

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos 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: Flávio Roberto Pinsetta

**Orientador: 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 26/02/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

RESUMO

PINSETTA, F. R. **Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos em Mal de Alzheimer.** 2013. 74f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O Mal de Alzheimer (MA) foi caracterizado pela primeira vez em 1907 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer, tendo como sintomas clínicos disfunções cognitivas, fisiológicas, comportamentais, perda de memória, e eventualmente incontinência, demência, acamação e morte. É uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central que costuma afetar, principalmente, indivíduos em faixa etária mais avançada. Este mal é caracterizado microscopicamente pela presença de placas amilóides, que são acúmulos da proteína beta-amilóide inter-neurônios, e emaranhados neurofibrilares, formados predominantemente por formas altamente fosforiladas de uma proteína associada aos microtúbulos, Tau, as quais formam massas emaranhadas que consomem o corpo celular neuronal, possivelmente levando à disfunção neuronal e finalmente à morte. MAPK p38 α tem sido implicada em dois eventos associados ao MA, fosforilação da Tau e inflamação. MAPK p38 α é ativada por uma via de fosforilação dupla em Thr180 e Tyr182. O planejamento de fármacos inibidores de p38 α é principalmente focado em pequenas moléculas que competem pelo sítio catalítico do ATP. Aqui, nós utilizamos diferentes técnicas de modelagem molecular e planejamento racional baseado em estrutura e ligantes, tendo como base os inibidores da MAPK p38 α descritos na literatura, além das estruturas depositadas no PDB. Como resultado das diferentes abordagens de triagens virtuais utilizadas neste trabalho, tais como “docking”, farmacóforo, dinâmica molecular, campos de interação molecular, predição de atividade e toxicidade, cálculo de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas, foi selecionado um total de 14 compostos que atendem aos critérios adotados de baixa ou nenhuma toxicidade potencial, bom perfil farmacoterapêutico predito, atividades calculadas em valores comparáveis aos obtidos para os compostos de referência, além da manutenção das principais interações observadas para os inibidores mais potentes. Estes compostos podem ser adquiridos para estudos de inibição *in vitro* frente à enzima MAPK p38 α , contribuindo assim na busca de um potencial candidato à fármaco no tratamento do Mal de Alzheimer.

Palavras chave: Mal de Alzheimer, Quinase p38 alfa e Modelagem molecular.

ABSTRACT

FLÁVIO, F. R. **p38 alpha MAPK as target for drug design in Alzheimer's disease.** 74f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Alzheimer's disease (AD) was first characterized in 1907 by the German neuropathologist Alois Alzheimer, whose clinical symptoms includes cognitive, physiological and behavioral dysfunctions, memory loss, eventually incontinence, dementia, and death. It is a neurodegenerative disease of the central nervous system that usually affects individuals group in older age. This is characterized microscopically by the presence of amyloid plaques, which are accumulations of beta-amyloid protein inter-neurons, and neurofibrillary tangles formed predominantly by highly phosphorylated forms of the microtubule-associated protein, tau, which form tangled masses that consume neuronal cell body, possibly leading to neuronal dysfunction and ultimately death. p38 α MAPK has been implicated in both events associated with AD, tau phosphorylation and inflammation. p38 α MAPK pathway is activated by a dual phosphorylation at Thr180 and Tyr182 residues. The drug design of p38 α MAPK inhibitors is mainly focused on small molecules that compete for ATP in the catalytic site. Here, we used different techniques of molecular modeling based on p38 α MAPK structure deposited in the PDB and its inhibitors described in the literature. As a result of different virtual screening approaches used in this work, such as "docking", pharmacophore, molecular dynamics, molecular interaction fields, activity and toxicity predictions assays, pharmacokinetic properties and physicochemical, was selected a total of 14 compounds that meet these criteria of low or no toxicity potential, good pharmacotherapeutic profile, predicted activities calculated values comparable to those obtained for the reference compounds, while maintaining the main interactions observed for the most potent inhibitors. These compounds should be acquired for *in vitro* inhibition studies against the enzyme p38 α MAPK, thereby helping in the search of a potential drug candidate for the treatment of Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's Disease, p38 alpha MAPK and drug design.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mal de Alzheimer

O Mal de Alzheimer (MA) é uma doença que foi caracterizada pela primeira vez em 1907 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer [1-2], tendo como sintomas clínicos disfunções cognitivas, fisiológicas, comportamentais, perda de memória [3], e eventualmente incontinência, demência, acamação e morte [4-6]. É uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central que costuma afetar, principalmente, indivíduos em faixa etária mais avançada. A doença é um grande motivo de preocupação em saúde pública, haja vista que o número de casos vem crescendo nos últimos anos e tende a crescer mais com o aumento da expectativa de vida das pessoas.

