Além do APP, sabe-se que a BACE-1 também hidrolisa outras proteínas como a neuregulina, Klotho (BLOCH, L., 2009), sialil transferase e canais de sódio regulados por voltagem.

Sabe-se também que a BACE-1 é conservada ao longo de vários organismos, um indicativo de que a enzima possui papel fisiológico além do relacionado ao AD, sendo mais um motivo para o desenvolvimento deste trabalho, e convergindo para a ideia de que os estudos com inibidores da BACE-1 devem ser conduzidos com cuidado, para evitar efeitos adversos que podem inviabilizar o uso destes inibidores como fármacos, porém, a literatura indica que a inibição parcial ou até mesmo total da BACE-1 é tolerada pelo organismo. (SAMBAMURTI, K., 2011; GHOSH, A. K., 2012)

Um efeito colateral da inibição da BACE-1 pode ser a remielinização de neurônios ocorrer de forma mais lenta após um trauma, devido ao envolvimento da BACE-1 no metabolismo da Neuregulina-1, uma citocina moduladora da mielinização dos neurônios que é encontrada em altos níveis na sua forma não processada nos animais que não possuem o gene que codifica a BACE-1, mas, outras enzimas também desempenham este papel, por isso sua atividade, essencial para a plasticidade dos dendritos, não é cessada com a inibição da BACE-1. (HU, X., 2008)

1.3 A Proteína Precursora Amiloide

O APP é um peptídeo encontrado na grande maioria das células de mamíferos, onde se especula que ele esteja envolvido em diversos processos celulares, como a inibição de Serina Treonina cinases, promoção do crescimento de células autócrinas, adesão entre célula e matriz extracelular e modulação do transporte axonal, (ROBERDS, S. L., 2001; SELKOE, J. D., 1994, SELKOE, J. D., 2004 a), o que inviabiliza o uso de anticorpos contra o APP para o tratamento de AD, além de indicar que o bloqueio de uma das suas rotas metabólicas, não levará ao seu acúmulo, que se sabe ser citotóxico (STOKIN, G. B., 2008).

O processamento neuronal do APP por secretases pode ser feito através de duas vias: a amiloidogênica (que produz os peptídeos A β 1-40 e 1-42, respectivamente com 40 e 42 resíduos de aminoácidos), iniciado pela BACE-1, e a não amiloidogênica (que produz outros peptídeos que não os amiloides), iniciado pela alfa-secretase, sendo ambas as vias terminando em uma segunda etapa de catálise, realizada pela gama-secretase.

A figura 3 ilustra estas vias e mostra que, a inibição de uma delas, não acarretará o acúmulo de APP nos neurônios, ponto que poderia ser um sério revés no tratamento do AD, assim como aparenta ser a inibição da gama-secretase, que embora já tenha chegado às fases de estudos clínicos mais de uma vez, resultou em sérios efeitos adversos devido ao envolvimento da gama-secretase em diversas outras vias metabólicas, como por exemplo, o

processamento da proteína neuromoduladora Notch. (THATHIAH, A., 2011; ELVANG, A. B., 2009)

Figura 3: Representação da clivagem da proteína precursora amiloide nas vias não amiloidogênica (A) pela alfa-secretase e (B) amiloidogênica pela beta-secretase e subsequentemente gama-secretase [83].

1.4 O peptídeo beta-amiloide

O A β é um peptídeo cuja função biológica ainda não foi completamente elucidada. Sabe-se que em baixas concentrações aparenta ser um neuromodulador (WALSH, D. M., 2003), mas em excesso, tende a acumular-se lentamente em formas oligoméricas no citoplasma, isso com grande antecedência ao surgimento das placas amiloide e da manifestação dos sintomas do AD. Este acúmulo é tóxico para os neurônios e pode levar a estresse oxidativo (GWON, A. R., 2010), inflamação das células gliais (WALSH, D. M., 2003; SELKOE, J. D., 2004 a; LANZ, T. A., 2005), deformações nas sinapses, formação de NFTs e consequentemente a disfunção cognitiva, (WALSH, D. M., 2003; SELKOE, J. D., 2004 a; SELKOE, J. D., 2004 b; ERIKSEN, J. L., 2007; JIN, N., 2011) sendo o uso de anti-

inflamatórios uma outra abordagem terapêutica indicada por estes artigos e em estudo por indústrias farmacêuticas. (CLINICALTRIALS.GOV, 2010)

O uso de anticorpos contra o A β propicia a remoção das formas oligoméricas e precipitadas, revertendo o quadro da doença em modelos animais, mas testes clínicos apontaram aumento do índice de meningo-encefalite nos pacientes, com alguns óbitos, e por isso este tipo de procedimento foi suspenso para ser aprimorado (WALSH, D. M., 2003; SELKOE, J. D., 2004 a). Este fato corrobora a recente especulação de que o A β é integrante do Sistema Imune Inato (SII), o responsável por evitar infecções no SNC causadas por diversos organismos patogênicos. Mesmo este estudo dizendo que a produção do A β pode ser iniciada por infecções e depois autoperpetuada pelo SII, ele levanta um sinal de alerta para possíveis efeitos indesejados da inibição da BACE-1, como o aumento da incidência de infecções cerebrais nos pacientes. (SOSCIA, S. J., 2010)

Provavelmente como mecanismo de defesa das células para sequestrar intermediários tóxicos da produção irregular de A β , estes oligômeros são excretados para o meio extracelular onde seu acúmulo acarreta a formação de núcleos amiloide, seguido rapidamente pela formação das placas amiloide ou placas senis em um processo termodinamicamente favorável (HAMMER, N. D., 2008), sendo esta uma das características microscópicas da doença observadas por Alois Alzheimer e apontadas como sua principal causa. (JIN, N., 2011)

Sabe-se que os oligômeros de A β induzem progressivamente e a longo prazo a fosforilação da proteína tau, uma proteína associada aos microtúbulos do citoesqueleto envolvida na plasticidade celular, apoptose celular e transporte axonal, induzindo consequentemente, a formação dos NFTs, outra característica patológica do AD mostrada na figura 4. Os NFTs são constituídos por tau hiperfosforilada, correlação compreensível devido ao papel que a proteína tau exerce na célula como um todo, indicando que a formação dos agregados pode ser um dos elos entre os peptídeos beta amiloide e o declínio da ação dos neurônios afetados pela doença. (JIN, M., 2011; JAN, A., 2011). No entanto, estes agregados aparecem em outras doenças que não possuem deposição amiloide há deposição amiloide sem a presença de NFTs em cérebros “normais”. (WALSH, D. M., 2003; SELKOE, J. D., 2004 a; SELKOE, J. D., 2004 b)

De Ferrari (DE FERRARI, G. D., 2001) demonstrou que a AChE induz a formação de fibras amiloides e durante a formação das fibrilas (na fase de nucleação), a AChE é incorporada por elas. O A β tem uma tendência a interagir com ambientes hidrofóbicos como o sítio aniônico periférico da enzima, sendo especulado que estas interações estabilizam a interação do A β com a AChE. Eles especularam (e observaram) que a ligação do A β na AChE

cause a modulação da enzima, já que há uma certa oclusão do sítio aniônico periférico da enzima.

Figura 4: Representação da citopatologia do mal de Alzheimer, mostrando os agregados neurofibrilares (tangle), os oligômeros de peptídeos amiloides (Aβ) e as placas senis (amyloid plaque) (SELKOE, J. D., 2004 a).

1.5- Terapêutica Atual

Dentre os fármacos utilizados atualmente para o tratamento do Mal de Alzheimer estão Tacrina (Cognex®) e donepezil (Aricept®). Tacrina foi o primeiro inibidor de AChE licenciado pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento do mal de Alzheimer.

Trata-se de um inibidor reversível, não competitivo e não seletivo para AChE, possuindo graus de inibição semelhantes para as enzimas AChE e butirilcolinesterase (BChE). O seu uso desencadeia efeitos colaterais hepatotóxicos e, dada sua baixa meia-vida plasmática (3-5 h), há a necessidade do uso quatro doses diárias (120-160 mg/dia) de tacrina. (REICHMAN, W. E., 2003). O Donepezil, por sua vez, é o fármaco mais utilizado para o Mal de Alzheimer, representando aproximadamente 38% das prescrições. É um inibidor reversível, não competitivo e, ao contrário da tacrina, seletivo para AChE. Os efeitos colaterais proporcionados pelo seu uso são de natureza gastrointestinal, estando diretamente relacionados à dosagem administrada. Considerando-se a alta meia-vida plasmática de donepezil (70 h), uma dose diária deste fármaco (5-10 mg/dia) é suficiente para o tratamento. (REICHMAN, W. E., 2003)

Outra abordagem utilizada atualmente na terapêutica contra o AD é o antagonismo de receptores NMDA (glutamato), um outro tipo de receptor presente nas regiões associadas às funções cognitivas e de memória, e que também é degenerado pela doença. No AD, antagonicamente à transmissão colinérgica, a transmissão glutamatérgica é exacerbada e o excesso de glutamato nas fendas sinápticas é neurotóxico devido a um alto influxo de íons Cálcio no neurônio. A Memantina mantém o receptor de NMDA bloqueado em seu estado de repouso, evitando assim o influxo excessivo de Cálcio, que é citotóxico. (FORLENZA, O. V., 2005)

Embora os fármacos supracitados sejam utilizados para o tratamento do Mal de Alzheimer, seu mecanismo de ação os torna paliativos, já que eles não atuam na causa da doença, que é o processamento de APP pela via amiloidogênica. Sendo assim, este é um campo apontado por muitos pesquisadores e indústrias farmacêuticas como extremamente promissor, e a BACE-1 é a etapa limitante da produção do peptídeo β -Amiloide, peptídeo apontado como principal causador da doença, e cuja inibição da produção e/ou remoção não aparenta causar graves efeitos adversos em testes com animais, assim como reverte tanto o quadro patológico quanto o sintomático da doença.

Asai (2010) testou uma combinação simultânea de quatro fármacos em baixas doses - um coquetel, tal como é feito no tratamento de AIDS e Câncer, para reduzir os efeitos adversos causados por uma forte inibição de beta e gama secretases (um dos maiores empecilhos encontrados em testes *in vivo* com estes inibidores, dado que as duas proteínas possuem vários outros substratos além dos envolvidos no AD). Foi utilizado um inibidor de beta-secretase 1, um de gama-secretase, um anti-inflamatório não esteroide (que tem efeito modulador de gama-secretase, reduzindo a formação de $A\beta$ -42) e uma estatina (que reduz a

produção de A β e ativa a via não amiloidogênica) em culturas de células, sendo observado uma grande redução dos níveis de A β sem alteração no processamento da Notch (que é substrato da gama-secretase) e com baixa toxicidade celular.

Nota-se que, até o momento, não há nenhuma terapia que bloqueie o desenvolvimento e o progresso da doença, os fármacos utilizados tem como principal objetivo, reduzir o déficit cognitivo dos pacientes com Mal de Alzheimer.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi planejar *in silico* e avaliar *in vitro* novos potenciais inibidores de BACE-1, para se obter e aperfeiçoar novos protótipos de fármacos para o tratamento do Mal de Alzheimer.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Resumo da metodologia

Figura 5: Resumo da metodologia utilizada no projeto.

3.1 Preparação das bases de dados

Por apresentarem problemas, tais como travamento de cálculos e conformações bizarras, em alguns cálculos, os compostos das bases ChemBridge (em suas subcoleções CNS e Diverset) (ALLEN, F. H., 2002) e MayBridge receberam cargas e suas estruturas foram otimizadas por mecânica molecular (campo de força COSMIC), com o auxílio do programa Tsar (ACCELRYS SOFTWARE, 2005), etapa que não foi necessária para a base ZINC. (IRWIN, J. J., 2005)

3.2 Definição do sítio para experimentos de triagem virtual

Fez-se download de todas as 111 estruturas da BACE-1 depositadas no PDB (BERMAN, H. M., 2000) até o momento do início do trabalho, sendo removidas as incorretamente rotuladas como BACE-1 (sendo BACE-2 e APP), bem como as estruturas de BACE-1 sem ligantes e as estruturas com ligantes peptídicos, restando assim os 86 complexos listados na tabela 1.

Tabela 1: listagem dos códigos PDB dos 86 complexos que foram utilizados para a escolha dos parâmetros a serem empregados nos cálculos de triagem virtual.

1TQF	2FDP	2OHK	2OHU	2QMD	2VA6	2VKM	2ZDZ	3BRA	3DV1
1W51	2G94	2OHL	2P4J	2QMF	2VA7	2VNM	2ZE1	3BUF	3DV5
1XS7	2HIZ	2OHM	2P8H	2QMG	2VIE	2VNN	2ZJH	3BUG	3EXO
1YM2	2IQG	2OHN	2P83	2QP8	2VIJ	2WEZ	2ZJI	3BUH	3FKT
2B8L	2IRZ	2OHP	2PH6	2QU2	2VIY	2WF0	2ZJJ	3CIB	3H0B
2B8V	2IS0	2OHQ	2PH8	2QU3	2VIZ	2WF1	2ZJK	3CIC	
2EWY	2NTR	2OHR	2Q11	2QZK	2VJ6	2WF2	2ZJL	3CID	
2F3E	2OAH	2OHS	2Q15	2QZL	2VJ7	2WF3	2ZJM	3CKP	
2F3F	2OF0	2OHT	2QK5	2VA5	2VJ9	2WF4	2ZJN	3CKR	

Estes complexos foram alinhados estruturalmente um a um, com respeito aos átomos não-hidrogeniônicos, tendo como base/modelo o de código PDB 1TQF através do programa SPDBViewer (GUEX, N., 1997) e, depois de sobrepostos, utilizaram-se os programas DSViewerPro 6.0 (ACCELRYS SOFTWARE INC., 2006.) e Pymol 1.5 (THE PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM) para melhor visualização.

3.3. Seleção do complexo de referência

Para determinar os melhores parâmetros a serem utilizados pelo GOLD, os 86 ligantes foram visualizados e, gradativamente, removeram-se os com conformações não usuais (ramificações prolongadas e posicionadas em locais diferentes das demais), os que possuíam grupos com características divergentes em relação aos demais, os muito pequenos em relação aos demais, os com conformações rígidas e/ou com poucas ligações rotacionáveis, os que exploravam pouco o sítio catalítico, e os com estruturas cíclicas, sendo selecionada a estrutura com o menor RMSD (desvio médio quadrático (MORGON, N. H., 2007)) do grupo restante.

3.4 Triagem Virtual

A triagem virtual é uma metodologia computacional que avalia em larga escala o quão favoravelmente determinadas poses de moléculas encaixam-se em um determinado alvo molecular (*docking*), considerando as características químicas, eletrônicas e estruturais que favorecem interações entre as duas estruturas. A triagem virtual pode ser dividida em dois tipos: a baseada em estrutura do alvo molecular, onde se consideram as características moleculares do alvo, e a triagem baseada em ligantes, onde se consideram as características moleculares de ligantes conhecidos do alvo molecular. (RODRIGUES, R. P., 2012)

Para todos os cálculos de triagem virtual realizados neste projeto, quatro bases de dados (subcoleções CNS* e Diverset da ChemBridge, subcoleção CNS* da ZINC e Maybridge completa) e três programas, GOLD, GLIDE (abordagem baseada em estrutura) e Discovery Studio (abordagem baseada em ligante) foram utilizados.

* moléculas com características que permitem a atividade no sistema nervoso central

3.4.1 Triagem Virtual baseada em estrutura

3.4.1.1 O programa GOLD

O programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) realiza a simulação do *docking* flexível das moléculas de uma base de dados ao sítio alvo indicado. Esta simulação é realizada com o uso de um algoritmo genético, que organiza as possíveis soluções (em termos de interações ligante-receptor) para o problema do *docking* em “cromossomos de dados” e aplica dois operadores: *crossover* (cruzamento de partes dos dados das soluções) e mutação

(alteração pontuais nos dados das soluções), para encontrar as soluções com maior aptidão de ligação de uma determinada molécula para aquele sítio. (JONES, G, 1995; NISSINK, J. W. M., 2002; VERDONK, M. L., 2003)

O GOLD, em sua versão 4.1, foi utilizado em suas configurações padrão (com e sem *scaffold*), com a função de *score* Chemscore, com uma esfera de busca com 13,5Å ao redor do Oxigênio Delta 2 do Aspartato 289, e as opções de inverter ligações amídicas e inverter nitrogênios selecionadas. Na primeira etapa dos cálculos, cada base foi reduzida a 2000 compostos, usando a configuração de cálculos menos complexa “virtual screening”, que opera a 30% da capacidade máxima do algoritmo de busca, e com a geração de um conformero por molécula. A segunda etapa foi realizada com máxima eficiência do algoritmo e gerando 10 soluções por molécula, reduzindo cada base a 50 compostos.

3.4.1.1.1 Triagem virtual de bases de dados com a *constraint Scaffold*

O inibidor do complexo de referência também foi utilizado para a construção de um *scaffold*, uma estrutura simplificada de sua estrutura com as características mais comuns dos 9 melhores inibidores selecionados na etapa 3.3. O *scaffold* foi utilizado pelo GOLD, em sua versão 4.1, para realizar triagens direcionadas a compostos que sejam estruturalmente similares a ele, seguindo o mesmo protocolo. (figura 6)

Figura 6: “scaffold” produzido a partir do ligante presente no complexo selecionado 2WF1 do PDB e utilizado para tendenciar alguns cálculos de triagem virtual.

3.4.1.2 O programa GLIDE

O programa GLIDE (Grid-based Ligand Docking with Energetics), em sua versão 5.5 (GLIDE, 2009), utiliza uma série hierárquica de filtros para procurar, tanto as melhores

localizações quanto as melhores conformações para uma molécula, dentro de uma região determinada. A forma e as propriedades do receptor são representadas, em uma grade, por diversos conjuntos de campos diferentes, e estes, progressivamente, proveem dados para a classificação das conformações dos ligantes, geradas pelo programa também em forma de grade.

As buscas pelo GLIDE foram centradas no mesmo ponto que as buscas feitas com o GOLD, pois, assim como no GOLD, esta configuração durante a calibração foi a que apresentou menor RMSD entre as conformações geradas, o que é importante para uma posterior comparação entre os resultados obtidos pelos dois programas.

Devido a diferenças de configuração entre o GOLD e o GLIDE, ao invés de selecionar um átomo e definir o raio de uma esfera ao redor do mesmo, para determinar a região considerada na busca, utilizaram-se as coordenadas cartesianas do mesmo átomo (OD2 do Aspartato 289 do complexo 2WF1) e delimitou-se uma caixa interna (local onde o GLIDE considerou as interações com o sítio ligante) com 14Å em suas três arestas (pois os 13,5 utilizados no GOLD não foram aceitos, apenas valores inteiros e pares). Delimitou-se um espaço de 18Å nas arestas da caixa externa (local onde o GLIDE pode colocar parte das conformações, caso elas não caibam na caixa interna, mas não contabiliza as interações com o sítio ligante). Utilizou-se o modo SP para as buscas iniciais (busca nas bases selecionando os 2000 melhores compostos) e o XP para a segunda etapa (seleção dos 50 melhores compostos dentre os 2000), com as mesmas bases de dados utilizadas com o GOLD.

3.4.2 Triagem Virtual baseada em ligante

3.4.2.1 Uso do índice de Tanimoto, PASS e SEA

Foi planejada inicialmente a realização de uma filtragem por índices de similaridade estrutural (índice de Tanimoto (BUTINA, D., 1999)) em relação ao *scaffold*, para reduzir pela metade os 2000 compostos obtidos pela primeira etapa dos triagens virtuais, filtragem realizada pelo site BindingDB (LIU, T., 2007).

Baseando-se nas hipóteses e achados de que um ligante é capaz de ligar-se a proteínas homólogas/similares e que o ligante pode atuar em vários alvos diferentes, similares ou não, os programas PASS (LAGUNIN, A., 2000) e SEA (KEISER, M., 2007) oferecem uma ferramenta de indicação de propriedades de fármaco e toxicológicas frente a centenas de alvos terapêuticos, incluindo a BACE-1.

3.4.2.2 Omega, EON e ROCS

O Omega é um programa desenvolvido para gerar confôrmeros de moléculas, etapa necessária para métodos de *docking* rígido. O ROCS compara moléculas de acordo com seu formato, utilizando-se do conceito de que, moléculas com formato semelhante possuem atividade semelhante, e o EON, compara moléculas de acordo com sua similaridade eletrostática, baseado em conceito semelhante ao do ROCS. (LÓPEZ-RAMOS, M., 2010)

Foram gerados confôrmeros das quatro bases de dados e dos ligantes dos complexos 2VJ7, 2VNM, 2WF1, 2WF2, 2WF3, 2WF0, 2VNN e 2VIJ com o Omega, em sua versão 2.3.2. Os parâmetros “marcar energia” dos 100 melhores dentre os 5000 confôrmeros gerados, com janela máxima de energia entre eles definida com o valor 9 ante a 10 do padrão e, o RMSD que faria dois confôrmeros serem considerados iguais reduzido do padrão 0.8 para 0.6 Å foram alterados, todos os demais foram utilizados com os valores padrão. Para validação do método, estes conjuntos de confôrmeros são necessários para a utilização do ROCS, em sua versão 3.0, (SUTHERLAND, J. J., 2007) e EON, em sua versão 2.0.1 (NAYLOR, E., 2009), que depende dos resultados do ROCS.

O ROCS foi utilizado com todos os parâmetros em configuração padrão.

3.4.2.3 Triagem Virtual baseado em farmacóforo

Após a triagem virtual baseada na estrutura da BACE-1, foram realizados cálculos de triagem virtual baseada em farmacóforo, onde outro padrão, mais complexo que o listado adiante, no item 3.5.1, foi gerado, baseado nos 9 melhores inibidores de BACE-1 selecionados no começo deste trabalho (item 3.3, códigos PDB: 2VJ7, 2VNM, 2WF1, 2WF2, 2WF3, 2WF0, 2VNN, 2WEZ, 2VIJ), sendo este novo modelo um dado complementar, mais específico que o farmacóforo gerado anteriormente.

O segundo farmacóforo foi gerado pelo programa Discovery Studio 2.5 (DISCOVERY STUDIO, 2008), sem que fosse permitido ao mesmo realizar qualquer alteração conformacional nas estruturas, com número mínimo de características (ou grupos farmacofóricos) a ser gerado definido como 1, e número máximo 10, dando como opções de características ao programa os grupos Hidrofóbico aromático, Hidrofóbico alifático, Anel aromático, Doador de ligação de Hidrogênio, Aceptor de Ligação de Hidrogênio, grupos escolhidos por serem encontrados nos inibidores conhecidos da BACE-1.

Este farmacóforo foi dividido em 3 subfarmacóforos simplificados e estes foram utilizados pelo programa Discovery Studio 2.5 para realizar ensaios de triagem virtual baseado em farmacóforo, onde foi permitido ao programa flexibilizar e gerar confôrmeros das estruturas dos compostos, para que estas se encaixassem melhor aos subfarmacóforos.

3.4.3 Triagem Virtual baseado em estrutura e baseado em ligante

Além dos métodos de Triagem Virtual descritos anteriormente, uma terceira abordagem foi realizada, mesclando a Triagem Virtual baseada em estrutura, realizado com o programa GLIDE, e a Triagem por Farmacóforo, realizada com o Discovery Studio.

Neste experimento, a subcoleção CNS da base de dados ZINC foi filtrada em sua totalidade (aproximadamente 350 mil compostos) para 5 mil compostos, através do algoritmo HTVS do GLIDE. Estes 5 mil compostos foram posteriormente avaliados pelo Discovery Studio 2.5 quanto a sua sobreposição em relação a cada um dos 3 subfarmacóforos, mas sem permitir ao programa realizar flexibilização das estruturas já que as mesmas foram orientadas em relação ao sítio da BACE-1 pelo GLIDE.

3.5 Métodos de Seleção de compostos

3.5.1 Filtragem por Farmacóforo

A definição de farmacóforo pela IUPAC consiste no conjunto de características estéricas e eletrônicas que são necessárias para assegurar que as melhores interações supramoleculares ocorram com um alvo biológico específico a fim de ativar (ou bloquear) sua resposta biológica. (LANGER, T., 2006)

Para gerar o primeiro farmacóforo, 13 inibidores da BACE-1 foram selecionados dentre os “melhores” dos 86 complexos utilizados no começo do projeto, além do ligante do complexo 2WF1, somando-se 14 compostos (retirados dos complexos 2WF2, 2WF3, 2VJ7, 2VIY, 2VJ6, 2WF0, 2IQG, 2QMD, 3CIC, 2QMF, 3CID, 2OAH, 2B8L e 2WF1, mostrados nas figuras 7 a 10) como *input* do programa Discovery Studio 2.5 (DISCOVERY STUDIO user guide, 2010) para a geração do farmacóforo. O programa foi configurado para aceitar as conformações tridimensionais dos compostos e suas orientações no sítio ativo da enzima sem

modificá-las. Os grupos selecionados para o cálculo foram doador e aceitor de ligações de hidrogênio, hidrofóbico e anel aromático.

O farmacóforo foi utilizado para a seleção visual dos melhores compostos resultantes dos cálculos de triagem virtual, e um a um, os 600 compostos das etapas anteriores foram analisados quanto a sua sobreposição ao farmacóforo.

Figura 7: Estruturas dos inibidores utilizados como *input* para geração do farmacóforo. 2WF2 (1), 2WF3 (2), 2VJ7 (3), 2VIY (4).

Figura 8: Estruturas dos inibidores utilizados como *input* para geração do farmacóforo. 2VJ6 (1), 2WF0 (2), 2IQG (3), 2QMD (4).

Figura 9: Estruturas dos inibidores utilizados como *input* para geração do farmacóforo. 3CIC (1), 2QMF (2), 3CID (3).

Figura 10: Estruturas dos inibidores utilizados como *input* para geração do farmacóforo. 2OAH (1), 2B8L (2) e 2WF1 (3).

3.5.2 Análise das interações realizadas com o sítio ativo da BACE-1

Os compostos foram analisados visualmente quanto às interações intermoleculares que realizam com o sítio catalítico da BACE-1. Para tal, foi considerada obrigatória a realização de interações com pelo menos um dos Ácidos Aspárticos do sítio catalítico (93 e 289) e com resíduos da alça *flap* (Tirosina 132, Treonina 133, Glutamina 134 e Glicina 135). Foram consideradas como desejáveis a realização do maior número de interações possíveis com resíduos do sítio catalítico, além dos já citados, especialmente as interações mais fortes como pontes de hidrogênio.

Foram consideradas as seguintes distâncias para determinar se uma subestrutura do composto é capaz de realizar interações intermoleculares com o sítio catalítico da BACE-1: de 2.6 a 3.2 Å para ligações de hidrogênio (avaliadas entre os átomos de nitrogênio e oxigênio do sítio e do composto), de 3.3 a 4 Å para interações de van der Waals e de 3.4 a 4 Å para interações entre anéis aromáticos.

Esta etapa foi realizada com os programas Pymol 1.5 (THE PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM) e DSViewer Pro 6.0 (ACCELRY'S SOFTWARE INC., 2006.), e, assim como o próximo quesito, foi considerada com o dobro de importância no processo de definição de quais compostos seriam adquiridos.

3.5.3 Campos de Interação Molecular MIF

Paralelamente ao farmacóforo, a estrutura da BACE-1 foi analisada, visualmente, frente aos campos de interação molecular (MIFs) (GOODFORD, P. J., 1985) com o programa GRID 2009 (KASTENHOLZ, M. A., 2000). Esta abordagem consiste no uso de “sondas” para a avaliação dos potenciais de Lennard Jones e eletrostático, de diferentes grupos de prova (hidrofóbicos, aceptores de ligação de hidrogênio, íons...), frente à superfície acessível ao solvente do receptor, apresentando os “contornos” de acordo com o nível de sua provável energia de interação com o sítio, portanto, quanto maior o nível energético do contorno, maior é a probabilidade de existir uma interação entre receptor e ligante naquela região.

Os grupos de prova utilizados foram C1= (carbono aromático), DRY (hidrofóbico), N2+ (cátion de NH₂), N3+ (cátion de NH₃), que teve resultado igual ao de N2+, O (oxigênio de carbonila), O:: (carbóxi) e OH₂ (água).

A caixa onde as sondas foram aplicadas foi posicionada de forma a englobar todo o sítio catalítico da BACE-1, com as seguintes dimensões: 28,5Å em X, 45,09Å em Y, 26,56Å

em Z. O número de planos do GRID (NPLA) foi alterado de 1 para 3, transformando a distância entre os planos de 1 para 0.33Å, o fator KWIK utilizado foi 6, facilitando ao programa encontrar os pontos dentro do alvo e reduzindo o tempo de cálculo por restringir a busca à até 5Å além das dimensões da caixa, e todos os outros parâmetros não foram alterados.

3.5.4 Cálculo de propriedades “drug like”, ADME e físico-químicas com o QikProp

O **QikProp** (QIKPROP user guide, 2009), em sua versão 3.4, é um programa que calcula rapidamente as propriedades ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), “drug like” e físico-químicas de moléculas, além de comparar os resultados obtidos com as propriedades de 95% dos fármacos conhecidos, mostrando todos os resultados no arquivo de saída. Os valores utilizados pelo programa como referência e mostrados no arquivo de saída são todos oriundos de artigos científicos, segundo o manual do mesmo.

Foram considerados os seguintes parâmetros:

- Coeficiente de partição (log P) octanol/água, que indica a lipofilicidade (valores positivos) e hidrofiliicidade (valores negativos) de moléculas neutras. O log P deve estar, idealmente, entre -2 e 6.5 para fármacos.
- log BB, o coeficiente de partição cérebro/sangue, que indica a razão entre a concentração do composto no tecido cerebral e a concentração do composto no plasma sanguíneo. O log BB deve estar, idealmente, entre -3.0 e 1.2 para fármacos, quanto mais positivo ou próximo de 0, melhor para fármacos com atividade no SNC.
- Atividade prevista no Sistema Nervoso Central, indicada de – (muito ruim) a ++ (muito boa)
- Predição de absorção por via oral, indicada em percentual.

3.5.6 PharmMapper

O PharmMapper (LIU, X., 2010) é um web-servidor de acesso gratuito projetado para identificar potenciais alvos moleculares para pequenas moléculas como fármacos, produtos naturais e candidatos a fármacos.

A viabilidade do site como parâmetro de seleção foi analisada submetendo-se 14 ligantes conhecidos da BACE-1, extraídos dos complexos (2WF0, 2WF1, 2WF2, 2WF3, 2VJ7, 2VJ6, 2VIY, 2IQG, 2QMD, 2QMF, 3CIC, 3CID, 2OAH e 2B8L) utilizados para o início do trabalho e observando-se se a BACE-1 apareceria nos resultados. Diferentemente do que ocorreu com o PASS e o SEA, o PharmMapper foi capaz de prever estas moléculas como ligantes da BACE-1, mesmo que indicando complexos diferentes.

Os 28 compostos foram submetidos e avaliados quanto à possibilidade de ligação aos alvos humanos, usando todas as configurações padrão do site.

A classificação das ocorrências de BACE-1, a pontuação e o número de grupos farmacofóricos em comum foram considerados como critérios de seleção.

3.5.7 Predição de Toxicidade

A predição de toxicidade foi desempenhada com o programa Derek, em sua versão 10.0.2, o qual utiliza um banco de dados de grupos químicos sabidamente tóxicos (toxicóforos) para comparar a estrutura do composto e predizer se este pode ser mutagênico, carcinogênico, hepatotóxico, fototóxico e outras formas de toxicidade relacionadas estes grupamentos ou fragmentos moleculares.

3.6 Ensaaios enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados com o kit CS0010 da Sigma-Aldrich (CS0010), seguindo seu protocolo adaptado às condições do Laboratório de Enzimologia Industrial da FCFRP, gerido pelo prof. Dr. Hamilton Cabral. Esta adaptação foi realizada pois o protocolo descreve ensaio para realização em um fluorímetro que trabalha com placas de 96 poços de 100µL, mas o aparelho utilizado para leitura, o fluorímetro Thermo Lumina, trabalha com cubetas de 2mL, por isso, as reações foram feitas em tubos Falcon de 2 mL, e depois diluídas em água para 2mL no ato de leitura, ao invés de todo o processo ser feito em placa de 96 poços.

Os ensaios foram realizados em tubos falcon de 2 mL, com incubação a 37° C por duas horas. Em cada tubo havia 2 µL de solução com ~0,3 unidades de BACE-1 por µL, 20 µL de solução do substrato (portador do grupo fluorófilo) a 50 µM, 78-X µL de solução tampão e XµL de solução com diferentes concentrações dos compostos, totalizando 100 µL de solução reagente. O controle negativo não possui solução de inibidor e nem de enzima, indicando o

valor mínimo de fluorescência que poderá ser observado, por isso contém 80 μL de solução tampão e 20 μL de solução com substrato, enquanto o controle positivo não possui solução com inibidor, contendo assim 78 μL de solução tampão, 20 μL de solução com substrato e 2 μL de solução de BACE-1, indicando a fluorescência máxima que deverá ser observada.

Após a incubação, os tubos foram inoculados com 40 μL de solução de parada, integrante do kit, para então serem diluídos até 2 mL, com água deionizada, e assim, serem realizadas as medidas de fluorescência, nos comprimentos de onda de 320 nm para excitação, e 405 nm para emissão. Os valores aferidos são apresentados em Unidades de Fluorescência (UF). Devido a esta limitação da leitura ser realizada após a diluição em água, não foi realizada a leitura da fluorescência inicial de cada um dos tubos, que era prevista no protocolo, sendo este valor substituído pelo resultado do controle negativo.

Foram adquiridos 10mg de 10 compostos escolhidos de acordo com os critérios descritos no item “Resultados”. Nove deles vieram em frascos de 10mg e, um deles, em dois frascos de 5mg. Soluções mãe, na concentração de 0,1M cada, foram preparadas solubilizando os compostos em tubos com DMSO. A partir da solução mãe, realizaram-se diluições sucessivas, para a obtenção de soluções as concentrações 10mM, 100 μM , 10 μM e 100nM.

Todas as alíquotas foram testadas em triplicata, inclusive os controles positivo (sem nenhum inibidor) e negativo (sem enzima).

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos complexos existentes no PDB

Ao se iniciar o trabalho, observou-se a boa qualidade geral dos complexos, critério definido pela boa resolução (abaixo de 3Å) e notou-se, nas estruturas cristalinas, uma grande semelhança entre as conformações das estruturas secundárias da BACE-1 e também entre a posição e as conformações dos inibidores complexados com estas. Todos os inibidores estavam localizados no sítio catalítico da BACE-1, reportado na literatura (GOODSELL, D. O., 2010), um sinal de que a BACE-1 cristaliza-se de forma semelhante mesmo em diferentes condições experimentais e com ligantes de formas variadas (figura 8), enquanto evidencia o caráter flexível de algumas partes da estrutura da BACE-1, mostradas pela figura 11.

Figura 11: sobreposição de 12 complexos (2IS0, 1TQF, 1W51, 1XS7, 1YM2, 2B8L, 2B8V, 2EWY, 2F3E, 2F3F, 2FDP, 2G94), onde nota-se grande semelhança da disposição das estruturas secundárias da BACE-1 obtidas de complexos com origens diferentes.

4.2. Seleção do complexo de referência

Após a filtragem dos 86 ligantes iniciais, nove foram selecionados (Códigos PDB: 2VJ7, 2VNM, 2WF0, 2WF1, 2WF2, 2WF3, 2VNN, 2VIJ, 2WEZ) pelos critérios determinados no item 3.3 e, dentre estes, o oriundo do complexo 2WF1 foi selecionado, por possuir a menor resolução, 1.6 Å, e um bom fator R, de 0.184.

Previamente aos cálculos de triagem virtual, foram adicionados hidrogênios à BACE-1 já que, estes não são observados na difração de Raios-X. Os hidrogênios dos resíduos que compõem o sítio catalítico foram visualmente checados, sendo alguns reorientados para uma posição mais favorável à realização de interações intermoleculares, melhorando assim o resultado final e evitando resultados incorretos dos cálculos de triagem virtual. Os aspartatos

catalíticos não foram protonados e não receberam cargas formais, mas os oxigênios ácidos possuem carga parcial de -0,155.

4.3. Definição de configurações dos cálculos de Triagem Virtual com o GOLD

O primeiro passo para iniciar a definição dos parâmetros a serem utilizados pelo GOLD, foi a seleção do ponto onde os cálculos são centrados, neste caso, um átomo do sítio catalítico da BACE-1. Foram testados os três átomos mais próximos ao centro do sítio catalítico, utilizando-se como referência o posicionamento dos ligantes, foram eles o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 93, o Oxigênio da Glicina 95, e o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 289 (figura 12).

Figura 12: representação do sítio catalítico da BACE-1, indicando os átomos utilizados para a calibração dos programas de triagem virtual. A seta azul indica o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 93, a seta preta indica o Oxigênio da Glicina 95, a seta vermelha indica o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 289, e a seta verde indica a alça *flap*.

Testou-se também diferentes raios da esfera de busca, com 10, 11, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5 e 15Å, todos englobando a alça *flap*. À partir de 12Å conseguiu-se boa reprodução da conformação cristalográfica e selecionou-se 13,5Å como a medida ideal, por apresentar bom resultado de reprodução da conformação cristalográfica, com RMSD máximo (desvio médio quadrático) (MORGON, N. H., 2007) de 2,75Å entre as dez conformações geradas, e 0,5Å entre a apontada pelo GOLD como melhor, e a conformação cristalográfica, além de não

apresentar orientações diferentes desta (figura 13). O raio de 13,5Å apresentou a melhor relação entre área explorada e resultado, sem expandir em excesso a área explorada, o que aumentaria o tempo para realização dos cálculos sem trazer benefícios significativos aos resultados.

Figura 13: Resultado do teste para a definição das configurações a serem empregadas no programa GOLD, para os ensaios de triagem virtual. Em verde, a conformação avaliada como a melhor das 10 geradas pelo GOLD, em lilás, a oriunda do complexo depositado no PDB e, com os carbonos em cinza, as demais nove conformações obtidas.