O acometimento do MA apresenta grande disparidade, variando de 3,2 por 1.000 pessoas/ano na Índia a 25,2 em Indianópolis, nos EUA. No Brasil, três estudos investigaram a prevalência e incidência desta doença, utilizando amostras de idosos de base comunitária e critérios de diagnósticos atuais. A prevalência de demência na população com mais dos 65 anos foi de 7,1%, sendo que o MA foi responsável por 55% dos casos. A taxa de incidência foi 7,7 por 1.000 pessoas/ano no estudo de São Paulo e 14,8 por 1.000 pessoas/ano no estudo feito no Rio Grande do Sul. Considerando a prevalência de demência no Brasil e a população de idosos de aproximadamente 15 milhões de pessoas, a estimativa para demência é de 1,1 milhão. A porcentagem de indivíduos com o MA duplica aproximadamente a cada 5 anos de idade a partir dos 60 anos, representando 1% aos 60 anos e em torno de 30% aos 85 anos [7].

A idade e o histórico familiar da doença são fatores de risco bem estabelecidos, sendo que o risco aumenta com o número crescente de familiares de primeiro grau afetados. A etiologia do MA permanece indefinida, embora grande parte dos seus mecanismos bioquímicos e genéticos tenha sido elucidada. É sabido que o fragmento de 42 aminoácidos da proteína precursora B-amiloide tem alta relevância na patogênese das placas senis. Algumas proteínas que compõem os emaranhados neurofibrilares, mais especialmente a proteína tau hiperfosforilada e a ubiquitina, foram identificadas. Sabe-se que o alelo e do gene da apolipoproteína E (ApoE) é cerca de 3 vezes mais frequente nas pessoas com DA do que nos sujeitos-controle pareados por idade e que pessoas homozigotas para o gene apresentam maior risco para a doença do que as não homozigotas. Entretanto, a especificidade e a sensibilidade do teste da ApoE são muito baixas para permitir seu uso como teste de rastreamento na

população geral, inexistindo ainda um exame laboratorial que permita confirmar a presença da doença em vida, sendo que o diagnóstico definitivo do MA só pode ser obtido por necropsia, quando se analisa a quantidade de emaranhados neurofibrilares e de placas amiloides presentes no indivíduo [7].

O Mal de Alzheimer é caracterizado, microscopicamente, pela presença de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares (**Figura 1**), associados à perda gradual da capacidade cognitiva e deterioração progressiva da memória e do aprendizado, resultantes de um déficit colinérgico [8].

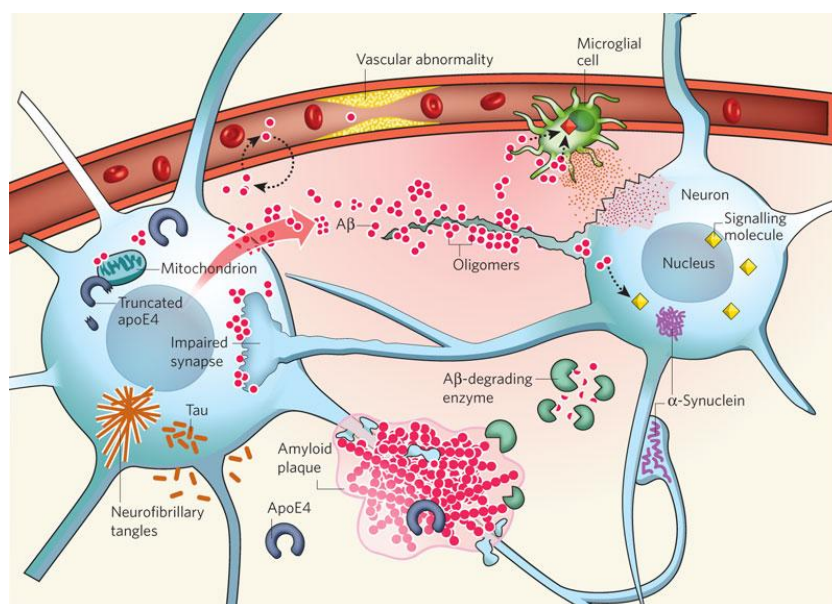


Figura 1: Patogênese do Mal de Alzheimer. Esquema demonstrando o acúmulo de β -amiloide, levando à formação das placas amiloides e a formação dos emaranhados neurofibrilares, decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau [9].