Outro parâmetro analisado foi a variação do grau de complexidade do algoritmo, que na versão 4.1 do GOLD, pode variar entre 10 e 200%. Este parâmetro consiste na variação do número de operações genéticas (*crossover* e mutação) realizadas pelo GOLD e, quanto maior seu número, mais eficiente e abrangente é o cálculo, porém, o maior é seu custo computacional. Foi observado que, configurar a eficiência do algoritmo como 200% ao invés de 100%, proporcionou resultados mais precisos, com RMSD entre os confôrmeros gerados pelo GOLD ligeiramente menor, de 2.6Å. Esta configuração foi utilizada para cálculos da segunda etapa de filtragem, na seleção de 50 dentre os 2000 compostos, mas todos os resultados destes cálculos apresentaram erros, com moléculas definidas com o tamanho de um átomo, erro que não ocorreu com a utilização do algoritmo com grau de complexidade de 100%, sendo esta a eficiência utilizada na segunda etapa de seleção por triagem virtual.

4.4 Triagens virtuais baseadas em estrutura

As triagens virtuais baseadas em estrutura, realizadas com os programas GOLD (com e sem o tendenciamento do *scaffold*) e GLIDE resultaram na seleção dos 50 compostos com melhor pontuação, atribuída por cada programa (no caso do GOLD, foram dois conjuntos diferentes, um com e outro sem o tendenciamento da triagem pelo *scaffold*), de cada base de dados, gerando o total de 600 compostos com bom modo de ligação teórico ao sítio da BACE-1. Estes cálculos foram realizados em um intervalo de aproximadamente 18 meses.

4.5 Índice de Tanimoto, PASS e SEA

O uso do PASS e SEA foi abortado, pois os dois servidores não indicaram a BACE-1 como alvo adequado para os inibidores já conhecidos da enzima, utilizados na geração do farmacóforo (inibidores presentes nos complexos 2WF2, 2WF3, 2VJ7, 2VIY, 2VJ6, 2WF0, 2IQG, 2QMD, 3CIC, 2QMF, 3CID, 2OAH, 2B8L e 2WF1 do PDB).

O índice de Tanimoto seria utilizado para reduzir os 2000 melhores resultados dos cálculos iniciais de triagem virtual para 1000, de forma rápida, e estas 1000 voltariam para os programas de triagem virtual para serem reduzidas às 50 melhores, utilizando os algoritmos mais complexos.

Esperava-se que houvesse uma similaridade de pelo menos 70% (0,7) entre estas 2000 moléculas e o *scaffold*, mas a similaridade máxima foi de 64 a 68%, e a mínima, para a milésima estrutura, de 28 a 35%, índices muito baixos, o que levou ao descarte desta abordagem, direcionando assim as 2000 moléculas resultantes da primeira etapa de triagem virtual de volta aos programas.

4.6 Derivação de Farmacóforo

O padrão farmacofórico gerado com 13 estruturas de inibidores conhecidos da BACE-1, descrito no item 3.5.1, mostrou-se complementar tanto à estrutura da BACE-1, após um pequeno ajuste, quanto aos inibidores presentes no *input*. Este padrão constitui-se de cinco grupos: um doador de ligações de hidrogênio, cuja esfera de exclusão engloba os dois Aspartatos do sítio catalítico, dois aceptores de ligações de hidrogênio, cujas esferas de exclusão englobam nitrogênios da cadeia principal da BACE-1, e dois sítios hidrofóbicos, sendo um deles aromático, ambos próximos a resíduos aromáticos (figuras 14 a 16). As

esferas maiores indicam as regiões do sítio que devem possuir características complementares (o grupo doador de ligação de hidrogênio deve ter correspondente, no sítio, um aceptor de ligações de hidrogênio) e a seta indica a direção que a interação ocorre. As esferas menores indicam a região do ligante que deve possuir a característica representada.

As posições das esferas respectivas ao sítio da BACE-1 foram deslocadas para haver complementariedade com o sítio, haja vista que o farmacóforo não utiliza informações deste em sua gênese.

Figura 14: Grupos farmacofóricos sobrepostos ao ligante 2WF1, em duas. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptores de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, hidrofóbico em azul claro.

Figura 15: Grupos farmacofóricos dentro do sítio catalítico da BACE-1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptores de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, hidrofóbico em azul claro.

Figura 16: Grupos farmacofóricos dentro do sítio catalítico da BACE-1 junto com o ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptores de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, hidrofóbico em azul claro.

4.7 Filtragem por Farmacóforo

As 600 moléculas selecionadas pelos cálculos de triagem virtual baseada em estrutura não apresentaram consensos entre os resultados de GOLD, GOLD com *Scaffold* e GLIDE. Todas foram inspecionadas visualmente quanto a sua sobreposição ao farmacóforo descrito no item 3.5.1, e selecionaram-se os que eram coincidentes ao mesmo, restando 28 compostos (4 da base Diverset, obtidos com o GOLD usando o *Scaffold*, 11 da base CNS ZINC obtidos com o GLIDE, 5 da base CNS ChemBridge, dois deles obtidos com o GOLD usando o *Scaffold*, um com o GLIDE e dois com o GOLD, e 8 da base MayBridge, obtidos com o GLIDE).

4.8 Derivação do Farmacóforo para triagens virtuais

Um segundo farmacóforo, mais complexo que o primeiro, foi gerado para a realização de triagens virtuais baseadas nestas informações, ao invés de considerar a estrutura do sítio da BACE-1. Este farmacóforo é complementar ao sítio catalítico da BACE-1, englobando a alça *flap*, os aspartatos catalíticos e outros resíduos com os quais os inibidores conhecidos interagem. O farmacóforo é composto de 8 características, sendo dois aceptores de ligações de hidrogênio, um doador de ligações de hidrogênio, dois hidrofóbicos aromáticos, dois hidrofóbicos alifáticos e um de anéis aromáticos. (figura 17)

Figura 17: Grupos farmacofóricos sobrepostos ao ligante do complexo 2WF1. Grupos doadores de ligações de hidrogênio representados em rosa, aceitor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbicos aromáticos em azul escuro, hidrofóbicos em azul claro, anel aromático em laranja.

Como 8 características tornariam a triagem restritiva a moléculas muito semelhantes ao inibidor de referência, este farmacóforo foi dividido em 3 subfarmacóforos, o que se mostrou interessante pela maior diversidade de compostos resultantes dos cálculos, onde não houveram coincidências entre os resultados.

O subfarmacóforo 1 possui quatro características, sendo um grupo aceptor de ligações de hidrogênio, um grupo doador de ligações de hidrogênio, um grupo hidrofóbico aromático e um grupo hidrofóbico alifático. (figura 18)

Figura 18: Subfarmacóforo 1 sobreposto ao ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceptor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromático em azul escuro, e hidrofóbico em azul claro.

O subfarmacóforo 2 possui cinco características, sendo um grupo aceptor de ligações de hidrogênio, um grupo doador de ligações de hidrogênio, um grupo hidrofóbico aromático, um grupo hidrofóbico alifático e um grupo de anel aromático. (figura 19)

Figura 19: Subfarmacóforo 2 sobreposto ao ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceitor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico aromáticos em azul escuro, hidrofóbico em azul claro e anel aromático em laranja.

O subfarmacóforo 3 possui quatro características, sendo um grupo aceitor de ligações de hidrogênio, um grupo doador de ligações de hidrogênio, um grupo hidrofóbico alifático e um grupo de anel aromático. (figura 20)

Figura 20: Subfarmacóforo 3 sobreposto ao ligante do complexo 2WF1. Grupo doador de ligações de hidrogênio representado em rosa, aceitor de ligações de hidrogênio, em verde, hidrofóbico em azul claro e anel aromático em laranja.

4.9 Triagem Virtual por Farmacóforo

As triagens virtuais por farmacóforo não apresentaram moléculas coincidentes entre os três diferentes subfarmacóforos utilizados como base para os cálculos.

Todos os resultados das triagens com o subfarmacóforo 1 foram complementares às suas quatro características. Os resultados das triagens com o subfarmacóforo 2 nas bases CNS Chembridge e Diverset foram complementares à quatro de suas cinco características, e na base Maybridge foram complementares às 5 características. Os resultados das triagens com o subfarmacóforo 3 foram complementares às suas quatro características. O número de compostos obtido por cada subfarmacóforo em cada base de dados é mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos cálculos de triagem virtual realizados com os três subfarmacóforos, em cada base de dados.

Subfarmacóforo	1	2	3
Base de dados	número	de	compostos
CNS ZINC	610	0	25000
Chembridge	87	1719	2627
Maybridge	0	916	7305
Diverset	0	188	753

Em todos os casos, os 100 compostos com melhor classificação de cada base foram selecionados para avaliação pelos critérios de seleção apresentados adiante.

Em todos os casos obtiveram-se resultados coincidentes a um número menor de características do que os listados acima, assim como, no caso do subfarmacóforo 2, obteve-se resultados complementares a 5 características nas bases CNS Chembridge e Maybridge, mas este resultado consiste em milhares de moléculas, no caso do número menor, e não mais que quatro moléculas no caso do número maior. Como os resultados presentes no número maior sempre integram os do número menor (as quatro moléculas totalmente complementares ao subfarmacóforo 2 também são complementares a quatro características, todas complementares a quatro o serão a três), optou-se por avaliar as moléculas presentes no conjunto com maior número possível de características, sem ficar restrito a menos de 20 moléculas.

Estes cálculos foram realizados no intervalo de 3 meses.

4.10 Triagem Virtual baseada em estrutura e em Farmacóforo

Assim como as outras triagens virtuais, não houve consenso entre os resultados entre os subfarmacóforos e também em relação aos outros métodos de triagem virtual com a CNS ZINC.

O subfarmacóforo 1 reportou 1223 moléculas como coincidentes a 3 de suas quatro características, o subfarmacóforo 2 reportou 28 moléculas como complementares à quatro de suas cinco características, e o subfarmacóforo 3 reportou 12 como complementares às suas quatro características.

A complementariedade a um menor número de características do que as citadas acima, também ocorreu nesta estratégia, e da mesma forma buscou-se o equilíbrio entre número de características atendida e número de moléculas resultantes. Estes cálculos foram realizados no intervalo de 1 mês.

4.11 Interações intermoleculares com o sítio da BACE-1

Todos os resultados das triagens virtuais foram avaliados quanto à capacidade destas moléculas estarem próximas o suficiente para interagirem com os resíduos do sítio catalítico da BACE-1, para assim reduzir o número de moléculas de centenas a algumas dezenas, de forma a selecionar-se as com maiores chances de apresentarem atividade inibitória.

Como a inibição da BACE-1 ocorre pelo bloqueio dos aspartatos catalíticos e pelo impedimento da entrada do APP ao sítio catalítico, foram consideradas essenciais as interações diretas (sem o intermédio de uma molécula de água) com pelo menos um dos aspartatos (preferencialmente com os dois), e com pelo menos um resíduo da alça *flap*, para manter o sítio fechado.

As demais interações também foram consideradas, quanti e qualitativamente, com maior peso dado às ligações de hidrogênio, mais fortes que as interações hidrofóbicas.

Todas as interações de cada composto estão listadas nas tabelas 3 a 7. As interações com os resíduos hidrofóbicos, como a Tirosina 132 são indicadas quando ocorrem com a porção aromática do resíduo pela sigla AR, as interações sem marcação, ocorrem com a cadeia principal do resíduo. As interações marcadas com * são as que podem ocorrer, caso o radical do resíduo sofra mudanças conformacionais. Os resíduos que realizam interações com duas ou mais partes do composto são indicados, assim como se a interação ocorrer com porções diferentes do resíduo, AR para interação aromática e H para ligação de hidrogênio.

Tabela 3: Interações intermoleculares realizadas entre os compostos seleccionados pela triagem virtual baseada no subfarmacóforo 1 e o sítio catalítico da BACE-1.

Composto	Resíduos
F1_Chembridge_1	ASP289, THR133 , ARG286, TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_Chembridge_2	ASP289, THR133, GLN134 , ARG286, TYR259 (AR), TYR132 (AR), PHE169
F1_Chembridge_3	ASP93, THR133 , ARG286 / GLN134 , TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_Chembridge_4	ASP93, ASP289, THR133 , TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_Chembridge_5	ASP289, THR292, THR133 , ARG286, TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_Chembridge_6	ASP289, THR133 , ARG286
F1_Chembridge_8	ASP289, THR133 , ARG286*, TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_Chembridge_9	ASP289, THR292, GLN134, THR133, TYR132 (AR)
F1_ZINC_1	ASP289, THR133, GLN134 (cadeia principal e radical)
F1_ZINC_3	ASP289 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR133 , THR292
F1_ZINC_4	ASP289 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR133 , THR292, GLN134 (radical)
F1_ZINC_5	ASP289, THR133, GLN134 , THR292
F1_ZINC_6	ASP289, TYR132 (AR, e duas vezes), THR292, ARG286
F1_ZINC_7	ASP289 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR292, THR133 (cadeia e radical), GLN134 (AR)
F1_ZINC_8	ASP289 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR133 (cadeia e radical), ARG286
F1_ZINC_9	ASP289, THR133 , TYR259 (AR), TYR132 (AR),
F1_ZINC_10	ASP289, THR133 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), ARG286
F1_ZINC_11	ASP289, THR133 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR292
F1_ZINC_12	ASP289, THR133, GLN134, GLY291, TYR132 (AR)
F1_ZINC_13	ASP289, THR133 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), ARG286, THR292
F1_ZINC_14	ASP289, TYR132 (AR), THR292, ARG286
F1_ZINC_15	ASP289, ASP93, THR133 , PHE169, ARG286
F1_ZINC_16	ASP289, THR133 , THR292, ARG286, TYR259 (AR), TYR132 (AR)

Tabela 4: Interações intermoleculares realizadas entre os compostos seleccionados pela triagem virtual baseada no subfarmacóforo 2 e o sítio catalítico da BACE-1.

Composto	Resíduos
F2_Chembridge_1	TYR259 (AR e Hidro), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ASN294, ARG286
F2_Chembridge_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133
F2_Chembridge_3	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG286
F2_Chembridge_4	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , GLN134
F2_Chembridge_5	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG286
F2_Chembridge_6	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ASN294, ARG286
F2_Chembridge_7	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , ASP93 , THR133 , ASN294, THR292, ARG286
F2_Chembridge_8	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG286
F2_Diverset_1	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292,
F2_Diverset_2	TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (AR), THR292, PHE169
F2_Diverset_3	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, GLN134 , PHE169*
F2_Diverset_4	TYR259 (AR e hidro), TYR132 (AR, duas vezes), ASP289 , THR133 , THR292, GLN134 , PHE169
F2_Diverset_5	TYR132 (AR), ASP289 , THR133 GLN134 (radical), THR293 (cadeia principal e radical)
F2_Diverset_6	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical), ARG286*, GLN134 , THR293, ASN294
F2_Maybridge_1	TYR259 (AR e hidro), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG286, THR292, PHE169
F2_Maybridge_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia e radical), THR292, GLN134
F2_Maybridge_3	ILE187, TYR259 (AR), TYR132 (AR, dois lados), ASP289 , THR133 (radical), ARG286, GLN134 ,
F2_Maybridge_4	TYR259 (AR), TYR132 (AR, dois lados), ASP289 , THR133 (cadeia e radical), ARG286, PHE169

Tabela 5: Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada no subfarmacóforo 3 e o sítio catalítico da BACE-1.

Composto	Resíduos
F3_Chembridge_1	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ASN294, GLN134 (quase)
F3_Chembridge_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , GLN134 , ARG286
F3_Chembridge_3	TYR259 (AR e hidro), ASP289 , THR133 (cadeia e radical), ARG286
F3_Chembridge_4	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG286
F3_Chembridge_5	TYR259 (AR e hidro), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ARG296*
F3_Chembridge_6	TYR259 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ASN294, ARG296*
F3_Chembridge_7	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia e radical), THR292, GLN134
F3_Diverset_1	TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG296, THR292
F3_Diverset_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (radical), THR292, GLN134
F3_Diverset_3	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia e radical), GLN134 , ILE171, ARG296
F3_Diverset_4	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical, duas vezes), ASN294, GLN134 (cadeia principal e radical)
F3_Diverset_5	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (radical), THR292, ARG296, GLN134 , ARG296
F3_Diverset_6	TYR259 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia e radical, duas vezes), ASN294
F3_Diverset_7	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (radical), GLN134 , ARG296
F3_Diverset_8	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical), ASN294
F3_Maybridge_1	SER296, TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia e radical), THR292, SER386, ASN294, GLN134
F3_Maybridge_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical), THR292, GLN134
F3_Maybridge_3	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical), ARG296, GLN134
F3_ZINC_1	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical, duas vezes), ARG296
F3_ZINC_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG296, GLN134
F3_ZINC_3	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ARG296, GLN134
F3_ZINC_4	SER286, TYR259 (AR e H), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ARG296, THR293*, GLN134 *
F3_ZINC_5	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , GLN134
F3_ZINC_6	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , ARG296, GLN134
F3_ZINC_7	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ARG296, ASN294
F3_ZINC_8	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ARG296, ASN294
F3_ZINC_9	TYR259 (AR e H), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ASN294, SER386
F3_ZINC_10	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 (cadeia principal e radical, duas vezes), ARG296
F3_ZINC_11	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289 , THR133 , THR292, ASN294

Tabela 6: Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura e em farmacóforo, e o sítio catalítico da BACE-1.

Composto	Resíduos
F1_1	ASP289, THR133, GLN134 , GLY291, TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_2	ASP289, THR133, GLN134 , GLY291, TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F1_3	ASP289, THR133, GLN134 , PHE169
F1_4	ASP289, THR133, GLN134 , TYR259 (AR), TYR132 (AR)
F2_1	ASP289 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR133, GLN134 , GLY291
F2_2	ASP289 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), THR133 (cadeia principal e radical), GLY291
F2_3	ASP289 , GLY291, THR133, GLN134, TYR132 (AR), PHE169
F2_4	ASP289 , GLY291, TYR132 (AR), THR133, GLN134 (cadeia principal e radical), THR293, PHE169*
F2_5	ASP289 , GLY291, TYR132 (AR), THR292, THR133, GLN134 (cadeia principal e radical), THR293, PHE169*
F3_1	ARG189 , TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289, THR133 (cadeia principal e radical), THR292, GLN134
F3_2	TYR259 (AR), TYR132 (AR), ASP289, THR133 (cadeia principal e radical), THR292, GLN134

Tabela 7: Interações intermoleculares realizadas entre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura e o sítio catalítico da BACE-1.