Placas neuríticas, também conhecidas como placas senis ou placas amilóide, são depósitos extracelulares formados por peptídeo β -amiloide (peptídeos agregados). Intervir com a geração e agregação do peptídeo $A\beta$ ou eliminar placas já formadas constituem uma vertente na pesquisa farmacêutica ao combate à progressão da doença de Alzheimer, através de anticorpos anti-peptídeo $A\beta$, vacinas, ou inibidores de secretases, como a β - e γ -secretase, que geram o peptídeo $A\beta$ através da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Portanto, mutações em qualquer proteína precursora amiloide (APP) ou presenilinas, proteínas que são necessárias para a atividade da γ -secretase, que gera o peptídeo amiloide da

APP, estão fortemente associadas com o MA, e continuam a apoiar estas estratégias terapêuticas [10].

A fosforilação de proteínas em resíduos de serina, treonina e tirosina pelas quase 520 quinases do genoma humano, constituem um dos principais mecanismos pelos quais as células se utilizam para regular seu metabolismo e demais funções [11]. Devido ao grande número de filamentos hiperfosforilados da proteína Tau encontrados em cérebros de pacientes com Alzheimer e sua ocorrência em outras doenças degenerativas, foi sugerido que anormalidades nestas proteínas são fatores importantes na progressão da doença de Alzheimer [12]. Assim, vários esforços foram direcionados para a identificação de quinases e fosfatases que reajam com a Tau. Uma das abordagens consistiu na identificação de enzimas que modificam a Tau *in vitro*, correlacionando diversas famílias de proteínas (GSK3, CDK, CK1 e MAPK) à progressão do MA [12-15].

O aumento da capacidade de neurotransmissão colinérgica constitui o mecanismo dos fármacos utilizados para o tratamento do Mal de Alzheimer. A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual atua nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico, sendo responsável pela interrupção da transmissão do impulso nervoso colinérgico através da hidrólise da acetilcolina [16], representa, atualmente, um dos poucos métodos de escolha para o tratamento do Mal de Alzheimer [17]. Esta forma de terapia, entretanto, é paliativa e apenas aliviam os sintomas da doença quando o quadro esta em sua fase inicial, não impedindo a morte dos neurônios colinérgicos e a progressão da doença.

Dentre os agentes anticolinesterásicos 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 de quatro doses diárias (120-160 mg/dia) de Tacrina [18].

Donepezil 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 do Donepezil (70 h), uma dose diária deste fármaco (5-10 mg/dia) é suficiente para o tratamento [18].

1.2. Quinase p38 α

A família das Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) está associada a numerosos eventos celulares, incluindo diferenciação, mitogênese, oncogênese e apoptose [19]. MAPK p38 α foi originalmente descoberta como alvo molecular para a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-1. Desde então, os inibidores seletivos de MAPK p38 α têm sido utilizados para demonstrar a importância da atividade da MAPK p38 α na geração de outras proteínas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e COX-2 [10]. Além de estar associadas a doenças inflamatórias, desordens na atividade da MAPK p38 α vêm sendo associada a uma série de doenças, desde doenças vasculares e câncer, até doenças neuronais, como o Mal de Alzheimer [20]. Novos inibidores de MAPK p38 α estão em fase II nos ensaios clínicos para dores neuropáticas e depressão [21].

A MAPK p38 tem sido implicada em dois eventos associados ao Mal de Alzheimer: fosforilação da proteína Tau, que leva à formação de Emaranhados Neurofibrilares Intracelulares, e inflamação. Devido ao grande número de filamentos da proteína Tau encontrados em cérebros de pacientes com Alzheimer, foi sugerido que anormalidades nesta proteína são fatores importantes na progressão do Mal de Alzheimer [12].

A Tau é uma proteína associada aos microtúbulos, encontrada dentro dos neurônios, normalmente restrita aos axônios, onde é responsável por sua sustentação, enquanto proteínas Tau anormalmente fosforiladas ou hiperfosforiladas formam massas emaranhadas ("Neurofibrillary Tangles", NFTs) que consomem o corpo celular neuronal, levando à disfunção e morte neuronal. Um número maior de NFTs mostrou estar correlacionado à diminuição da função cognitiva no Mal de Alzheimer, sugerindo que a prevenção da fosforilação da Tau pela inibição da MAPK p38 α possa ser uma importante estratégia terapêutica [10].

A família da MAPK p38 é composta por 4 isoformas: p38 α (Mitogen-activated protein kinase 14), p38 β (Mitogen-activated protein kinase 11), p38 γ (Mitogen-activated protein kinase 12) e p38 δ (Mitogen-activated protein kinase 13). As isoformas α e β são

principalmente expressas no coração e no cérebro, enquanto a p38 γ é encontrada no músculo esquelético e a p38 δ está predominantemente localizada nos testículos, pâncreas, rins e intestino delgado [21-22].