Composto	Resíduos
Chembridge_1	TYR259 (AR), VAL393, ASP289 , GLY95, ASP93 , THR292, TYR132
Chembridge_3	PHE169, TRP176, ASP93, TYR132, GLN134 , GLY291
Chembridge_5	ASP93, 289 , GLY291, THR292, GLN134* , ARG296*
Maybridge2	ASP93 , GLY95, TYR132 (AR), GLY291, ARG368, GLY72
Maybridge4	ILE187, TYR132 (AR), 259, ASP289, THR133
Maybridge5	TYR132 (AR), PHE169, ASP289 , GLY291, GLY72, ARG368*
Maybridge6	GLY95, TYR259, ASP93, TYR132 (AR), PHE169, ASN294, ARG368*, LYS382*
Maybridge8	LYS285*, TYR259, ASP289, TYR132 (AR), PHE169, ARG296*
ZINC1	ASP93, TYR132 (AR), PHE169, GLY291, GLN134
ZINC3	TYR132 , PHE169, ASP93 , ARG296*
ZINC4	ASP93, TYR132 (AR), PHE169, GLY291, GLN134 , ARG286*
ZINC5	ASP93, ASP289, TYR132 (AR), PHE169, THR292, ARG296*
ZINC7	ASP93, ASP289 , GLY291, TYR132 (AR), PHE169, ASN294, ARG296*
ZINC8	ASP93 , GLY291, TYR132 (AR), PHE169, GLN134 , ARG286*, THR293*
ZINC9	ASP93 , GLY291, TYR132 , PHE169, GLN134 , ARG286*
ZINC10	ASP93, ASP289, TYR132 (AR), PHE169

4.12 Campos de Interação Molecular

Os resultados obtidos com o GRID mostram que há sobreposição entre os MIFs gerados por diferentes sondas e as partes condizentes com estas informações, observadas junto ao inibidor de referência (figuras 21 a 25), e também entre os MIFs e o farmacóforo gerado (dado não apresentado).

Nas regiões indicadas como favoráveis a interações apolares aromáticas entre o ligante e receptor, representadas na figura 21 pelo o grupo de prova de carbonos aromáticos, com contorno -3.2 (kcal/mol) pode-se observar que um dos anéis aromáticos da molécula está consoante com o grupo de prova e esta região está próxima à Fenilalanina 169. O mesmo não ocorreu com o grupo DRY, referente a carbonos alifáticos que, mesmo com contorno -0.5 apresentou grades diminutas e em regiões semelhantes às obtidas com o grupo de carbonos aromáticos, por isso, este não foi considerado nas análises.

Os grupos N2+ e N3+ apresentaram resultados muito similares, portanto, somente o segundo foi utilizado e vê-se na figura 22, com contorno de nível -10.5, que este engloba uma das amidas da molécula e esta região está próxima aos Aspartatos 93 e 289.

Os grupos O:: com contorno -8 (figura 23) e O com contorno -6 (figura 24) também se sobrepõe aos oxigênios da amida, em região próxima à cadeia principal da Glutamina 134, e da sulfonamida da molécula, próxima à cadeia principal da asparagina 294.

O grupo OH2 sobrepõe-se às duas amidas da molécula quando o nível do contorno é -10 (figura 25), esta região estando próxima ao Aspartato 93, mostrando que as diferentes espécies de oxigênio podem ser acomodadas em regiões diferentes e com alto nível energético em suas interações intermoleculares. A proteína não foi representada para facilitar a visualização das informações, todas as visualizações foram realizadas com o programa Insight II (INSIGHT II USER GUIDE, 2005)

Figura 21: Representação do grupo de prova C1= com contorno -3,2 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. A seta amarela indica a sobreposição do anel com a região indicada como favorável a interagir com anéis aromáticos.

Figura 22: Representação do grupo de prova N2+ com contorno -10,5 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. A seta amarela indica a sobreposição de um nitrogênio com a região indicada como favorável a interagir com nitrogênios.

Figura 23: Representação do grupo de prova O:: com contorno -8 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. As setas amarelas indicam a sobreposição de oxigênios carbonílicos com as regiões indicadas como favoráveis a interagir com oxigênios carbonílicos.

Figura 24: Representação do grupo de prova O com contorno -6 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. As setas amarelas indicam a sobreposição de oxigênios carbonílicos com as regiões indicadas como favoráveis a interagir com oxigênios carboxílicos.

Figura 25: Representação do grupo de prova OH2 com contorno -10 kcal/mol e o ligante do complexo 2WF1. A seta amarela indica a sobreposição de uma amida com a região indicada como favorável a interagir com moléculas de água.

Os resultados das análises de MIFs para cada composto estão listadas nas tabelas 8 a 12. Cada sobreposição é indicada separadamente: as marcações com asterisco representam os casos onde a sobreposição esteve próxima de ocorrer (ou seja, ocorreriam em níveis de energia mais baixos), AR indica sobreposição de anel aromático ao MIF de carbonos aromáticos, N indica sobreposição de um nitrogênio ao MIF de nitrogênios, O:: indica sobreposição de um oxigênio de carbonila ao MIF de oxigênio de carbonilas, e OH2 indica sobreposição de um de um oxigênio de carboxila ao MIF de oxigênio de água.

Os compostos foram nomeados de acordo com a base de dados de onde foram originados (Chembridge, para compostos da subcoleção CNS da base Chembridge, Diverset para compostos da subcoleção Diverset da base Chembridge, Maybridge e ZINC para os compostos da subcoleção CNS da base ZINC), a ordem de classificação dentro de cada base, e o subfarmacóforo, quando pertinente (F1, de subfarmacóforo 1, F2, de subfarmacóforo 2, F3, de subfarmacóforo 3). Os compostos da tabela 12 são todos da CNS ZINC, por isso foram numerados apenas de acordo com a ordem de classificação e o subfarmacóforo que as selecionou.

Tabela 8: Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais com o subfarmacóforo 1.

Composto	Resultados MIF
F1_Chembridge_1	AR, N
F1_Chembridge_2	AR, N, O::, OH2*
F1_Chembridge_3	AR, AR*, N, N, O::, O::
F1_Chembridge_4	AR, N, O::
F1_Chembridge_5	AR, AR, N
F1_Chembridge_6	N
F1_Chembridge_8	AR, AR, N, O::
F1_Chembridge_9	AR, N, O::, O::**
F1_ZINC_1	AR, N
F1_ZINC_3	AR, N
F1_ZINC_4	AR, AR*, O::, N*
F1_ZINC_5	O::, N
F1_ZINC_6	AR, AR, N, O::
F1_ZINC_7	AR, AR, N, O::
F1_ZINC_8	AR, N
F1_ZINC_9	N, O::*, AR*
F1_ZINC_10	N, O::, AR
F1_ZINC_11	AR, AR*, N, N, O::*
F1_ZINC_12	N, AR*
F1_ZINC_13	N, AR
F1_ZINC_14	N, N, AR, AR, O::, O::*
F1_ZINC_15	N, N, AR, AR, O::*
F1_ZINC_16	AR

Tabela 9: Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais com o subfarmacóforo 1.

Composto	Resultados MIF
F2_Chembridge_1	N, O::*
F2_Chembridge_2	N, O::, AR
F2_Chembridge_3	N, O::
F2_Chembridge_4	AR*, N, O::
F2_Chembridge_5	O::, N
F2_Chembridge_6	N, O::, O::
F2_Chembridge_7	AR, N, O::, O::
F2_Chembridge_8	N, O::
F2_Diverset_1	N, O::
F2_Diverset_2	AR*, OH2
F2_Diverset_3	AR, N, O::, O::
F2_Diverset_4	AR, AR, N, O::, O::
F2_Diverset_5	AR*, N
F2_Diverset_6	AR*, N, O::
F2_Maybridge_1	AR
F2_Maybridge_2	N, O::, O::
F2_Maybridge_3	AR, O::
F2_Maybridge_4	AR*, N, O::

Tabela 10: Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais com o subfarmacóforo 3.

Composto	Resultados MIF
F3_Chembridge_1	AR*, N, O::
F3_Chembridge_2	AR, AR*, N, O::*
F3_Chembridge_3	N, O::, O::
F3_Chembridge_4	N, O::
F3_Chembridge_5	N, O::*
F3_Chembridge_6	N, N*, O::, O::
F3_Chembridge_7	N
F3_Diverset_1	O::
F3_Diverset_2	N, N
F3_Diverset_3	N, O::
F3_Diverset_4	N, O::
F3_Diverset_5	AR, OH2
F3_Diverset_6	AR, N*, O::, O::
F3_Diverset_7	N, O::*, O::*
F3_Diverset_8	N, O::, O::
F3_Maybridge_1	AR, N, O::, O::, O::*, O::*
F3_Maybridge_2	N, N*, O::*, O::*
F3_Maybridge_3	N, O::, O::
F3_ZINC_1	N, O::
F3_ZINC_2	AR, OH2
F3_ZINC_3	AR, N, O::
F3_ZINC_4	AR, AR*, OH2
F3_ZINC_5	N, O::*
F3_ZINC_6	AR, AR*, N, O::
F3_ZINC_7	AR, AR, N, O::, O::*
F3_ZINC_8	AR, AR*, N, O::, O::*
F3_ZINC_9	AR, N, O::
F3_ZINC_10	AR, N
F3_ZINC_11	AR*, N

Tabela 11: Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais baseadas em estrutura.

Composto	Resultados MIF
Chembridge_1	AR, N, AR, O
Chembridge_3	AR, O, O**
Chembridge_5	O, AR, N, N, O*
Maybridge2	O, AR, O, AR
Maybridge4	N
Maybridge5	AR, AR, O::, O::, N
Maybridge6	AR, N, N, O::*
Maybridge8	N, N, O::, AR
ZINC1	N, AR*, O::
ZINC3	AR, N, O::
ZINC4	N, AR*, O::
ZINC5	O::, O::, O::
ZINC7	N, AR*
ZINC8	N, AR*, O::
ZINC9	N, AR*, O::
ZINC10	N, AR, O::

Tabela 12: Resultados das análises de sobreposição aos MIFs dos compostos selecionados à partir dos resultados das triagens virtuais baseadas em estrutura e em farmacóforo.

Composto	Resultados MIF
F1_1	AR*, N, O::
F1_2	AR*, AR*, N, O::, O::*
F1_3	AR, N, O::, O::
F1_4	AR, AR*, N, O::, O::
F2_1	AR*, N, O::, O::
F2_2	AR*, N, O::, O::*
F2_3	AR, O::
F2_4	AR, O::, OH2
F2_5	AR, O::, OH2
F3_1	AR, N, O::
F3_2	AR, N, O::

O número mínimo de sobreposições aceito foi dois, não existindo um valor máximo, e as sobreposições próximas de ocorrerem foram contabilizadas com metade do peso.

4.13 PharmMapper

O resultado apontado pelo site mostra a classificação dos diferentes alvos potenciais para o composto submetido, indicando a qual complexo do PDB este resultado se refere, a pontuação dada para este resultado, o número de grupos farmacofóricos em comum entre eles (NC) e também a “pontuação normalizada”, que é o produto entre a pontuação e o número de grupos farmacofóricos.

Foi considerado como critério principal a posição das 5 primeiras ocorrências de BACE-1, seguido pela pontuação atribuída para a similaridade entre o composto e o ligante e o número de características em comum entre os farmacóforos.

Os resultados são mostrados nas tabelas 13 a 17.

Tabela 13: Resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante e por farmacóforo.

Composto					Composto				
F1_1	Posição	PDB ID	NC	Pontuação	F2_3	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
	3	2FDP	13	4.055		1	2F3E	16	4.634
	23	2F3F	11	3.354		2	1YM2	13	4.275
	29	1FKN	16	3.258		3	2F3F	11	4.110
	33	1XS7	11	3.204		4	2QK5	13	3.969
	39	1YM2	13	3.103		6	2WF4	8	3.827
F1_2	5	1YM4	12	3.774	F2_4	1	2QK5	13	4.684
	11	3DV1	11	3.706		2	2F3E	16	4.634
	12	1FKN	16	3.705		3	1YM2	13	4.275
	13	3DUY	12	3.694		4	2F3F	11	4.110
	16	1M4H	18	3.611		6	2WF4	8	3.827
F1_3	3	1FKN	16	3.656	F2_5	1	2F3E	16	4.633
	5	1M4H	18	3.396		2	2F3F	11	4.112
	7	2F3E	16	3.396		3	1YM2	13	4.027
	8	2G94	15	3.303		4	2G94	15	3.934
	12	2FDP	13	3.210		5	2QK5	13	3.930
F1_4	16	2QK5	13	3.378	F3_1	29	2FDP	13	3.629
	17	3DUY	12	3.373		31	2F3E	16	3.620
	18	3DV1	11	3.355		60	2P83	10	3.288
	23	2F3F	11	3.187		61	2F3F	11	3.275
	26	2F3E	16	3.070		62	1M4H	18	3.269
F2_1	4	2FDP	13	4.009	F3_2	3	1YM2	13	3.618
	24	2F3F	11	3.354		30	3DUY	12	3.324
	28	1FKN	16	3.258		33	2FDP	13	3.271
	36	1YM2	13	3.103		39	1XS7	11	3.191
	39	1M4H	18	3.046		133	2P8H	11	2.897
F2_2	5	1YM4	12	3.774					
	11	3DV1	11	3.706					
	12	1FKN	16	3.705					
	13	3DUY	12	3.694					
	16	1M4H	18	3.611					

Tabela 14: Resultados da análise do PharmMapper para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 1.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação	Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F1 Chembridge 1	7	2QK5	13	3.581	F1_ZINC_3	4	2P8H	11	3.178
	16	2P8H	11	3.339		29	2F3E	16	2.952
	30	3DUY	12	3.103		40	2VIJ	8	2.930
	56	3IRZ	8	2.952		51	1M4H	18	2.915
	89	2ZQL	11	2.896		52	2WF0	11	2.907
F1 Chembridge 2	8	2PH6	7	3.428	F1_ZINC_4	1	3DUY	12	3.962
	11	2IRZ	8	3.359		10	2P8H	11	3.51
	12	2QZL	11	3.306		20	2QK5	13	3.093
	13	2P8H	11	3.294		27	2QZL	11	2.96
	16	2F3E	16	3.242		28	2PH6	7	2.947
F1 Chembridge 3	1	1M4H	18	3.739	F1_ZINC_5	1	2P8H	11	3.990
	2	1FKN	16	3.732		8	1M4H	18	3.640
	3	2G94	15	3.686		15	3DUY	12	3.451
	10	2F3E	16	3.434		30	1FKN	16	3.366
	11	1M4H	18	3.739		42	2PJ4	13	3.258
F1 Chembridge 4	21	2F3E	16	3.568	F1_ZINC_6	1	2FDP	13	3.891
	39	1XS7	11	3.372		9	1M4H	18	3.266
	45	2YM2	13	3.351		10	1FKN	16	3.259
	48	2IQG	12	3.329		14	2IRZ	8	3.128
	49	2YM4	12	3.329		16	2QZL	11	3.068
F1 Chembridge 5	33	2IS0	8	2.969	F1_ZINC_7	1	2WF0	11	3.771
	42	2IRZ	8	2.955		14	2F3E	16	2.981
	43	2ZQL	11	2.953		18	2P8H	11	2.96
	50	2PH6	7	2.941		34	2QK5	13	2.89
	56	2QK5	13	2.935		63	2G94	15	2.829
F1 Chembridge 6	6	2F3E	16	3.579	F1_ZINC_8	2	2F3E	16	3.667
	22	2P8H	11	3.229		31	2FDP	13	3.276
	26	2P83	10	3.203		39	2IQG	12	3.262
	44	2ZQL	11	2.973		78	2P8H	11	3.120
	94	2QK5	13	2.921		83	2P83	10	3.104
F1 Chembridge 8	26	3DUY	12	3.271	F1_ZINC_9	2	2FDP	13	3.349
	36	1YM4	12	3.082		6	3DUY	13	3.211
	37	1M4H	18	3.005		24	2QK5	13	2.933
	53	1YM2	13	2.954		28	1XS7	11	2.928
	62	2QK5	13	2.945		41	1YM2	13	2.902
F1 Chembridge 9	26	3DUY	12	3.271	F1_ZINC_10	4	2QK5	13	3.391
	36	1YM4	12	3.082		14	3DUY	12	2.495
	37	1M4H	18	3.005		58	1YM2	13	2.863
	53	1YM2	13	2.954		88	2IQG	12	2.804
	62	2QK5	13	2.945		90	2G94	15	2.795
F1_ZINC_1	3	2F3E	16	4.123	F1_ZINC_11	4	1M4H	18	3.175
	7	3DUY	12	3.669		6	3DV1	11	3.015
	24	2VNN	9	3.425		21	2VIJ	8	2.889
	26	2FDP	13	3.241		26	2IQG	12	2.866
	28	1TQF	9	3.188		32	1XS7	11	2.837

Continuação da tabela 14.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação	Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F1_ZINC_12	1	2P4J	13	3.421	F1_ZINC_15	28	3DUY	12	2.977
	4	3DUY	12	3.35		42	2F3E	16	2.935
	5	1YM4	12	3.288		49	1XS7	11	2.923
	6	2IRZ	8	3.244		126	1YM2	13	2.821
	7	1FKN	16	3.24		162	2P4J	13	2.755
F1_ZINC_13	16	2F3E	16	2.986	F1_ZINC_16	1	2QK5	13	4.454
	22	1YM2	13	2.97		5	3DUY	12	3.141
	50	3FDP	13	2.918		13	3FKT	6	2.953
	57	1YM4	12	2.908		16	2WF4	8	2.934
	93	3DUY	12	2.841		19	2F3F	11	2.919
F1_ZINC_14	7	1M4H	18	3.175					
	39	3DUY	12	2.87					
	46	2F3E	16	2.856					
	49	1XS7	11	2.837					
	52	2IS0	8	2.831					

Tabela 15: Resultados da análise do PharmMapper para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 2.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F2_Chembridge_1	10	3DUY	12	3.191
	22	3DV1	11	2.913
	30	2FDP	13	2.876
	51	1M4H	18	2.832
	62	2G94	15	2.798
F2_Chembridge_2	6	2G94	15	3.683
	8	1M4H	18	3.557
	19	1YM2	13	3.253
	28	1XS7	11	3.146
	29	2F3E	16	3.140
F2_Chembridge_3	9	1YM2	13	3.361
	19	2G94	14	3.185
	21	2F3E	16	3.159
	30	1M4H	18	3.028
	37	2F3F	11	2.984
F2_Chembridge_4	10	2G94	15	2.981
	19	3DUY	12	2.919
	47	1M4H	18	2.783
	50	2P8H	11	2.762
	51	1YM2	13	2.756
F2_Chembridge_5	18	1FKN	16	3.484
	19	1YM2	13	3.456
	27	2F3E	16	3.384
	30	2F3F	11	3.338
	46	2WF0	11	3.031

Continuação da tabela 15.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F2_Chembridge_6	20	1YM2	13	3.881
	26	1YM4	12	3.765
	35	2F3E	16	3.704
	49	1M4H	18	3.575
	51	2QK5	13	3.570
F2_Chembridge_7	10	2P8H	11	3.407
	15	2FDP	13	3.312
	24	1YM2	13	3.139
	50	2G94	15	2.965
	130	1FKN	16	2.83
F2_Chembridge_8	1	2F3E	16	4.252
	3	1YM2	13	4.076
	15	2F3F	11	3.679
	21	1XS7	11	3.590
	29	1M4H	17	3.510
F2_Diverset_1	12	2QK5	13	3.665
	21	2IQG	12	3.452
	35	2F3E	16	3.175
	57	3DUY	12	2.987
	63	2P83	10	2.976
F2_Diverset_2	10	2VIJ	8	3.031
	13	2VNN	9	2.982
	19	2WF0	11	2.947
	20	1M4H	18	2.934
	32	1FKN	16	2.886
F2_Diverset_3	15	1YM4	12	3.445
	25	3DUY	12	3.368
	30	2F3E	16	3.31
	35	1M4H	18	3.286
	37	2FDP	13	3.249
F2_Diverset_4	17	2VNM	10	3.343
	30	1XS7	11	3.135
	32	2G94	15	3.126
	36	3DUY	12	3.086
	40	2VJ7	11	3.062

Continuação da tabela 15.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F2_Diverset_5	1	2PJ4	13	3.876
	22	2IQG	12	3.438
	24	2WF0	11	3.425
	26	2IS0	8	3.417
	27	2FDP	13	3.402
F2_Diverset_6	15	2VNN	9	3.562
	35	2WF0	11	3.386
	37	3DUY	12	3.374
	43	2FDP	13	3.318
	47	2VNM	10	3.301
F2_Maybridge_1	9	2YM2	13	3.325
	91	2FDP	13	2.872
	108	2G94	15	2.837
	109	3DV1	11	2.836
	158	1XS7	11	2.763
F2_Maybridge_2	37	2G94	15	3.141
	66	2B8V	8	2.984
	67	3DUY	12	2.931
	70	2P8H	11	2.928
	73	1YM4	12	2.925
F2_Maybridge_3	17	1YM2	13	3.356
	27	2FDP	13	3.248
	44	2QZL	11	3.068
	109	3DUY	12	2.916
	111	2F3E	16	2.915
F2_Maybridge_4	38	1YM2	13	3.123
	71	2QK5	13	2.969
	159	3DUY	12	2.882
	204	2IRZ	8	2.836
	247	2PH6	7	2.805

Tabela 16: Resultados da análise do PharmMapper para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 3.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F3_Chembridge_1	19	2FDP	13	3.175
	24	2ZQL	11	3.086
	35	1YM2	13	2.964
	47	3DUY	12	2.925
	86	1M4H	18	2.804
F3_Chembridge_2	8	1YM2	13	3.385
	19	2FDP	13	3.107
	38	3DUY	12	2.916
	53	2P4J	13	2.870
	59	3DV1	11	2.860
F3_Chembridge_3	6	2QK5	13	3.576
	21	2IQG	12	3.015
	64	2P83	10	2.882
	148	1M4H	18	2.787
	150	1XS7	11	2.780
F3_Chembridge_4	18	1FKN	16	3.484
	19	1YM2	13	3.356
	27	2F3E	16	3.384
	30	2F3F	11	3.338
	46	2WF0	11	3.031
F3_Chembridge_5	2	2QK5	13	3.651
	31	1FKN	16	2.878
	67	1YM2	13	2.714
	71	2G94	15	2.704
	72	1M4H	18	2.703
F3_Chembridge_6	10	2P8H	11	3.407
	15	2FDP	13	3.312
	24	1YM2	13	3.139
	50	2G94	15	2.965
	130	1FKN	16	2.830
F3_Chembridge_7	2	2FDP	13	3.898
	30	2OHN	3	2.977
	73	2DUY	12	2.854
	133	3DV1	11	2.725
	138	1YM2	13	2.715

Continuação da tabela 16.

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F3_Diverset_1	7	2F3E	16	3.614
	40	2QK5	13	3.174
	43	3DV1	11	3.143
	48	2P83	10	3.084
	86	1FKN	16	2.944
F3_Diverset_2	9	1YM2	13	3.367
	61	1FKN	16	2.790
	65	1XS7	11	2.774
	69	1YM4	12	2.744
	73	3DV1	11	2.741
F3_Diverset_3	29	2P8H	11	3.384
	103	1FKN	16	2.956
	105	2ZDZ	6	2.954
	134	1YM2	13	2.924
	159	1XS7	11	2.903
F3_Diverset_4	3	2FDP	13	3.866
	49	2F3E	16	2.993
	85	1M4H	18	2.930
	134	3DUY	12	2.848
	158	1FKN	16	2.822
F3_Diverset_5	39	2F3E	16	2.737
	50	2VNM	10	2.680
	53	2OAH	7	2.671
	58	2VIJ	8	2.633
	70	2WFO	11	2.587
F3_Diverset_6	6	1XS7	11	3.779
	29	2VNN	9	3.357
	32	2VIJ	11	3.349
	34	2VNM	10	3.334
	35	2QZL	11	3.331
F3_Diverset_7	11	1YM2	13	3.566
	14	1M4H	18	3.525
	18	2QK5	13	3.451
	22	2G94	15	3.424
	33	1XS7	11	3.276

Continuação da tabela 16

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F3_Diverset_8	28	2IQG	12	2.992
	29	1YM4	12	2.988
	30	2QK5	13	2.984
	48	1YM2	13	2.916
	49	3DUY	12	2.915
F3_Maybridge_1	21	1XS7	11	3.344
	36	2F3E	16	3.189
	179	3DV1	11	2.859
	277	2IQG	12	2.788
	299	1FKN	16	2.771
F3_Maybridge_2	38	1YM4	12	3.569
	47	1YM2	13	3.489
	49	2G94	15	3.486
	52	1M4H	18	3.462
	57	2F3E	16	3.407
F3_Maybridge_3	7	1XS7	11	3.506
	51	1YM2	13	2.907
	61	2F3E	16	2.893
	88	2P8H	11	2.829
	106	2FDP	13	2.793
F3_ZINC_1	4	2F3E	16	3.712
	8	1YM2	13	3.701
	12	2QK5	13	3.488
	17	1XS7	11	3.348
	19	1TQF	9	3.308
F3_ZINC_2	20	1M4H	18	2.872
	22	2F3E	16	2.869
	33	1G94	15	2.832
	53	1YM2	13	2.775
	61	1FKN	16	2.723
F3_ZINC_3	3	2IQG	12	3.025
	22	2VIJ	8	2.887
	23	2QK5	13	2.885
	26	2OF0	4	2.87
	34	2ZDZ	6	2.813

Continuação da tabela 16

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação
F3_ZINC_4	23	2IQG	12	2.938
	30	1FKN	16	2.925
	46	2OF0	4	2.87
	70	2IRZ	8	2.817
	78	2OAH	7	2.807
F3_ZINC_5	12	2QK5	13	0,2916
	26	2YM2	13	2.836
	55	3DV1	11	2.696
	73	3DUY	12	2.610
	83	2F3F	11	2.570
F3_ZINC_6	15	2P8H	11	2.96
	18	2IS0	8	2.925
	22	1M4H	18	2.917
	24	3DUY	12	2.911
	29	2F3E	16	2.898
F3_ZINC_7	4	2IQG	12	3.589
	11	1M4H	18	3.175
	12	2VIJ	8	3.163
	26	2WF0	11	2.986
	49	2VNN	9	2.917
F3_ZINC_8	9	2F3E	16	3.379
	18	2G94	15	3.256
	19	2WF0	11	3.178
	21	2FDP	13	3.072
	22	1M4H	18	3.054
F3_ZINC_9	24	3DV1	11	2.864
	29	2F3E	16	2.836
	36	3DUY	12	2.799
	43	1YM4	12	2.757
	51	2QZL	11	2.732
F3_ZINC_10	10	2FDP	13	3.345
	19	1M4H	18	3.045
	148	1YM2	13	2.861
	151	2IQG	12	2.860
	187	1FKN	16	2.828
F3_ZINC_11	46	2F3E	16	2.871
	59	2IQG	12	2.829
	92	2P83	10	2.749
	93	1XS7	11	2.749
	104	1FKN	16	2.725

Tabela 17: Resultados da análise do PharmMapper para os compostos seleccionados pela triagem baseada em estrutura

Composto	Posição	PDB ID	NC	Pontuação					
Chembridge_1	5	2VJ7	11	4,056	ZINC1	7	2IQG	12	3,954
	18	2QK5	13	3,821		13	2VIJ	8	3,894
	26	2IQG	12	3,761		19	2WF4	8	3,854
	31	2G94	15	3,734		27	2F3E	16	3,787
	47	2P83	10	3,675		31	2QK5	13	3,69
Chembridge_3	6	1M4H	18	4,485	ZINC3	4	2QK5	13	3,909
	38	2QK5	13	3,716		18	2F3E	16	3,427
	46	2F3E	16	3,675		21	2WF1	8	3,389
	58	2P8H	11	3,618		27	2WF0	11	3,328
	59	2G94	15	3,616		31	2VNN	9	3,258
Chembridge_5	21	1FKN	16	3,683	ZINC4	1	3DUY	12	4,359
	51	2WF4	8	3,424		3	2FDP	13	3,934
	59	3DV1	11	3,405		7	2P8H	11	3,806
	90	2F3E	16	3,249		12	2OAH	7	3,763
	113	2FDP	13	3,138		19	3DV1	11	3,688
Maybridge2	51	1M4H	18	4,096	ZINC5	9	2QK5	13	2,995
	98	1TQF	9	3,912		87	3DUY	12	2,882
	102	2QK5	13	3,906		110	1YM4	12	2,855
	116	1FKN	16	3,882		117	2P83	10	2,852
	125	2F3E	16	3,851		120	3FKT	6	2,851
Maybridge4	5	2FDP	13	4,78	ZINC7	12	2FDP	13	4,17
	10	2QK5	13	4,509		27	2G94	15	3,899
	19	1M4H	18	4,264		38	1M4H	18	3,878
	20	2F3E	16	4,244		51	2IQG	12	3,839
	31	1FKN	16	4,169		75	3DUY	12	3,749
Maybridge5	37	1XS7	11	3,397	ZINC8	1	2FDP	13	4,271
	55	1YM4	12	3,211		3	3DUY	12	3,904
	71	1M4H	18	2,976		5	2P8H	11	3,688
	88	2FDP	13	2,915		6	2YM4	12	3,665
	100	2P4J	13	2,894		7	2OAH	7	3,659
Maybridge6	8	1FKN	16	4,674	ZINC9	1	2QK5	13	3,741
	15	2FDP	13	4,455		2	2F3E	16	3,721
	30	1M4H	18	4,186		3	2OAH	7	3,676
	123	1TQF	9	3,898		4	1YM2	13	3,626
	238	1YM4	12	3,728		6	2WF1	8	3,509
Maybridge8	12	2FDP	13	4,17	ZINC10	2	2QK5	13	3,781
	27	2G94	15	3,899		17	2VNM	10	3,132
	38	1MH4	18	3,878		19	2VIJ	8	3,114
	51	2IQG	12	3,839		20	2VNN	9	3,104
	75	3DUY	12	3,749		22	2WF4	8	3,101

4.14 Derek

O Derek aponta seus resultados em duas categorias distintas, as “previsões Lhasa” e as “previsões padrão”, sendo esta segunda a mais preocupante, pois tem maior possibilidade de ser uma previsão correta.

Nenhum dos compostos selecionados apresentou resultado nas previsões padrão, somente nas previsões Lhasa conforme descrito adiante para cada composto, nas tabelas 18 a 22.

Tabela 18: Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 1.

Composto	Resultados Derek
F1_Chembridge_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática / amina secundária; nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F1_Chembridge_2	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática / amina secundária; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F1_Chembridge_3	nada
F1_Chembridge_4	nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, alquilalil ou precursor de ácido carboxílico bis-aril
F1_Chembridge_5	nefropatia
F1_Chembridge_6	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática / amina secundária; Dano cromossomal, plausível, Vinil cetona substituída; nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor / amina alfa,beta-insaturada ou precursor
F1_Chembridge_8	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática / amina secundária; Mutagenicidade, plausível, amina ou amida aromática; nefropatia
F1_Chembridge_9	nefropatia (peso molecular acima de 350); Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Fototoxicidade, plausível, Aril sulfonamida
F1_ZINC_1	nada
F1_ZINC_3	nada
F1_ZINC_4	nada
F1_ZINC_5	nefropatia
F1_ZINC_6	nada
F1_ZINC_7	nada
F1_ZINC_8	nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor / amina alfa,beta-insaturada ou precursor
F1_ZINC_9	nada
F1_ZINC_10	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor / amina alfa,beta-insaturada ou precursor
F1_ZINC_11	nada
F1_ZINC_12	nada
F1_ZINC_13	nada
F1_ZINC_14	nefropatia
F1_ZINC_15	nada
F1_ZINC_16	nada

Tabela 19: Resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 2.

composto	Resultados Derek
F2_Chembridge_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Mutagenicidade, plausível, amida / amina aromática; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F2_Chembridge_2	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F2_Chembridge_3	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Mutagenicidade, plausível, amida/amina aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F2_Chembridge_4	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F2_Chembridge_5	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F2_Chembridge_6	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Fotoalergenicidade, plausível, cumarina; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor / amina alfa,beta-insaturada ou precursor
F2_Chembridge_7	nefropatia
F2_Chembridge_8	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F2_Diverset_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática / amina secundária; nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível, hidrazina ou precursor
F2_Diverset_2	nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível, hidrazina ou precursor / Catecol ou precursor
F2_Diverset_3	nefropatia
F2_Diverset_4	nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível, hidrazina ou precursor
F2_Diverset_5	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática / purina/pirimidina substituída; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F2_Diverset_6	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Mutagenicidade, plausível, amida/amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Fotoalergenicidade, plausível, cumarina; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, éster fenílico / Resorcinol ou precursor
F2_Maybridge_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F2_Maybridge_2	Carcinogenicidade, plausível, hidrazina; nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, hidrazina ou precursor
F2_Maybridge_3	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática/ purina/pirimidina substituída; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F2_Maybridge_4	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática/ nitro aromático; Dano cromossomal, equivocável, nitro aromático; Mutagenicidade, plausível, nitro aromático; nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, hidrazina ou precursor

Tabela 20: resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 3.

composto	Resultados Derek
F3_Chembridge_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_Chembridge_2	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_Chembridge_3	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_Chembridge_4	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_Chembridge_5	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F3_Chembridge_6	nefropatia
F3_Chembridge_7	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Mutagenicidade, plausível, amida/amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F3_Diverset_1	nefropatia; Fototoxicidade, plausível, Aril sulfonamida
F3_Diverset_2	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F3_Diverset_3	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F3_Diverset_4	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Mutagenicidade, plausível, amida/amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_Diverset_5	nefropatia; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F3_Diverset_6	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor; Fotoalergenicidade, plausível, cumarina; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, éster fenílico / resorcinol ou precursor
F3_Diverset_7	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Fototoxicidade, plausível, Aril sulfonamida
F3_Diverset_8	nefropatia; Fototoxicidade, plausível, Aril sulfonamida; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F3_Maybridge_1	Carcinogenicidade, plausível, hidrazina; nefropatia; Fototoxicidade, plausível, Aril sulfonamida; Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, hidrazina ou precursor
F3_Maybridge_2	Carcinogenicidade, plausível, purina ou pirimidina substituída; nefropatia; Fototoxicidade, plausível, Aril sulfonamida
F3_Maybridge_3	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_ZINC_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Mutagenicidade, plausível, amida/amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_ZINC_2	nefropatia
F3_ZINC_3	nefropatia
F3_ZINC_4	nefropatia
F3_ZINC_5	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática/amina secundária
F3_ZINC_6	nada
F3_ZINC_7	nefropatia
F3_ZINC_8	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_ZINC_9	nada
F3_ZINC_10	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
F3_ZINC_11	nefropatia

Tabela 21: resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelas triagens virtuais baseadas em estrutura e em farmacóforo.

Composto	Resultados Derek
F1_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F1_2	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática
F1_3	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática
F1_4	nada
F2_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F2_2	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática
F2_3	nada
F2_4	nada
F2_5	Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor
F3_1	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; Metahemoglobinemia, plausível, anilina simples ou precursor
F3_2	nefropatia

Tabela 22: resultados das predições de toxicidade realizadas com o programa Derek para os compostos selecionados pelas triagens virtuais baseadas em estrutura.

Composto	Resultados Derek
Chembridge_1	Nefropatia, plausível em mamíferos; Sensibilidade cutânea, plausível em mamíferos, por causa do fenol
Chembridge_3	Carcinogenicidade, plausível devido à amida aromática
Chembridge_5	Carcinogenicidade, plausível, amina secundária/benzílica; nefropatia; Sensibilidade cutânea, plausível, precursor de fenol
Maybridge2	nefropatia
Maybridge4	Carcinogenicidade, plausível, amina secundária/benzílica; Mutagenicidade, plausível, idem acima; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
Maybridge5	nefropatia
Maybridge6	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; nefropatia; metahemoglobinemia, plausível em mamíferos, anilina simples ou precursor (tem 2); sensibilidade cutânea, plausível em mamíferos, amida alfa-beta insaturada
Maybridge8	Carcinogenicidade, plausível, amida aromática; metahemoglobinemia, plausível em mamíferos, anilina simples ou precursor; nefropatia; Proliferação de peroxissomos, dubitável, beta-O/S- substituído por ácido carboxílico ou precursor
ZINC1	Carcinogenicidade, plausível em mamíferos, amida aromática; nefropatia
ZINC3	Carcinogenicidade, plausível, amina secundária
ZINC4	nada
ZINC5	Fosfolipidose, amina primária C-C amina terciária (ele fala que é só amina); Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, Diamina
ZINC7	Carcinogenicidade, plausível em mamíferos, amida aromática
ZINC8	nada
ZINC9	nada
ZINC10	Fosfolipidose, amina primária C-C amina terciária (ele fala que é só amina); Sensibilização cutânea, plausível em mamíferos, fenol ou precursor

4.15 QikProp

Os resultados do QikProp são acompanhados dos valores de referência para as propriedades calculadas, quando alguma delas está fora destes valores, ela é assinalada pelo programa no arquivo de saída e está descrita nas tabelas 22 a 26, quando não há indicação, o composto se enquadra nas propriedades “drug-like”.

A predição de atividade no SNC é definida entre --, como muito ruim, até ++ como muito boa, com os devidos intermediários -, +/- e +.

A qualidade do modelo de predição (QMP) da absorção oral é indicada como boa, média ou ruim, mas como a maioria dos compostos apresentou boa qualidade, somente os resultados ruim e regular são destacados nas tabelas 23 a 27.

Tabela 23: resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 1.

Composto	Resultados QikProp	Composto	Resultados Qikprop
F1_Chembridge_1	logP: 4.885 logBB: -0.267 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F1_ZINC_5	logP: 3.695 logBB: -0.365 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F1_Chembridge_2	logP: 3.558 logBB: -0.653 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F1_ZINC_6	logP: 2.550 logBB: 0.137 atividade CNS: + absorção oral: 88%
F1_Chembridge_3	druglike: sim, exceto carbon pi SASA, acima logP: 3.381 logBB: -1.029 atividade CNS: -- absorção oral: 96%	F1_ZINC_7	logP: 3.126 logBB: 0.141 atividade CNS: + absorção oral: 95%
F1_Chembridge_4	logP: 2.989 logBB: -0.851 atividade CNS: - absorção oral: 100%	F1_ZINC_8	logP: 3.422 logBB: -0.506 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F1_Chembridge_5	logP: 3.605 logBB: -0.687 atividade CNS: +/- absorção oral: 96%	F1_ZINC_9	logP: 2.251 logBB: -0.860 atividade CNS: - absorção oral: 83%
F1_Chembridge_6	logP: 3.517 logBB: -0.968 atividade CNS: - absorção oral: 100%	F1_ZINC_10	logP: 4.369 logBB: -0.326 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F1_Chembridge_8	logP: 2.078 logBB: -1.029 atividade CNS: -- absorção oral: 87%	F1_ZINC_11	logP: 2.541 logBB: 0.111 atividade CNS: + absorção oral: 91%
F1_Chembridge_9	logP: 1.176 logBB: -0.739 atividade CNS: - absorção oral: 83%	F1_ZINC_12	logP: 2.136 logBB: 0.020 atividade CNS: + absorção oral: 88%
F1_ZINC_1	logP: 3.255 logBB: -0.576 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F1_ZINC_13	logP: 2.407 logBB: 0.346 atividade CNS: + absorção oral: 96%
F1_ZINC_3	logP: 3.058 logBB: -0.319 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F1_ZINC_14	logP: 3.125 logBB: -0.109 atividade CNS: + absorção oral: 93%
F1_ZINC_4	logP: 2.628 logBB: -0.070 atividade CNS: + absorção oral: 91%	F1_ZINC_15	logP: 3.302 logBB: -0.540 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
		F1_ZINC_16	logP: 2.825 logBB: 0.112 atividade CNS: + absorção oral: 94%

Tabela 24: resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 2.