O planejamento de fármacos inibidores da MAPK p38 α está focado principalmente em pequenas moléculas que competem pelo sítio catalítico do ATP [23]. Esse sítio possui cinco regiões bem caracterizadas: o resíduo “linker” (Met109), o resíduo do bolsão “gatekeeper” (Thr106), o próprio bolsão (Ala51 e Val52), uma região hidrofóbica (Ala157 e Leu167) e outra polar, mais acessível ao solvente (Asp112, Ser 154 e Asp168). Existem também os inibidores alostéricos, que preenchem uma pequena porção do bolso de adenosina, mas ainda assim são competitivos pois sua ligação induz a uma mudança conformacional da enzima MAPK p38 α , impedindo sua ligação com o ATP [24]. Esta região de ativação é conhecida por um motivo-DFG (Asp168, Phe169 e Gly170) [24], conservada entre as quinases e caracterizada por alternar entre a conformação inativa (DFG-out) e sua conformação ativa (DFG-in), sendo ativada por dupla fosforilação dos resíduos Thr180 e Tyr182. Esta dupla fosforilação leva também à abertura do *loop* de ativação (resíduos 177-189), facilitando o acesso do ATP ao sítio ativo [21, 25].

Há três tipos de inibidores da MAPK p38 α : Inibidores tipo I, que ocupam a mesma região de ligação do ATP, ou seja, são inibidores competitivos; inibidores tipo II, que além de ocupar a região de ligação do ATP, se estendem até um sítio alostérico contíguo, sendo capaz de induzir a conformação inativa do motivo DFG (DFG-out); e inibidores tipo III, que ocupam principalmente o sítio alostérico contíguo, mas que também podem ocupar uma porção do bolsão hidrofóbico, pertencente ao sítio ativo. Os inibidores tipo III são efetivos apenas quando o motivo DFG está em sua conformação inativa (DFG-out), a qual torna o sítio alostérico acessível. Os inibidores do tipo III estabilizam a conformação inativa da MAPK p38 α , impedindo a ligação do ATP ao sítio ativo. A maioria dos inibidores da MAPK p38 α são ATP-competitivos e podem assumir diferentes conformações bioativas ou modos de ligação no interior do sítio ativo [24-25].

Existe atualmente uma série de complexos da MAPK p38 α com inibidores disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB) [26]. Um exemplo pode ser visto na figura abaixo, complexo de código PDB 3GC7, o qual foi selecionado por apresentar uma boa resolução cristalográfica (1,8 Å), e o inibidor apresentar alta atividade com respeito à MAPK p38 α (IC₅₀ = 0,6 nM). O modo de ligação desse inibidor pode ser visualizado na Figura 2. Embora

existam muitos inibidores da MAPK p38 α , poucos alcançam os ensaios clínicos de fase III devido aos sérios efeitos colaterais e também a problemas em relação as suas propriedades farmacocinéticas [27].