Composto	Resultados Qikprop	Composto	Resultados Qikprop
F2_Chembridge_1	logP: 2.253 logBB: -1.203 atividade CNS: -- absorção oral: 86%	F2_Diverset_3	druglike: carbon pi SASA acima logP: 3.676 logBB: -0.785 atividade CNS: - absorção oral: 100%
F2_Chembridge_2	logP: 2.968 logBB: -0.887 atividade CNS: - absorção oral: 92%	F2_Diverset_4	logP: 3.452 logBB: -1.057 atividade CNS: -- absorção oral: 100%
F2_Chembridge_3	logP: 3.660 logBB: -0.629 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F2_Diverset_5	logP: 4.250 logBB: -0.454 atividade CNS: +/- absorção oral: 100% TGI: baixa
F2_Chembridge_4	logP: 3.172 logBB: -0.834 atividade CNS: - absorção oral: 97%	F2_Diverset_6	logP: 3.436 logBB: -1.450 atividade CNS: -- absorção oral: 93%
F2_Chembridge_5	logP: 3.287 logBB: -0.838 atividade CNS: - absorção oral: 84%	F2_Maybridge_1	druglike: solubilidade aquosa alta logP: 5.739 logBB: -1.030 atividade CNS: -- absorção oral: 100% QMP: baixa
F2_Chembridge_6	logP: 3.608 logBB: -0.779 atividade CNS: - absorção oral: 100%	F2_Maybridge_2	logP: 3.642 logBB: -1.410 atividade CNS: -- absorção oral: 86%
F2_Chembridge_7	logP: 2.821 logBB: -1.013 atividade CNS: -- absorção oral: 90%	F2_Maybridge_3	druglike: solubilidade aquosa alta logP: 5.212 logBB: -0.963 atividade CNS: - absorção oral: 96% QMP: baixa
F2_Chembridge_8	logP: 3.641 logBB: -0.883 atividade CNS: - absorção oral: 88%	F2_Maybridge_4	druglike: carbon pi SASA muito alta; potencial de ionização baixo; log K alto; log P alto; solubilidade aquosa alta logP: 7.028 logBB: -1.588 atividade CNS: -- absorção oral: 87% QMP: baixa
F2_Diverset_1	druglike: solubilidade aquosa alta logP: 5.039 logBB: -0.513 atividade CNS: +/- absorção oral: 100% QMP: baixa		
F2_Diverset_2	druglike: carbon pi SASA acima logP: 4.838 logBB: -1.016 atividade CNS: -- absorção oral: 100%		

Tabela 25: resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados pelo subfarmacóforo 3.

Composto	Resultados Qikprop	Composto	Resultados Qikprop
F3_Chembridge_1	logP: 2.626 logBB: -0.925 atividade CNS: - absorção oral: 88%	F3_Maybridge_1	druglike: weakly polar SASA acima logP: 4.446 logBB: -1.297 atividade CNS: -- absorção oral: 82% QMP: baixa
F3_Chembridge_2	logP: 2.796 logBB: -0.847 atividade CNS: - absorção oral: 91%	F3_Maybridge_2	logP: 1.937 logBB: -1.292 atividade CNS: -- absorção oral: 79%
F3_Chembridge_3	logP: 3.147 logBB: -0.923 atividade CNS: - absorção oral: 100%	F3_Maybridge_3	logP: 3.642 logBB: -1.445 atividade CNS: -- absorção oral: 95%
F3_Chembridge_4	logP: 3.287 logBB: -0.838 atividade CNS: - absorção oral: 84%	F3_ZINC_1	logP: 3.450 logBB: -0.647 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F3_Chembridge_5	logP: 2.603 logBB: -0.869 atividade CNS: - absorção oral: 92%	F3_ZINC_2	logP: 3.152 logBB: 0.059 atividade CNS: + absorção oral: 94%
F3_Chembridge_6	logP: 2.821 logBB: -1.013 atividade CNS: -- absorção oral: 90%	F3_ZINC_3	logP: 2.873 logBB: 0.005 atividade CNS: + absorção oral: 92%
F3_Chembridge_7	logP: 2.294 logBB: -0.168 atividade CNS: + absorção oral: 87%	F3_ZINC_4	logP: 3.132 logBB: -0.055 atividade CNS: + absorção oral: 93%
F3_Diverset_1	logP: 3.097 logBB: -1.071 atividade CNS: -- absorção oral: 96%	F3_ZINC_5	logP: 4.221 logBB: -1.206 atividade CNS: -- absorção oral: 100%
F3_Diverset_2	logP: 2.280 logBB: 0.004 atividade CNS: + absorção oral: 86%	F3_ZINC_6	logP: 3.817 logBB: -0.959 atividade CNS: - absorção oral: 100%
F3_Diverset_3	druglike: log S alto logP: 4.548 logBB: -0.975 atividade CNS: - absorção oral: 100% QMP: baixo	F3_ZINC_7	logP: 3.230 logBB: -0.012 atividade CNS: + absorção oral: 94%
F3_Diverset_4	logP: 2.641 logBB: -1.325 atividade CNS: -- absorção oral: 87%	F3_ZINC_8	logP: 2.611 logBB: -0.890 atividade CNS: - absorção oral: 95%
F3_Diverset_5	logP: 2.708 logBB: -0.374 atividade CNS: + absorção oral: 90%	F3_ZINC_9	logP: 3.907 logBB: -0.672 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F3_Diverset_6	logP: 3.282 logBB: -0.894 atividade CNS: - absorção oral: 100%	F3_ZINC_10	logP: 3.436 logBB: -0.742 atividade CNS: - absorção oral: 100%
F3_Diverset_7	logP: 3.961 logBB: -1.019 atividade CNS: -- absorção oral: 100%	F3_ZINC_11	logP: 3.302 logBB: -0.069 atividade CNS: + absorção oral: 94%
F3_Diverset_8	logP: 3.605 logBB: -0.931 atividade CNS: - absorção oral: 100%		

Tabela 26: resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante e em subfarmacóforo.

Composto	Resultados Qikprop	Composto	Resultados Qikprop
F1_1	logP: 4.138 logBB: -0.023 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F2_3	logP: 2.894 logBB: -0.451 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F1_2	logP: 4.382 logBB: -0.344 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F2_4	logP: 3.017 logBB: -0.419 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F1_3	logP: 2.489 logBB: -0.293 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F2_5	logP: 3.306 logBB: -0.492 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F1_4	logP: 3.674 logBB: -0.391 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F3_1	logP: 4.273 logBB: -0.414 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F2_1	logP: 4.214 logBB: -0.009 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	F3_2	logP: 4.182 logBB: -0.184 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%
F2_2	logP: 4.382 logBB: -0.344 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%		

Tabela 27: resultados da análise do QikProp para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante.

Composto	Resultados Qikprop	Composto	Resultados Qikprop
Chembridge_1	logP: 2.849 logBB: -0.429 atividade CNS: - absorção oral: 100%	Maybridge8	druglike: solubilidade aquosa baixa logP: 5.142 logBB: -0.358 atividade CNS: - absorção oral: 100% QMP: baixa
Chembridge_3	logP: 3.108 logBB: -0.390 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%		
Chembridge_5	logP: 2.990 logBB: -0.487 atividade CNS: +/- absorção oral: 100%	ZINC1	logP: 3.226 logBB: -0.278 atividade CNS: + absorção oral: 94%
Maybridge2	druglike: carbon pi SASA, acima logP: 4.426 logBB: -2.659 atividade CNS: -- absorção oral: 62% QMP: média	ZINC3	logP: 2.099 logBB: 0.253 atividade CNS: + absorção oral: 78% QMP: média
Maybridge4	druglike: Weakly Polar SASA, o dobro do máximo, logS abaixo logP: 5.774 logBB: -0.492 atividade CNS: +/- absorção oral: 100% QMP: baixa	ZINC4	logP: 3.145 logBB: -0.333 atividade CNS: + absorção oral: 94%
Maybridge5	druglike: carbon pi SASA, acima logP: 4.734 logBB: -2.785 atividade CNS: +/- absorção oral: 63% QMP: baixa	ZINC5	logP: 3.450 logBB: 0.008 atividade CNS: + absorção oral: 100%
Maybridge6	druglike: Hydrophilic SASA acima, logP abaixo logP: 2.075 logBB: -3.886 atividade CNS: +/- absorção oral: 33% QMP: baixa	ZINC7	logP: 2.138 logBB: 0.295 atividade CNS: + absorção oral: 79%
		ZINC8	logP: 2.823 logBB: -0.151 atividade CNS: + absorção oral: 91%
		ZINC9	logP: 2.928 logBB: 0.065 atividade CNS: + absorção oral: 95%
		ZINC10	logP: 3.057 logBB: -0.051 atividade CNS: + absorção oral: 95%

Pode-se observar que, embora a maioria dos compostos tenham escolhidos de bases de dados de estruturas capazes de atuar no SNC, boa parte deles tem atividade prevista como regular ou ruim, especialmente os compostos da base Chembridge, Maybridge e Diverset. Isso ocorre porque moléculas grandes (com massa maior que 500 Da) tem dificuldade em permear a BHE e, assim, terem atividade no SNC.

Os resultados também mostram que, na maioria dos casos onde o composto viola as propriedades “drug-like”, o QikProp não é capaz de prever adequadamente sua absorção pelo TGI.

4.16 Omega, EON e ROCS

A geração de confôrmeros com o Omega não apresentou bons resultados, das 100 conformações geradas, nenhuma reproduziu ou aproximou-se de reproduzir a orientação cristalográfica do ligante presente no complexo 2WF1, com o melhor RMSD sendo 1.2679 Å entre estes, e de 1.1458 a 6.2355 Å entre os confôrmeros. Além disso, alguns confôrmeros apresentaram colisões estéricas com a estrutura do sítio catalítico da BACE-1. O mesmo ocorreu com as demais 8 moléculas avaliadas como possíveis referências para a validação deste cálculo.

Apesar deste resultado, estes confôrmeros do complexo de referência foram utilizados para a realização de triagens baseadas em forma molecular, com o ROCS, utilizando as mesmas bases de dados analisadas pelo GOLD e pelo GLIDE. Os resultados das triagens realizados com o ROCS não foram aceitáveis, todos os compostos apresentavam colisões estéricas com o sítio da BACE-1, por isso, não foram feitos cálculos de triagem por similaridade eletrostática com o EON, pois este depende dos resultados do ROCS e os resultados desta metodologia não foram considerados neste trabalho.

4.17 Ensaios Enzimáticos

Os compostos F2_1, ZINC_8, F1_ZINC_7, F3_1, F1_Chembridge_4, F2_Chembridge_7, F2_Diverset_3, F2_Diverset_4, F1_Chembridge_3 e Chembridge_1 foram os escolhidos para os ensaios enzimáticos (figuras 26 e 27).

Figura 26: Estruturas bidimensionais dos compostos F2_1, ZINC_8, F3_1 e F1_ZINC_7.

Figura 27: Estruturas bidimensionais dos compostos F1_Chembridge_4, F2_Diverset_3, F2_Chembridge_7, F2_Chembridge_7, F1_Chembridge_3 e Chembridge_1.

Dos 10 compostos, somente os compostos F2_1, ZINC_8 e F1_ZINC_7 demonstraram atividade neste teste. Os valores aferidos são de Unidades de Fluorescência (UF) e estão representados no eixo Y das figuras 28 a 30 e nas colunas % de atividade das tabelas 28 a 30, o eixo X dos gráficos representa as concentrações dos compostos utilizadas no tubo de reação, em Mol/L. Os valores médios da fluorescência dos controles foram 414.43, para o controle positivo (meio com a BACE-1 e substrato, indicando a máxima atividade possível) e 203.93, para o controle negativo (meio somente com o substrato, indicando a ausência de atividade), o que, normalizados de acordo com o protocolo, tornam-se 210,5 e 0 UFs.

-F2_1

Tabela 28: Resultados dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da BACE-1 realizados com o composto F2_1, mostrando as concentrações utilizadas, os valores de fluorescência aferidos e o percentual de inibição da atividade da BACE-1 que a média destes valores representa.

F2_1			
Concentração	Máximo	Mínimo	Média
Controle positivo	221,4	199,6	210,5
100 nM	251,4	159,0	211,3
1 μ M	141,1	106,6	129,7
10 μ M	208,5	169,6	193,0
100 μ M	132,1	92,7	112,2

Figura 28: Gráfico representando a atividade inibitória do composto F2_1. No eixo X, as concentrações do inibidor utilizadas, no eixo Y, a fluorescência aferida, em UF's e já descontado o valor do controle negativo.

-ZINC_8

Tabela 29: resultados dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da BACE-1 realizados com o composto ZINC_8, mostrando as concentrações utilizadas, os valores de fluorescência aferidos e o percentual de inibição da atividade da BACE-1 que a média destes valores representa.

ZINC_8			
Concentração	Máximo	Mínimo	Média
Controle positivo	221,4	221,4	210,5
100 nM	175,5	96,9	141,9
1 μ M	136,0	67,9	111,6
10 μ M	303,2	224,4	260,4
100 μ M	155,5	76,3	119,6

Figura 29: gráfico representando a atividade inibitória do composto ZINC_8. No eixo X, as concentrações do inibidor utilizadas, no eixo Y, a fluorescência aferida, em UFs e já descontado o valor do controle negativo.

-F1_ZINC_7

Tabela 30: resultados dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da BACE-1 realizados com o composto F1_ZINC_7, mostrando as concentrações utilizadas, os valores de fluorescência aferidos e o percentual de inibição da atividade da BACE-1 que a média destes valores representa.

F1_ZINC_7			
Concentração	Máximo	Mínimo	Média
Controle positivo	221,4	221,4	210,5
100 nM	248,2	51,4	171,6
1 μ M	146,6	116,4	134,2
10 μ M	282,3	52,3	172,2
100 μ M	125,0	105,1	111,7

Figura 30: gráfico representando a atividade inibitória do composto F1_ZINC_7. No eixo X, as concentrações do inibidor utilizadas, no eixo Y, a fluorescência aferida, em UFs e já descontado o valor do controle negativo.

Em todos os ensaios, a aferição em 10 μ M apresentou valores discrepantes em relação aos demais, não sendo, então, considerado um resultado confiável para o cálculo de atividade dos compostos.

5 DISCUSSÃO

John (2011) utilizou uma metodologia semelhante a que foi empregada neste projeto, gerando um padrão farmacofórico à partir de dados da literatura, para realizar a busca de ligantes semelhantes ao farmacóforo em bases de dados. Porém, as estruturas dos compostos

não foram retiradas do PDB, como feito neste trabalho, foi utilizada a geração de confôrmeros para os compostos que não necessariamente estão na conformação em que se ligam à BACE-1, sua seleção se deu pelos índices de atividade inibitória, IC_{50} , obtidos em condições experimentais semelhantes, e o padrão farmacofórico foi utilizado para a triagem virtual e não como critério de seleção dos compostos apontados como melhores por outros programas. O GOLD foi utilizado, mas para prever o modo de ligação dos compostos (*docking*) e não para triagem. Ao final, dois compostos foram indicados como os possíveis melhores inibidores e seus modos de ligação foram detalhados, fornecendo dados interessantes para este projeto.

Xu (2010 a) fez cálculos de triagem virtual utilizando parâmetros muito similares aos utilizados neste trabalho (átomo central e diâmetro da esfera de busca no GOLD), porém com uma versão diferente do GOLD, não utilizando o GLIDE, com outra estrutura da BACE-1, também oriunda do PDB, e com uma base de dados que não foi utilizada aqui. Entretanto, o GOLD foi usado somente para o *docking*, pois a base de dados havia sido previamente avaliada através de similaridade bidimensional frente a um *scaffold* de benzotiazol, que mostrou atividade inibitória de BACE-1 em outra publicação do grupo. Os compostos encontrados foram então avaliados em ensaios *in vitro*, resultando em um interessante estudo de relação estrutura-atividade.

Xu (2010 b) apresentou, em outro artigo, dois inibidores de BACE-1 após triagens na mesma base do artigo anterior, mas desta vez usando uma sistemática de filtragem semelhante a que é utilizada neste trabalho, filtrando 5000 compostos do total da base, depois filtrando os 200 melhores compostos dentre estes 5000, em um cálculo mais complexo e preciso, selecionando 20 destes compostos através de suas propriedades físico-químicas (as favoráveis a ação dos compostos no SNC) e inspeção visual, para então testar sua atividade inibitória de BACE-1 *in vitro* e também toxicidade celular, chegando a dois compostos de estruturas distintas (e também diferentes das mostradas no artigo acima) e atividade *in vitro* abaixo de 10 μ M, sendo um deles aparentemente citotóxico.

Estes três artigos mostram que, metodologias de planejamento de moléculas semelhantes às empregadas neste projeto, são capazes de encontrar inibidores da BACE-1.

Os 86 complexos do PDB selecionados para as orientações iniciais do projeto, indicaram um padrão da disposição das estruturas secundárias dos complexos e também a flexibilidade de algumas regiões da BACE-1, como reportado por CHAKRABORTY 2011, assim como a localização comum de todos os inibidores complexados, dentro do sítio catalítico da enzima, indicando que os inibidores conhecidos são competitivos.

Foi observada a oclusão parcial do sítio catalítico pela alça *flap*, como esperado para uma aspartil protease (GOODSELL, D. O., 2010, GORFE, A. A., 2005), quando na presença de um inibidor realizando interações intermoleculares tanto com a alça quanto com o sítio (GORFE, A. A., 2005), mesmo com grandes variações estruturais entre os inibidores. Pode-se dizer que a alça fecha o sítio na presença de um ligante (processo que faz parte do processo catalítico), pois as estruturas de BACE-1 cristalizadas sem ligantes (códigos PDB: 2ZHR, 2ZHS, 2ZHT, 2ZHU, 2ZHV) mostram a alça “levantada”, deixando o sítio aberto o que facilita a movimentação de substratos, produtos e inibidores.

A validação da utilização de ensaios de triagens virtuais para seleção de compostos, método determinado no início do projeto, demandou a avaliação da capacidade dos programas utilizados em reproduzirem as informações obtidas experimentalmente através de cristalografia de proteínas e difração de raios-x, levando à seleção de um complexo proteína-inibidor para ser utilizado como referência. Como todos os complexos foram alinhados e sobrepostos, o processo de eliminação dos inibidores, de acordo com os critérios descritos no item 3.3 teve boa fluidez.

Inibidores proteicos podem ser bons modelos de estudo experimentais, tanto que o primeiro inibidor de BACE-1 desenvolvido é proteico (código PDB: 1FKN), mas seu uso *in vivo* é pouco prático devido à abundância de esterases (enzimas que degradam proteínas) no corpo humano e, à dificuldade que estes têm em permear a BHE para bloquear a BACE-1, seja por seu peso molecular ou polaridade altos, por isso, estes inibidores foram os primeiros a serem descartados dentre os 86.

Prosseguindo o processo de seleção, os inibidores com estruturas muito grandes, os que se projetavam para fora do sítio e os com estruturas muito diferentes dos demais foram removidos, pois moléculas grandes têm baixa penetração pela BHE e menor probabilidade de ligarem-se da forma prevista ao sítio da proteína. Moléculas que possuem partes não ligadas à enzima tendem a ser removidas do sítio pela solvatação de ambas, e uma estrutura muito diferente do conjunto de moléculas tem menor chance de indicar as características químicas necessárias para que uma molécula seja inibidora da BACE-1.

Em uma terceira etapa, foram removidos os complexos cujos inibidores eram muito pequenos, pouco flexíveis e os com estruturas cíclicas. Embora estruturas pequenas sejam bastante propensas a atravessar a BHE e possuam menor probabilidade de serem tóxicas, a especificidade destas é baixa e elas podem causar efeitos adversos por agirem em outros receptores e enzimas por todo o organismo. Para todos estes casos, a baixa flexibilidade é um revés na tentativa de reprodução da orientação cristalográfica, dado que os programas de

triagem trabalham principalmente com a flexibilidade das moléculas e, uma estrutura rígida tem maior probabilidade de gerar um resultado falso positivo ou falso negativo, além de reduzir a exploração do sítio catalítico pela molécula.

Restaram assim, as 9 estruturas descritas no item 4.2, dentre elas foi escolhido o complexo de código 2WF1 para a utilização nas triagens virtuais, por ter o menor RMSD e avaliado pelo inibidor com o melhor equilíbrio entre exploração do sítio, tamanho, flexibilidade e características químicas apropriadas para realização de interações intermoleculares.

Um critério de escolha mais apropriado dos inibidores de referência seria, a atividade *in vitro* aferida em ensaios enzimáticos, mas, para a BACE-1, não existiam à época tais dados para a maioria dos 86 inibidores depositados no PDB, e, dentre os que dispunham de tais dados, existem incoerências entre os resultados, embora vários deles indiquem alta potência, como ocorre com o próprio inibidor do complexo 2WF1 e o inibidor do complexo 2VNN, com IC₅₀ reportado de 10 nM.

Escolhido o complexo de referência, foram adicionados hidrogênios à estrutura da BACE-1, dado que não faz parte do arquivo .pdb, e os hidrogênios ligados a resíduos do sítio catalítico foram analisados quanto a sua orientação, já que nem sempre este posicionamento é o mais adequado para a realização de interações intermoleculares, e, como os programas de triagem virtual ainda não consideram a flexibilidade da proteína, devido ao alto custo computacional envolvido, este ajuste fino pode alterar o resultado de um cálculo. Foram reorientados os hidrogênios das hidroxilas das Treoninas 133 e 292.

Foi avaliada também a qualidade do complexo como modelo e base para os cálculos de triagem virtual, assim como a viabilidade dos programas GOLD e GLIDE para a realização destes cálculos. Para isso, avaliou-se a capacidade dos dois programas em reproduzir a conformação cristalográfica do inibidor do complexo 2WF1 dentro do sítio catalítico da BACE-1 do mesmo complexo, em dez tentativas.

Avaliaram-se diferentes pontos centrais dos cálculos e amplitude do campo de busca. Como ponto central, avaliaram-se três átomos diferentes (Oxigênio Delta 2 do Aspartato 93, Oxigênio da Glicina 95, e Oxigênio Delta 2 do Aspartato 289), todos localizados na região central do sítio, para assim abranger a maior parte possível deste. Obteve-se: com o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 93, de 10 soluções gerados, 4 tiveram a mesma orientação da conformação cristalográfica, com o Oxigênio da Glicina 95, nenhuma solução, e com o Oxigênio Delta 2 do Aspartato 289, 8 soluções, todas com esfera de busca com raio de 10,5Å no GOLD.

O campo de busca foi avaliado entre 10 e 15Å, variando de 0,5 em 0,5Å, sendo 13,5Å o diâmetro da esfera escolhido para ser usado com o GOLD e 14Å para as arestas da caixa interna do GLIDE (o programa não aceitou valores ímpares ou fracionados), ambas visando abranger todo o sítio catalítico da BACE-1, inclusive a alça *flap*, sem expandir muito o campo de busca. Novamente, geraram-se 10 soluções do inibidor referência em cada cálculo e a melhor reprodução (ou aproximação) da conformação cristalográfica foi o parâmetro de avaliação. Entre 12,5 e 15Å, não houve diferença significativa entre os resultados.

Com o complexo de referência validado, criou-se o *Scaffold* à partir da estrutura do inibidor do complexo 2WF1, analisando as características em comum deste em relação aos outros oito inibidores dos complexos 2VJ7, 2VNM, 2WF1, 2WF2, 2WF3, 2WF0, 2VNN, 2WEZ, 2VIJ, definidos como melhores pelo critério de seleção descrito no item 3.4.2.3. Este *scaffold* foi utilizado posteriormente para realização de parte das triagens virtuais com o GOLD.

Por se tratarem das mesmas bases de dados, e terem sido utilizadas configurações semelhantes nos parâmetros dos cálculos de triagem baseada em estrutura, esperava-se que houvesse algum resultado coincidente entre as buscas feitas com GOLD e GLIDE, fato que não ocorreu, nem mesmo entre os modos do GOLD (sem nenhum tendenciamento e tendenciado ao *scaffold*). Também não houve resultados coincidentes com as demais técnicas de triagem virtual utilizadas. Por um lado, perde-se um composto com alta afinidade teórica pela BACE-1, mas, por outro, se ganha maior diversidade de estruturas químicas estudadas, ponto benéfico para o objetivo do projeto, no qual um protótipo com boa atividade inibitória pode dar origem a toda uma família de estruturas.

Esta mesma diversidade estrutural também foi responsável por desqualificar a filtragem por similaridade estrutural, feita com o índice de Tanimoto, onde não se conseguiu alcançar nem o valor mínimo, de 70% de similaridade em relação ao *scaffold*.

O primeiro farmacóforo gerado visou mesclar as técnicas de planejamento racional de fármacos baseado em estrutura e em ligante, não é tão refinado quanto o segundo, pois foi o único resultado que se conseguiu obter na época. Tentaram-se várias configurações do programa, uso de parte dos 9 melhores inibidores e BACE-1 como dados de referência para a criação do farmacóforo e, sem nenhuma explicação (o programa apenas dizia que o cálculo havia parado por causa de um erro, sem especificar qual era o erro), o Discovery Studio não criava o farmacóforo, a reinstalação do programa e uso de outra máquina não resolveram o problema. O segundo farmacóforo foi gerado em um terceiro computador, com uma versão

diferente do sistema operacional, sendo esta a única explicação encontrada para o cálculo ter dado certo nesta tentativa.

Após a filtragem visual de 600 compostos pelo farmacóforo, 28 foram considerados similares a todas as características do mesmo e, conseqüentemente, aptos para as etapas subsequentes de análise. Notou-se que estes compostos vieram, em sua maioria, dos resultados do GLIDE, seguidos pelo GOLD com *Scaffold* e pelo GOLD sem nenhum tipo de restrição. Dada a maior elaboração do método de busca do GLIDE em relação ao GOLD, assim como a busca por similaridade ao *scaffold*, que limita os resultados a um determinado conjunto de características químicas, era esperada alguma tendência a melhores resultados no GLIDE, em relação ao GOLD, mas não nesta proporção já que os dois programas são cotados com eficiência próxima, levemente melhor no GLIDE (GARCÍA-SOSA, A. T., 1020; KRÜGER, D. M., 2010; CROSS, J. B., 2009; CHENG, T., 2009) e as configurações utilizadas foram similares. Os resultados destes artigos consistem na média de acertos e erros que os programas apresentam, sendo que, às vezes, o GOLD é melhor que o GLIDE, em outras, ambos são equiparáveis e em outros casos um deles ou ambos são ruins para um determinado alvo, o que se leva a crer que, para triagens virtuais com a BACE-1, o GLIDE é o programa mais adequado. Este farmacóforo não foi utilizado para o refinamento dos resultados das triagens virtuais baseadas em farmacóforo.

O segundo farmacóforo foi gerado com as estruturas dos nove melhores inibidores da BACE-1, de acordo com os critérios descritos no item 3.4.2.3, o que, aliado à permissão para avaliação de mais características moleculares que o primeiro, proporcionou um farmacóforo mais complexo, completo e preciso que o anterior. Como o número de características resultantes é maior, achou-se prudente desmembrar este farmacóforo para não se ter uma busca muito restrita às características moleculares dos inibidores conhecidos, o que limitaria desnecessariamente as triagens e poderia reduzir a diversidade dos resultados.

Neste novo farmacóforo, nota-se que a característica de anéis aromáticos está posicionada em uma região sem resíduos aromáticos no entorno, ponto confirmado pela análise do MIF de carbonos aromáticos e, como o farmacóforo não levou em consideração nenhuma informação do sítio catalítico, este resultado é aceitável.

O segundo farmacóforo, dividido, foi utilizado para a realização de triagens virtuais baseadas em farmacóforo, com um terceiro programa, de forma a mesclar-se as estratégias baseadas em estrutura e em ligante, para ter maior diversidade de resultados e diminuïrem-se as interferências causadas por deficiências de cada método/programa. Nestas triagens, nota-se que não foram todos os casos em que houve complementariedade com todas as características

de cada subfarmacóforo e em alguns deles, não foram gerados resultados, indicando que a simplificação do farmacóforo gerado foi uma decisão acertada.

Nota-se também que, a maioria dos compostos aprovados pelos métodos de filtragem, são da base de dados CNS ZINC, dado compreensível devido ao tamanho várias vezes maior dela em relação às demais bases, mas não se descarta também o fato desta base não ter apresentado nenhum problema durante as triagens, diferentemente das outras três bases, que demandaram correções antes da realização das triagens virtuais.

Devido a estes bons resultados com a CNS ZINC, esta base foi escolhida para se experimentar uma estratégia de triagem mista, onde se utilizou o GLIDE, programa com os melhores resultados de triagem virtual baseada em ligante neste trabalho, para gerar as conformações, o posicionamento e avaliar a afinidade dos compostos ao sítio catalítico da BACE-1, para, em seguida, utilizar estes resultados em triagens virtuais baseadas em farmacóforo de forma rígida, isto é, sem que fosse permitido ao Discovery Studio alterar a conformação das estruturas.

Embora o número de compostos selecionados por este método tenha sido menor, os resultados foram melhores do que os obtidos com os demais métodos, quando se avalia o posicionamento e modo de ligação dos compostos.

Todos os resultados das triagens virtuais foram submetidos, de forma visual, à avaliação da proximidade de grupos complementares a determinados resíduos da BACE-1, permitindo assim que ocorram interações intermoleculares diretas (sem a presença de moléculas de água), o que aumenta a capacidade do composto interagir com resíduos da alça *flap* e com os aspartatos catalíticos, e assim diminui-se a possibilidade de entrada do APP e também se bloqueia o mecanismo de ação da enzima, respectivamente (GORFE, A. A., 2005). Uma boa exploração do sítio catalítico e um maior número de interações também foram favoráveis à aprovação do composto nesta análise, mas estas características geralmente dependem do tamanho da estrutura e de suas ramificações, o que, em geral, tem como reverses, uma menor permeabilidade à BHE e maior toxicidade, critérios que foram avaliados posteriormente.

Notou-se que apenas 7 compostos possuíam grupos complementares posicionados de forma que estes pudessem interagir com os dois aspartatos simultaneamente, mas em contrapartida, 80 deles interagem com dois ou mais resíduos da alça *flap*, indicando então que a maioria deles deverá ligar-se e manter-se ligado de forma estável ao sítio da BACE-1, ponto que foi avaliado posteriormente pelas simulações de dinâmica molecular e este parâmetro também foi comparado aos MIFs para complementar as informações.

Após a avaliação das interações que o composto realiza com o sítio catalítico, os compostos foram avaliados quanto a sua complementariedade em relação aos MIFs, que consiste em uma análise semelhante à anterior, mas com critério eletrostático e quantitativo, pois se pode estimar a força da afinidade pelo tipo de grupo de prova mapeado, e quanto maior for a redução de energia livre ocasionada pela realização de interações intermoleculares, maior é a probabilidade de que esta de fato ocorra e, de que seja forte o suficiente para manter o composto dentro do sítio catalítico, bloqueando a ação da enzima. A visualização dos resultados é feita com o maior valor possível (considerando-se que este é negativo), para que apenas os *sweetspots* sejam analisados, até porque, com valores mais baixos, visualizam-se grandes bolsões, tidos como favoráveis à presença do grupo de prova analisado, mas que de fato são regiões inespecíficas e comuns entre mais de um dos grupos analisados, inclusive com grupos antônimos como o de carbonos aromáticos e o de nitrogênios de amina.

Apesar destes dois métodos de análise da estabilidade e modo de ligação teóricos do composto serem usuais, e bons indicativos desta característica essencial no planejamento de fármacos, deve-se lembrar de que as estruturas moleculares não são estáticas, fazendo com que lhes falte exatidão. Mesmo assim, estes métodos de filtragem foram considerados com peso dobrado em relação aos demais, por serem métodos que fornecem informações mais próximas da realidade do que os demais, isso quando se assume que a pose gerada pelos programas de triagem virtual é muito similar ao real modo de ligação destas estruturas ao sítio da enzima.

O PharmMapper indicou que a maioria dos compostos selecionados possui semelhança regular a boa em relação aos inibidores da BACE-1 conhecidos e que integram a base de dados do servidor. Apresentando um bom nível de características em comum (média de 12,7), pontuação razoável (média de 3,3) e posicionamento da ocorrência de similaridade a um inibidor conhecido regular (média 40), todos com variações entre resultados muito bons, como os dos compostos F2_3, F2_4 e F2_5 a resultados fracos, como os dos compostos F1_ZINC_15 e F3_Diverset_5, a análise do PharmMapper indica que alguns compostos deverão ligar-se bem ao sítio da BACE-1 devido à sua relativa semelhança a inibidores conhecidos da enzima, enquanto a maioria deles pode, teoricamente, ligar-se com maior afinidade a outras proteínas do organismo e assim desencadear reações adversas nos pacientes.

Os compostos foram avaliados quanto à sua toxicidade teórica, sendo que 19 deles não apresentaram nenhum indício de toxicidade, 55 foram indicados como potenciais causadores

de nefropatia, devido a seu peso molecular ser maior que 350 Daltons, 51 foram indicados com potencial carcinogênico por terem em sua estrutura uma ou mais amidas aromáticas/aminas secundárias/hidrazina ou uma base nitrogenada substituída, 25 foram indicados como potenciais causadores de proliferação de peroxissomos, por terem um ácido carboxílico com carbono beta substituído por um átomo de oxigênio ou enxofre, ou um precursor deste grupo (em 24 dos casos, um deles foi causado pela presença de um alquilalil ou precursor de ácido carboxílico bisaril), 24 foram indicados como potenciais causadores de Metahemoglobinemia, por terem em sua estrutura uma anilina simples ou precursor da mesma, 20 foram indicados como possíveis causadores de sensibilização cutânea por terem em sua estrutura um grupo fenol ou precursor (15), um grupo amina alfa, beta-insaturada ou precursor (6), um grupo éster fenílico, resorcinol ou precursor (2), um grupo hidrazina, diamina ou precursor (8), 9 foram indicados com potencial mutagênico, por terem em sua estrutura uma ou mais amidas aromáticas, 9 foram indicados com potencial fototóxico, por terem em sua estrutura uma aril sulfonamida (6) ou uma cumarina (3), 2 foram indicados como potenciais causadores de dano cromossomal, por terem um ou mais grupos nitro em sua estrutura, e 2 foram indicados como potenciais causadores de fosfolipidose, por terem uma ou mais aminas primárias ou terciárias em sua estrutura.

Este resultado parece ser contrastante em relação aos obtidos pela similaridade estrutural, que indicaram baixa similaridade entre as estruturas, mas vale ressaltar que os toxicóforos não são encontrados na mesma posição e em todas as estruturas como, por exemplo, o potencial carcinogênico devido à presença de amidas aromáticas, aminas secundárias, hidrazina ou uma base nitrogenada substituída, onde as aminas aparecem até mais de uma vez no mesmo composto e nem sempre no mesmo lugar.

Os resultados de toxicidade não são excludentes já que todos são suposições, casos plausíveis, dubitáveis, e não toxicidade certa, além de mais de um toxicóforo indicado existir em fármacos comerciais, como o grupo nitro, presente no Isordil ou o alto peso molecular, como a Azitromicina, e também há a limitação do programa às informações presentes em sua base de dados, que está muito longe de prever o funcionamento do complexo sistema metabólico de um ser vivo. Além disso, grupos toxicofóricos podem ser substituídos ou modificados quimicamente para reduzir ou eliminar tal efeito, por isso, estes dados só serão utilizados para se definir qual composto é mais promissor como candidato a fármaco.

A predição de propriedades físico-químicas e ADME, realizada com o QikProp é mais um critério não excludente no momento, mas um bom indicativo de compostos com maior

viabilidade terapêutica. Pode-se observar que a definição de compostos com atividade no SNC não é um padrão universal, dado que 56% dos compostos oriundos da base CNS Chembridge foi indicada pelo QikProp com baixa atividade no SNC, e 45% dos compostos da base CNS ZINC foram indicados com atividade regular, mas nenhum composto foi indicado com baixa absorção oral, o que é muito bem-vindo para facilitar a adesão ao tratamento pelos pacientes.

Observou-se também o baixo número de violações das propriedades “*drug-like*” (propriedades físico-químicas comuns a 95% dos fármacos existentes), a reduzida capacidade do programa em prever a absorção oral quando há alguma violação das propriedades “*drug-like*” (75% dos casos), e que os compostos oriundos das triagens virtuais mesclando a técnica baseada em estrutura e a baseada em farmacóforo são todos indicados com atividade regular no SNC.

Os compostos foram selecionados para compra na seguinte ordem: Chembridge_1, F1_ZINC_7, F2_4, F2_5, F1_Chembridge_3, F3_ZINC_7, ZINC_8, F2_Diverset_4, F3_ZINC_3, F1_4, F3_ZINC_4, ZINC_7, F1_Chembridge_2, F1_ZINC_4, F2_Diverset_3, F3_1, F3_2, F3_Maybridge_1, Maybridge_6, ZINC_5, F1_2, F2_Chembridge_7, ZINC_4, F1_ZINC_11, F2_1, F2_3, F3_ZINC_8, F1_Chembridge_4, F1_ZINC_12, F1_ZINC_15, F3_ZINC_9, mas destes 31, não foram encontrados para compra os compostos F3_ZINC_7, F3_ZINC_3, F1_4, F3_ZINC_4, ZINC_7, F1_ZINC_4, F3_2, ZINC_5, F1_2, ZINC_4, F1_ZINC_11, F3_ZINC_8, F1_ZINC_15, F3_ZINC_9, os demais possuíam preços elevados, por isso não foram adquiridos.