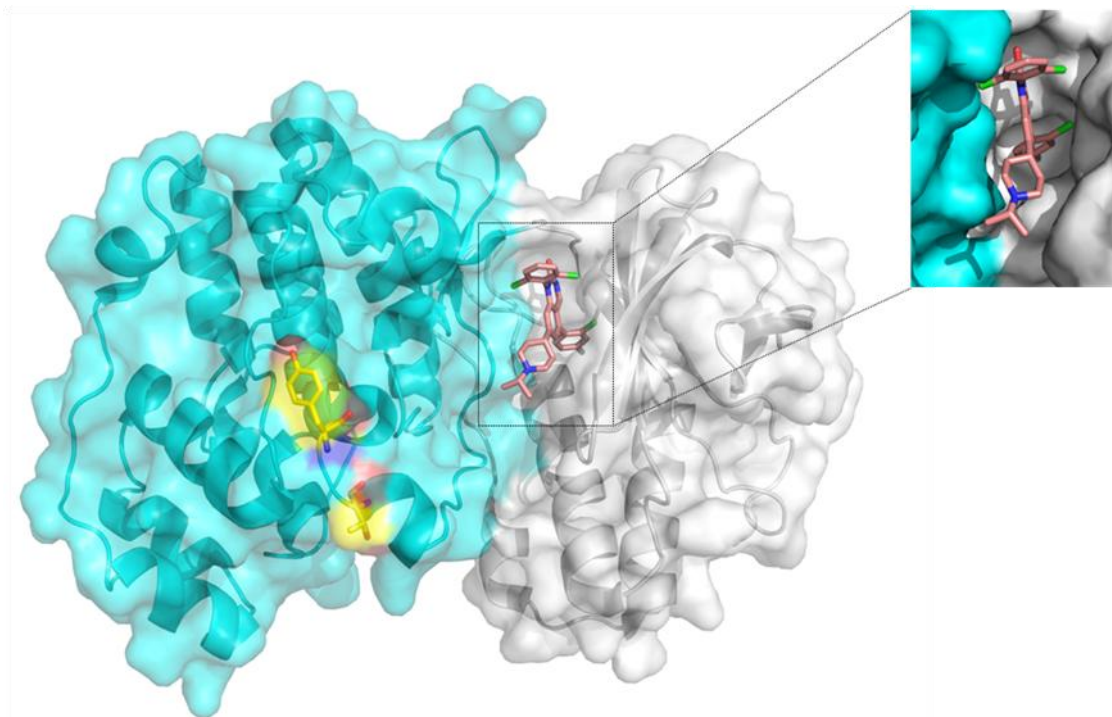


Figura 2: PDB ID: 3GC7. Domínio amino-terminal mostrado em cinza à direita, enquanto o domínio carboxi-terminal é mostrado em ciano, à esquerda na figura, em representações de superfície e *ribbons*. O inibidor está em destaque com carbonos em cor salmão, enquanto os resíduos pertencentes ao motivo de ativação por dupla fosforilação, Thr180 e Tyr182, estão em destaque em amarelo. Com relação à estrutura secundária, MAPK p38 α é composta por 41,26% de hélices, 16,33% de folhas-beta e 42,41% de “coils”, de acordo com o calculado pelo algoritmo STRIDE [28]. Figura desenvolvida com o programa PyMOL [29].

A análise destes complexos nos permite obter um conhecimento mais detalhado a respeito do sítio ativo da enzima, bem como das principais interações realizadas com os inibidores, permitindo o planejamento de novos inibidores mais seletivos. Além disso, através do estudo da estrutura química dos inibidores conhecidos, um padrão farmacofórico pode ser derivado e aplicado na busca de potenciais inibidores que mantenham características farmacofóricas semelhantes [30].

A abordagem computacional tem sido cada vez mais aplicada na busca por novas moléculas bioativas, onde a utilização iterativa de diferentes ferramentas computacionais, através de uma varredura em bancos de dados de grande diversidade química e que contêm uma imensa variedade de compostos naturais, sintéticos e até mesmo hipotéticos, permite a

identificação de compostos protótipos, posteriormente testados em bioensaios. O objetivo é maximizar as chances e reduzir o custo e as etapas de busca de compostos ativos que possam apresentar bom nível de afinidade receptor-ligante [27].

Nessa estratégia, a utilização iterativa de ferramentas computacionais, na seleção e aprimoramento de moléculas, e de ferramentas experimentais, na obtenção de detalhes moleculares a respeito do alvo e da interação deste com novos ligantes podem orientar e tornar mais ágil e eficiente a busca e a otimização de novas moléculas bioativas a partir de coleções de compostos reais ou virtuais. Candidatos a ligantes que advêm destas buscas podem ser avaliados em estudos *in vitro* quanto ao seu caráter inibitório, possibilitando estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR), bem como predição de suas propriedades farmacocinéticas e de toxicidade [31].

Uma dessas ferramentas computacionais é o “Docking” molecular, que permite explorar o vasto espaço conformacional de ligantes, assumido no interior do sítio ativo de um alvo específico, em um curto espaço de tempo, e permitindo a análise de bibliotecas de compostos a um custo computacional razoável [32]. “Docking” molecular é o termo usado para descrever as interações entre o ligante e o receptor através de uma abordagem computacional [33]. Há três aplicações para os programas de “docking”: predição do modo de ligação, otimização de compostos e triagem de bases de dados de compostos. O primeiro modelo de reconhecimento molecular foi o da “chave e fechadura”, proposto por Emil Fischer em 1894, onde a forma do sítio ativo do receptor é exatamente complementar à forma do ligante [34]. Posteriormente, Koshland propôs o modelo do ajuste induzido, no qual ambos, receptor e ligante, adaptam sua estrutura para ligarem-se um ao outro. Esta abordagem possibilitou a implementação de algoritmos de “docking” que permitem a flexibilidade dos ligantes e de alguns resíduos de aminoácido na região do sítio ativo do receptor, nos programas mais recentes de “docking”, como o **GLIDE 5.5** [34].