Os ensaios enzimáticos mostraram que, dos dez compostos comprados, três conseguem inibir a atividade da BACE-1 *in vitro*, e o fazem de forma satisfatória nas concentrações de 100 μ M. Os critérios de seleção dos compostos foram as indicações dos melhores resultados, no contexto geral, das análises do PharmMapper, QikProp, Derek, MIFs e interações com o sítio da BACE-1, sendo dada maior ênfase para os resultados destes dois últimos critérios.

Os três compostos sobrepõem-se aos MIFs de Nitrogênios, quando seu contorno é -10.5, ao MIF de Carbonos Aromáticos, quando seu contorno é -3.2, e ao MIF Oxigênio de carbonila, a -6 (apenas 7 compostos foram complementares ao MIF de oxigênio de água), indicando que estes compostos possuem estruturas com certo grau de anfifilicidade, o que é interessante para um fármaco com efeito no SNC e administrado por via oral, ponto que é corroborado pelas predições do QikProp, indicando os três como bons nestes dois quesitos. Esta sobreposição aos diferentes MIFs indica que os compostos exploram resíduos do sítio

catalítico da BACE-1 com características diversificadas, o que é corroborado pela análise das interações que cada composto realiza com o sítio, e é um ponto muito importante para alguns casos de Alzheimer com bases genéticas, devido a mutações pontuais no gene codificador da BACE-1 serem responsáveis pela doença.

Todos os compostos comprados aparentam interagir diretamente com um dos aspartatos catalíticos, com a cadeia lateral aromática da Tirosina 132 e com a cadeia principal da Glutamina 134 e/ou com a cadeia principal da Treonina 133, mas somente os três ativos possuem um valor de logP equilibrado, indicando que eles não são nem muito lipossolúveis, o que reduz a solubilização destes compostos ao meio do ensaio, e nem muito hidrossolúveis, o que dificulta o rompimento da capa de solvatação destes compostos para que eles possam adentrar ao sítio da BACE-1, este segundo caso um indicativo da causa da inatividade dos sete compostos.

Embora seja desejável a interação com os dois aspartatos catalíticos, com os resíduos da alça *flap* e com o maior número possível de outros resíduos, compostos muito grandes tendem a ser mais difíceis de serem sintetizados, ter menor absorção oral, maior dificuldade em penetrar a BHE, menor estabilidade metabólica, maior toxicidade e até atividade mais baixa, pois a penetração no sítio alvo é menos favorável devido à capa de solvatação maior e a estrutura tem maiores chances de sofrer alterações conformacionais que dificultam sua ligação de modo adequado ao sítio, por isso o peso molecular dos compostos testados variou entre 300 e 410 Da.

Observa-se que os três compostos foram selecionados, inicialmente, pelo programa GLIDE e são da subcoleção CNS da base ZINC, sendo também cada um originado de um dos três métodos de triagem virtual abordados. Embora nenhum dos compostos tenha apresentado atividade inibitória em concentrações na faixa nanomolar, considera-se muito bom o resultado obtido, pois os critérios de seleção levaram a uma alta taxa de sucesso na inibição da BACE-1 pelos compostos selecionados para compra.

O resultado negativo dos sete compostos, assim como a variação da inibição da BACE-1 aferida nos ensaios para os outros três, também podem ser explicados devido às diferenças no método de análise utilizado e o indicado pelo protocolo CS0010, onde os ensaios deveriam ter sido feitos em um fluorímetro que faz leitura em placas ao invés de cubetas (consequentemente, a diluição das amostras em água para a leitura, não prevista no protocolo), pelo uso de DMSO como solvente de parte da reação, por fatores ambientais não descritos no protocolo, e pela alta sensibilidade inerente da fluorimetria.

Considerando-se os resultados gerais, pode-se esperar que os compostos F1_ZINC_4 e ZINC_4 também inibam a BACE-1, pois tem boa pontuação no PharmMapper, são indicados com boa atividade no SNC, interagem com pelo menos dois resíduos da alça *flap* e são complementares a três tipos de MIFs.

6 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a metodologia *in silico* adotada neste trabalho é capaz de encontrar inibidores para a BACE-1 e assim, expandir tanto o conhecimento sobre esta proteína e sua via metabólica na patologia do Mal de Alzheimer, quanto indicar um novo caminho no desenvolvimento de um tratamento efetivo pra a doença.

Como perspectivas resultantes, tem-se os três compostos com atividade detectada, assim como os outros dois indicados com bom potencial para também serem ativos, iniciando cinco novas frentes de desenvolvimento de inibidores de BACE-1, onde experimentos podem ser realizados para avaliar a afinidade e o comportamento de cada um deles no sítio da BACE-1, assim como modificações estruturais podem ser exploradas para alterar suas propriedades farmacocinéticas e/ou toxicológicas, encaminhando-os para os testes clínicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCELRYS SOFTWARE INC., Discovery Studio Viewer Pro, Release 6, San Diego, 2009.

ACCELRYS SOFTWARE INC., Tsar, Release 3.3, San Diego, 2005

ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallographica. Section B, structural science**, [SI], v. 58 p. 380-388, 2002.

ALZHEIMERS DISEASE. Disponível em:
<http://www.alz.org/alzheimers_disease_17117.asp>. Acesso em 08 junho 2010.

ASAI, M. et al. Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- β peptide for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Research**, [SI], v. 88, p. 3588–3597, 2010.

BARROW, J. C. et al. Discovery and X-ray crystallographic analysis of a spiropiperidine iminohydantoin inhibitor of β -secretase. **Journal of Medicine Chemistry**, [SI], v. 51, n. 20, p. 6259-6262, 2008.

BERCHTOLD, N. C.; COTMAN, C. W. Evolution in the Conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-roman period to the 1960s. **Neurobiology of Aging**, [SI], v. 19, n. 3, p. 173-189, 1998.

BERMAN, H.M.; et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [SI], v. 28, p. 235-242, 2000.

BLOCH, L. et al. Klotho is a substrate for α -, β - and γ -secretase. **Febs Letters**, [SI], v. 583, p. 3221–3224, 2009.

BROOKMEYER, R.; GRAY, S.; KAWAS, C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the Public Health Impact of delaying disease onset. **American Journal of Public Health**, [SI], v. 88, n.9, p. 1337-1342. 1998.

BUTINA, D. Unsupervised data base Clustering based on daylight's fingerprint and Tanimoto Similarity: A fast and automated way to cluster small and large data sets. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, [SI], v. 39, p.747-750, 1999.

CAI, H. et al. BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. **Nature Neuroscience**, [SI], v. 4, n.3, p. 233–234, março. 2001.

CHAKRABORTY, S.; SANJAY KUMAR, S.; BASU, S. Conformational transition in the substrate binding domain of β -secretase exploited by NMA and its implication in inhibitor recognition: BACE1–myricetin a case study. **Neurochemistry International**, [SI], v. 58, p. 914–923, 2011.

CHENG, T. et al. Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [SI], v. 49, n.4, p.1079–1093, 2009.

CITRON, M. β -secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease-promise and challenge. **Trends in Pharmacological Sciences**, [SI], v. 25, n. 2, p. 92-97, fev. 2004.

CLINICALTRIALS.GOV. Disponível em:

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results/browse?term=alzheimer&brwse=intr_cat_Infl>.

Acesso em: 08 junho 2010.

COLE, S. L.; VASSAR, R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE-1. **Molecular Neurodegeneration**, [SI], v. 2, p. 1-25, 2007.

CROSS, J. B. et al. Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [SI], v. 49, n.6, p. 1455-1474, 2009.

CS0010, β -Secretase (BACE1) Activity Detection Kit (Fluorescent), **Sigma-Aldrich**.

DEANE, R.; SAGARE, A.; ZLOKOVIC, B.; The Role of the Cell Surface LRP and Soluble LRP in Blood-Brain Barrier A β Clearance in Alzheimer's Disease. **Current Phar Des**, [SI], v. 14, p. 1601-1605, 2008.

DE FERRARI, G. V. et al. A structural motif of Acetylcholinesterase that promotes Amyloid β -peptide fibril formation. **Biochemistry**, [SI], v. 40, n. 35, p. 10447-10457, 2001.

DISCOVERY STUDIO, version 2.5, Accelrys, CA, USA, 2008.

DVIR, H. et al. X-ray structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with (+)- Huperzine A and (-)- Huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement. **Biochemistry**, [SI], v. 41, n. 35, p. 10810-10816, 2002.

EDWARDS, P. D. et al. Application of fragment-based lead generation to the discovery of novel, cyclic amidine β -secretase inhibitors with nanomolar potency, cellular activity, and high ligand efficiency. **Journal of Medicinal Chemistry**, [SI], v. 50, n. 24, p. 5912-5925, 2007.

ELVANG, A. B. et al. Differential effects of γ -secretase and BACE1 inhibition on brain A β levels in vitro and in vivo. **Journal of Neurochemistry**, [SI], v. 110, p. 1377-1387, 2009.

ERIKSEN, J. L.; JANUS, C. G. Plaques, Tangles, and Memory Loss in Mouse Models of Neurodegeneration. **Behav Genet**, [SI], v. 37, p. 79-100, out. 2007.

FAGHIHI, M. A. et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase. **Nature Medicine**, [SI], v. 14, n. 7, p. 723-730, Jul. 2008.

FLIGHT, M. H. Inhibiting β -secretase where it matters. **Nature Reviews Drug Discovery**, [SI], v. 7, jun. 2008.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista Psiquiatria Clínica**. [SI], v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

FUJIMOTO, T. et al. In silico multi-filter screening approaches for developing novel β -secretase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [SI] v.18, p. 2771-2775, 2008.

GARCÍA-SOSA, A. T.; HETÉNYI, C.; MARAN, U. Drug efficiency indices for improvement of molecular docking scoring functions. **Journal of Computational Chemistry**, [SI], v. 31, n.1, p.174–184, 2010.

GHOSH, A. K.; GEMMA, S.; TANG, J. β -secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, [SI], v. 5, p.399–408; Jul. 2008.

GHOSH, A. K.; BRINDISI, M.; TANG, J.; Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, [SI], v. 120, p. 71-83, 2012.

GLIDE, version 5.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, [SI], v. 28, n. 7, p. 849-857, 1985.

GOODSELL, D. Beta Secretase: Molecule of the Month. Jul, 2009. Disponível em: <http://www.pdb.org/pdb/statistic.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb115_1.html> Acesso em: 08 junho 2010.

GORFE, A. A.; CAFLISCH, A. Functional Plasticity in the substrate binding site of β -secretase. **Structure**, [SI], v. 13, p. 1487–1498, Out. 2005.

GUTIERREZ, L. J.; ENRIZ, R. D.; BALDONI, H. A. Structural and Thermodynamic Characteristics of the Exosite Binding Pocket on the Human BACE1: A Molecular Modeling Approach. **The Journal of Physical Chemistry A**, [SI], v. 114, n. 37, p. 10261–10269, 2010.

GUEX, N.; PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, [SI], v. 18, p. 2714-2723, 1997.

GWON, A-R. et al. Selenium attenuates A β production and A β -induced neuronal death. **Neuroscience Letters**, [SI], v. 469, p. 391–395, 2010.

HAMMER, N. D.; WANG, X.; MCGUFFIE, B. A.; CHAPMAN, M. R. Amyloids: friends or foe? **Journal of Alzheimer's Disease**, [SI], v. 13, p. 407–419, 2008.

HONG, L. et al. Crystal Structure of memapsin 2 (β -secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. **Biochemistry**, [SI], v. 41, n. 36, p. 10963-10967, 2002.

HOOK, V. Y. H.; KINDY, M.; HOOK, G. Inhibitors of Cathepsin B improve Memory and reduce β -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, β -secretase site of the amyloid precursor protein. **The Journal of Biological Chemistry**, [SI], v. 283, n.12, p. 7745-7753, 2008.

HU, X. et al. Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. **The FASEB Journal**, [SI], v. 22, p. 2970-2980, Ago. 2008.

IMBIMBO, B. P. Therapeutic Potential of γ -Secretase Inhibitors and Modulators. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [SI], v. 8, p. 54-61, 2008.

Insight II User Guide, version 2005, Accelrys, CA, USA, 2005.

IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. ZINC-a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modelling**, [SI], v.45, p. 177-182, 2005.

JAN, A. et al. A β 42 Neurotoxicity Is Mediated by Ongoing Nucleated Polymerization Process Rather than by Discrete A β 42 Species. **The Journal of Biological Chemistry**, [SI], v. 286, n. 10, p. 8585–8596, March, 2011.

JENNINGS, L. D. et al. Acylguanidine inhibitors of β -secretase: optimization of the pyrrole ring substituents extending into the S'₁ substrate binding pocket. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [SI], v. 18, p. 767-771, 2008.

JIN M. et al. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. **PNAS**, [SI], v. 108, n. 14, p. 5819–5824, Abr. 2011.

JOHN, S. et al. Potent bace-1 inhibitor design using pharmacophore modeling, in silico screening and molecular docking studies. **BMC Bioinformatics**, [SI], v. 12, p.1-12, 2011.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of a desolvation. **Journal of Molecular Biology**, [SI], v. 245, p. 43-53, 1995.

KASTENHOLZ, M. A. et al. GRID/CPCA: a new computational tool to design selective ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, [SI], v. 43, n. 16, p. 3033-3044, 2000.

KEISER, M. J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature Biotechnology**, [SI], v. 25, n. 2, p. 197-206, Fev. 2007.

KLAVER, D. W. et al. Is BACE1 a suitable therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease? Current strategies and future directions. **Biological Chemistry**, [SI], v. 391, p. 849–859, Aug. 2010.

KOBAYASHI, D. et al. BACE1 gene deletion: impact on a behavioral function in a model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, [SI], v. 29, p. 861–873, 2008.

KRÜGER, D. M.; DR EVERS, A. Comparison of Structure- and Ligand-Based Virtual Screening Protocols Considering Hit List Complementarity and Enrichment Factors. **ChemMedChem**, [SI], v. 5, p. 148 – 158, 2010.

LAGUNIN, A. et al. Pass: prediction of activity spectra for biologically active substances. **Bioinformatics Applications Note**, [SI], v. 16, n. 8, p. 747-748, 2000.

LANGER, T.; HOFFMAN, D. **Pharmacophores and Pharmacophore Searches**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006

LANZ, T. A.; FICI, G. J.; MERCHANT, K. M. Lack of specific Amyloid- β (1-42) suppression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in young, plaque-free Tg2576 mice and Guinea Pig neuronal cultures. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [SI], v. 312, n. 1, p. 399-406, 2005.

LIU, W. W. et al. Elevated Platelet β -Secretase Activity in Mild Cognitive Impairment. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, [SI], v. 24, p. 464-468, 2007.

LIU, T.; LIN, Y.; WEN, X.; JORRISEN, R. N.; GILSON, M. K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic Acids Research** v. 35, p. 198-201, 2007.

LIU, X. et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. **Nucleic Acids Research**, [SI], v. 38, p. 609-614, 2010.

LÓPEZ-RAMOS, M.; PERRUCCIO, F. HPPD: Ligand- and Target-Based Virtual Screening on a Herbicide Target. **Journal of Chemical Information and Modelling**, [SI], v. 50, p. 801-814, 2010.

MEYER, E. P. Altered morphology and 3D architecture of brain vasculatures in a mouse model for Alzheimer's disease. **PNAS**, [SI], v. 105, n. 9, p. 3587-3592, 2008.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo. Ed. Livraria da física, 1^a ed., 2007.

NAYLOR, E., et al. Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. **Nature Chemical Biology**, [SI], v. 5, n.4, p. 220-226, 2009.

NISSINK, J. W. M. et al. A new test set for validating predictions of a protein-ligand interaction. **Proteins: structure, function, and genetics**, [SI], v. 49, p. 457-471, 2002.

QIKPROP, version 3.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009.

RAJENDRAN, L. et al. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease β -secretase by membrane targeting. **Science**, [SI], v. 320, p. 520-523, 2008.

REICHMAN, W. E. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. **Annals of General Hospital Psychiatry**, [SI], v. 2, p. 1-12, 2003.

ROBERDS, S. L. et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. **Human Molecular Genetics**, [SI], v. 10, p. 1317-1324, 2001.

RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**. [SI], v. 4, p. 739-776, 2012.

SAMBAMURTI, K. et al. Targets for AD treatment: conflicting messages from γ -secretase inhibitors. **Journal of Neurochemistry**, [SI], v. 117, p. 359–374, 2011.

SELKOE, D. J. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. **Annals of Internal Medicine**, [SI], v. 140, p. 627-638. 2004b.

SELKOE, D. J. Normal and abnormal biology of the β -amyloid precursor protein. **Annual Reviews Neuroscience**, [SI], v. 17, p. 489-517, 1994.

SELKOE, D.J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nature Cell Biology**, [SI], v. 6; n. 11, nov. 2004a.

SHINTANI, E. Y.; UCHIDA, K. M. Donepezil: an anticholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. **American Journal of Health System Pharmacy**, [SI], v. 54, p. 2805-2812, 1997.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Genética**, [SI], v. 21, Out. 1999.

SOSCIA, S. J. The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid b-Protein Is an Antimicrobial Peptide. **Plos One**, [SI], v. 5, e9505, 2010.

STOCKLEY, J.H.; O'NEILL, C. The proteins BACE1 and BACE2 and β -secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. **Biochemical Society Transactions**, [SI], v. 35, p. 574-576, 2007.

STOKIN, G. B. Amyloid precursor protein-induced axonopathies are independent of amyloid- β peptides. **Human Molecular Genetics**, [SI], v. 17, n. 22, p. 3474–3486. Ago. 2008,

SUTHERLAND, J. J. et al. Lessons in molecular recognition. 2. Assessing and improving cross-docking accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [SI], v. 49, p. 2293-2302, 2007.

THATHIAH, A.; DE STROOPER, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. **Nature Reviews**, [SI], v. 12, p 73-87. Fev. 2011.

THE PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM, Version 1.5.0.4 Schrödinger.

TURNER, R.T. et al. Subsite specificity of memapsin 2 (β -secretase): implications for inhibitor design. **Biochemistry**, [SI], v. 40, p. 10001–10006, 2001.

VAN DER BEEK, E. M.; KAMPHUIS, P. J. G. H. The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, [SI], v. 585, p. 197-207, 2008.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, [SI], v. 52, p. 609-603, 2003.

WALSH, D. M.; HARTLEY, D. M.; SELKOE, D. J. The many faces of A β : structures and activity. **Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents**, [SI], v. 3, n.4, p. 277-291, 2003.

XU, W. et al. Identification of a sub-micromolar, non-peptide inhibitor of β -secretase with low neural cytotoxicity through in silico screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [SI], v. 20, p. 5763–5766, 2010b.

XU, W. et al. Molecular docking and structure-activity relationship studies on benzothiazole based non-peptidic BACE-1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [SI], v. 20, p. 6203–6207, 2010a.