O cálculo de “docking”, em qualquer programa, é basicamente dividido em duas etapas, o algoritmo de busca e a função de escore. O algoritmo de busca explora as diferentes poses possíveis do ligante no sítio ativo do receptor, ou seja, gera um repertório de orientações e conformações (poses) do ligante dentro do sítio ativo. Já a função de escore é responsável por analisar a interação de cada uma destas poses geradas frente ao sítio ativo, através de análises de complementaridades estérica e química, e ranqueá-las de acordo com a sua afinidade [34].

Os algoritmos de busca podem ser divididos em três tipos: sistemáticos, estocásticos e determinísticos. Os algoritmos de busca sistemáticos são baseados em uma grade de valores para cada grau de liberdade do ligante, ou seja, quanto mais ligações rotacionáveis o inibidor possuir, mais demorado será o cálculo. Como exemplo de algoritmo sistemático tem-se o algoritmo incremental. Os algoritmos de busca estocásticos fazem mudanças na conformação do ligante de forma randômica, geralmente mudando um grau de liberdade de cada vez. O algoritmo genético é um exemplo de algoritmo estocástico. Os algoritmos determinísticos calculam a energia do estado inicial do ligante e permitem apenas mudanças conformacionais em que o estado final possui energia menor ou igual a do estado inicial. Um exemplo de algoritmo determinístico é a simulação de Dinâmica Molecular [34].

As funções de escore podem ser classificadas, basicamente, em: empíricas, baseadas em campos de força ou “knowledge-based”. As funções empíricas são baseadas em um conjunto de dados de afinidade obtidos de complexos ligante-receptor. Nas funções baseadas em mecânica molecular (campos de força), a afinidade de ligação é estimada de acordo com o somatório das energias de interações de van der Waals, eletrostática e de ligação de hidrogênio entre os átomos do ligante e do sítio receptor. As funções de escore do tipo “knowledge-based” são derivadas de análises de preferências estatísticas das distâncias de interação entre os diferentes átomos, baseadas no conhecimento de complexos ligante-proteína com estrutura resolvida [35].

Outra metodologia, baseada na similaridade entre os ligantes, é aquela que explora o conceito de similaridade aos grupos da molécula essenciais à atividade (farmacóforo). É o método mais amplamente empregado exigindo representações 3D. O conceito de farmacóforo foi primeiramente introduzido por Paul Ehrlich, em 1909, como "uma estrutura molecular (phóros) que carrega as características essenciais, responsáveis pela ação biológica de um fármaco (pharmacon's)". O farmacóforo inclui todas as principais características envolvidas na interação do ligante com o sítio receptor. Através desse conhecimento alguns grupos químicos podem ser incorporados a determinados ligantes a fim de elevar a especificidade, visando otimizar sua atividade biológica. Na prática, o farmacóforo engloba características químicas específicas, tais como potencialidade para realização de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, entre outras. Dessa forma, um modelo farmacofórico sugerido para uma classe de ligantes pode ser utilizado como molde na busca e seleção de novos protótipos que satisfaçam os principais requisitos moleculares responsáveis pela atividade biológica em determinado alvo molecular [36].

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith, M.d.A.C., *Doença de Alzheimer*. Revista Brasileira de Psiquiatria, 1999. **21**(2): p. 5.
2. Berchtold, N.C. and C.W. Cotman, *Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease*. Neurobiology of Aging, 1998. **19**(3): p. 17.
3. Fagihi, M.A., et al., Nature Medicine, 2008. **14**(4).
4. Kuglstatler, A., et al., *Tyramine fragment binding to BACE-1*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(4): p. 1304-7.
5. Citron, M., *[beta]-Secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease - promise and challenge*. Trends in Pharmacological Sciences, 2004. **25**(2): p. 92-97.
6. Cole, S.L. and R. Vassar, *The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1*. Mol Neurodegener, 2007. **2**: p. 22.
7. *PORTARIA Nº 491, DE 23 DE SETEMBRO DE 2010.*
8. Shintani, E.Y. and K.M. Uchida, *Donepezil: an anticholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease*. Am J Health Syst Pharm, 1997. **54**(24): p. 2805-10.
9. Mucke, L., *Neuroscience: Alzheimer's disease*. Nature, 2009. **461**(7266): p. 895-7.
10. Dalrymple, S.A., *p38 mitogen activated protein kinase as a therapeutic target for Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 2002. **19**(3): p. 295-9.
11. Gompel, M., et al., *Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian Aplidium meridianum*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(7): p. 1703-7.
12. Kuret, J., et al., *Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain*. J Neurochem, 1997. **69**(6): p. 2506-15.
13. Singh, T.J., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state*. J Neurochem, 1995. **64**(3): p. 1420-3.
14. Kuret, J., et al., *Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain*. Journal of Neurochemistry, 1997. **69**(6): p. 2506-15.

15. Singh, T.J., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state*. Journal of Neurochemistry, 1995. **64**(3): p. 1420-3.
16. 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, 2002. **41**(35): p. 10810-8.
17. Giacobini, E., *Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy*. J Physiol Paris, 1998. **92**(3-4): p. 283-7.
18. Reichman, W.E., *Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease*. Ann Gen Hosp Psychiatry, 2003. **2**(1): p. 1.
19. Zhang, Y.Y., et al., *Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26591-601.
20. Chico, L.K., L.J. Van Eldik, and D.M. Watterson, *Targeting protein kinases in central nervous system disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(11): p. 892-909.
21. Yasuda, S., et al., *p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases*. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2011. **11**(1): p. 45-59.
22. Johnson, G.V. and C.D. Bailey, *The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 2003. **183**(2): p. 263-8.
23. Perry, J.J., et al., *p38alpha MAP kinase C-terminal domain binding pocket characterized by crystallographic and computational analyses*. J Mol Biol, 2009. **391**(1): p. 1-11.
24. Lee, M.R. and C. Dominguez, *MAP Kinase p38Inhibitors: Clinical Results and an Intimate Look at Their Interactions with p38alpha Protein*. Current Medicinal Chemistry, 2005. **12**(25): p. 2979-2994.
25. Simard, J.R., et al., *High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38alpha*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(51): p. 18478-88.
26. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**: p. 235-242.
27. Lengauer, T., *Bioinformatics: from genomes to drugs. Methods and principles in medicinal chemistry*. Weinheim: Wiley-VHC Verlag, 2002. **1**.
28. Heinig, M. and D. Frishman, *STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W500-2.

29. Loper, J.E., D.Y. Kobayashi, and I.T. Paulsen, *The Genomic Sequence of Pseudomonas fluorescens Pf-5: Insights Into Biological Control*. Phytopathology, 2007. **97**(2): p. 233-8.
30. Polgar, T. and G.M. Keseru, *Virtual screening for beta-secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228*. J Med Chem, 2005. **48**(11): p. 3749-55.
31. Nwaka, S. and A. Hudson, *Innovative lead discovery strategies for tropical diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(11): p. 941-55.
32. Alonso, H., A.A. Bliznyuk, and J.E. Gready, *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. Med Res Rev, 2006. **26**(5): p. 531-68.
33. Halperin, I., et al., *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins, 2002. **47**(4): p. 409-43.
34. Brooijmans, N. and I.D. Kuntz, *Molecular recognition and docking algorithms*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 335-73.
35. Mohan, V., et al., *Docking: successes and challenges*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(3): p. 323-33.
36. Rodrigues, R.P., et al., *Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos*. Revista Virtual de Química, 2012. **4**: p. 38.
37. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2714-2723.
38. Laurie, A.T. and R.M. Jackson, *Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites*. Bioinformatics (Oxford, England), 2005. **21**(9): p. 1908-16.
39. *Discovery Studio, Versão 3.5, Accelrys Inc.: San Diego, USA, 2012.*
40. Allen, F.H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. Acta Crystallogr B, 2002. **58**(Pt 3 Pt 1): p. 380-8.
41. Irwin, J.J. and B.K. Shoichet, *ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening*. J Chem Inf Model, 2005. **45**(1): p. 177-82.
42. Irwin, J.J., et al., *ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012.
43. Omega, *Versão 2.0*, Openeyes Scientific Software: Santa Fe, NM, 2006.
44. Silva, C.H.T.P. and M. Pastor, *Resultados não publicados*.

45. Koes, D.R. and C.J. Camacho, *ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(Web Server issue): p. W409-14.
46. Schneidman-Duhovny, D., et al., *PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(Web Server issue): p. W223-8.
47. Kirchmair, J., et al., *Comparative Performance Assessment of the Conformational Model Generators Omega and Catalyst: A Large-Scale Survey on the Retrieval of Protein-Bound Ligand Conformations*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2006. **46**(4): p. 1848-1861.
48. Hert, J., et al., *Comparison of Fingerprint-Based Methods for Virtual Screening Using Multiple Bioactive Reference Structures*. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 2004. **44**(3): p. 1177-1185.
49. GOLD, *Versão 4.1.2*, Cambridge Crystallographic Datacenter, Cambridge, UK, 2009.
50. GLIDE, *Versão 5.5*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009.
51. Goodford, P.J., *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*. *J Med Chem*, 1985. **28**(7): p. 849-57.
52. Kumar, A. and I. Ghosh, *Mapping selectivity and specificity of active site of plasmepsins from Plasmodium falciparum using molecular interaction field approach*. *Protein Pept Lett*, 2007. **14**(6): p. 569-74.
53. GRID, *Versão 22*, Molecular Discovery Ltd, London, UK, 2006.
54. Insight II, *Molecular Simulations*, San Diego, CA, 2000.
55. Grant, J.A., M.A. Gallardo, and B.T. Pickup, *A fast method of molecular shape comparison: A simple application of a Gaussian description of molecular shape*. *Journal of Computational Chemistry*, 1996. **17**(14): p. 1653-1666.
56. Grant, J.A., et al., *A simple formula for dielectric polarisation energies: The Sheffield Solvation Model*. *Chemical Physics Letters*, 2007. **441**(1-3): p. 163-166.
57. Liu, X., et al., *PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(Web Server issue): p. W609-14.
58. DEREK10.0., *LHASA Limited*: Leeds, UK (2004).
59. QikProp, *version 3.4*, Schrödinger, LLC, Schrödinger: New York, NY, 2011.
60. Benfenati, E. and G. Gini, *Computational predictive programs (expert systems) in toxicology*. *Toxicology*, 1997. **119**(3): p. 213-225.

61. Gopi Mohan, C., et al., *Computer-Assisted Methods in Chemical Toxicity Prediction*. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2007. **7**(5): p. 499-507.
62. Muster, W., et al., *Computational toxicology in drug development*. Drug Discov Today, 2008. **13**(7-8): p. 303-10.
63. Hunt, J.A., et al., *p38 Inhibitors: piperidine- and 4-aminopiperidine-substituted naphthyridinones, quinolinones, and dihydroquinazolinones*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(3): p. 467-70.
64. Bissantz, C., B. Kuhn, and M. Stahl, *A medicinal chemist's guide to molecular interactions*. J Med Chem, 2010. **53**(14): p. 5061-84.
65. Patrick, G.L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4 ed: Oxford University Press, 2009.
66. Mavel, S., I. Thery, and A. Gueiffier, *Synthesis of imidazo[2,1-a]phthalazines, potential inhibitors of p38 MAP kinase. Prediction of binding affinities of protein ligands*. Arch Pharm (Weinheim), 2002. **335**(1): p. 7-14.
67. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
68. Sun, H., *Pharmacophore-based virtual screening*. Curr Med Chem, 2008. **15**(10): p. 1018-24.
69. Zhong, H.B., J. Phillip, *GALAHAD pharmacophore modeling for drug discovery*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(17): p. 5780-5780.
70. Shepphird, J.K. and R.D. Clark, *A marriage made in torsional space: using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches*. J Comput Aided Mol Des, 2006. **20**(12): p. 763-71.
71. Milletti, F., et al., *New and original pKa prediction method using grid molecular interaction fields*. J Chem Inf Model, 2007. **47**(6): p. 2172-81.
72. Durrant, J.D. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations and drug discovery*. BMC Biol, 2011. **9**: p. 71.
73. Eldridge, M.D., et al., *Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes*. J Comput Aided Mol Des, 1997. **11**(5): p. 425-45.
74. Scior, T., et al., *Recognizing Pitfalls in Virtual Screening: A Critical Review*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(4): p. 867-881.
75. Boström, J., J.R. Greenwood, and J. Gottfries, *Assessing the performance of OMEGA with respect to retrieving bioactive conformations*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2003. **21**(5): p. 449-462.

76. Haigh, J.A., et al., *Small Molecule Shape-Fingerprints*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2005. **45**(3): p. 673-684.
77. Muchmore, S.W., A.J. Souers, and I. Akritopoulou-Zanze, *The Use of Three-Dimensional Shape and Electrostatic Similarity Searching in the Identification of a Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonist*. Chemical Biology & Drug Design, 2006. **67**(2): p. 174-176.
78. Tuccinardi, T., et al., *Multitemplate Alignment Method for the Development of a Reliable 3D-QSAR Model for the Analysis of MMP3 Inhibitors*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2009. **49**(7): p. 1715-1724.
79. Sutherland, J.J., et al., *Lessons in Molecular Recognition. 2. Assessing and Improving Cross-Docking Accuracy*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2007. **47**(6): p. 2293-2302.
80. EON, *Versão 2.0.1, Openeyes Scientific Software: Santa Fe, NM, 2007*.