UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento, ensaio e otimização *in silico* de novos
protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**

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: Jonathan Resende de Almeida

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 26/01/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

RESUMO

ALMEIDA, J. R. **Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**. 2014. 156f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima essencial que encerra a transmissão colinérgica através de uma rápida hidrólise do neurotransmissor, acetilcolina (ACh). Uma ampla série de evidências mostraram que os inibidores da AChE podem interferir com a progressão da doença de Alzheimer (DA). O desenvolvimento bem sucedido de compostos inibidores da AChE foi baseado na teoria de que o declínio nas funções cognitivas e mentais associadas a DA está relacionado com a perda da neurotransmissão cortical colinérgica, sendo assim, esses compostos podem ser usados para tratar as deficiências colinérgicas. Uma coleção de moléculas orgânicas foi escaneada para ser avaliada a capacidade dessas moléculas em inibir a atividade enzimática da AChE com o objetivo de se encontrar compostos líderes para posteriores otimizações, conduzindo a fármacos com aumento da eficácia e/ou menores efeitos adversos. As estratégias aplicadas incluem o *screening* ou triagem virtual baseado na estrutura e também no ligante, modelagem farmacofórica, *docking* molecular e buscas por similaridade (forma e eletrostática). Os estudos foram também concentrados na descoberta de novas classes de inibidores da AChE, tendo como molécula de referência o fármaco donepezil, o qual inaugurou uma nova classe de inibidores da AChE com a ação mais longa e mais seletiva com efeitos adversos manejáveis. Do total de compostos triados, 50 foram selecionados com adequadas propriedades físico-químicas e ADME/Tox. Em geral, esses compostos possuem substancial interação com o sítio periférico aniônico (PAS) da AChE e a maioria deles faz interações adicionais com o sítio catalítico (CAS) e com outros resíduos de aminoácidos importantes ao longo da enzima. Destes 50 compostos, oito foram comercialmente adquiridos e os ensaios enzimáticos revelaram que estes compostos exibem uma alta afinidade pela AChE. Os resultados apontam, ainda, que o composto intitulado ZINC30019441 exibiu a mais potente atividade inibitória para a AChE, com 1,8 micromolar de concentração, e os demais ficaram ainda situados em baixo micromolar, de 2 a 3 micromolar de concentração. Estes resultados, além das modificações químicas ora propostas *in silico* para estes inibidores protótipos, apontam para o desenvolvimento de uma nova e promissora série de potentes anticolinesterásicos, contendo propriedades de fármacos, as quais são ainda apropriadas para atuarem no Sistema Nervoso Central e interagirem com o peptídeo beta-amiloide, com vistas ao tratamento quimioterápico da doença de Alzheimer. A perspectiva imediata inclui os ensaios de anti-agregação do peptídeo com os oito inibidores já testados com a Acetilcolinesterase.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; inibidores da acetilcolinesterase; peptídeo β -amiloide.

ABSTRACT

ALMEIDA, J. R. **Design, assay and in silico optimization of new prototypes inhibitors of acetylcholinesterase.** 2014. 151f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Acetylcholinesterase (AChE) is an essential enzyme that terminates cholinergic transmission by rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). A wide range of evidence shows that AChE inhibitors may interfere with the progression of Alzheimer's disease (AD). The successful development of AChE inhibitor compounds was based on the theory that the decline in cognitive and mental functions associated with AD is related to the loss of cortical cholinergic neurotransmission, thus, these compounds can be used for treating cholinergic deficiencies. A collection of organic molecules has been scanned to evaluate the ability of these molecules to inhibit the enzymatic activity of AChE in order to find lead compounds for further optimization, leading to drugs with increased efficacy and/or fewer adverse effects. The strategies applied include structure-based virtual screening and also in ligand-based virtual screening, pharmacophoric modeling, molecular docking and similarity searches (shape and electrostatic). Studies have also focused on the discovery of new classes of AChE inhibitors, having as a reference molecule the drug donepezil, which has opened a new class of AChE inhibitors with longer and more selective action with manageable side effects. 50 of the compounds screened, were selected with appropriate physical and chemical properties and ADME/Tox. In general, these compounds possess substantial interaction with the peripheral anionic site (PAS) of AChE and most of them make further interact with the catalytic site (CAS) and other key amino acid residues throughout the enzyme. Out of these 50 compounds, eight were commercially purchased and the enzyme assays have shown that these compounds exhibit a high affinity for AChE. The results show also that the compound titled ZINC30019441 exhibited the most potent inhibitory activity for AChE, with 1.8 micromolar concentration, and the rest were still located in low micromolar, 2-3 micromolar concentration. These results as well as chemical modifications herein proposed for these prototypes, indicate the development of a new and promising series of potent anticholinesterase containing drug properties, which are still suitable to act on the central nervous system and interact with the β -amyloid peptide, for chemotherapy

treatment of Alzheimer's disease. The immediate prospect includes the peptide anti-aggregation assays with the eight inhibitors already tested against acetylcholinesterase.

Keywords: Alzheimer's disease; acetylcholinesterase inhibitors; β -amyloid peptide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modificações cerebrais.....	27
Figura 2. Corte transversal pela metade entre os ouvidos	27
Figura 3. Transmissão do impulso pela sinapse colinérgica	29
Figura 4. Monômero da acetilcolinesterase	33
Figura 5. Cavidade do sítio ativo da enzima AChE	34
Figura 6. A entrada do sítio ativo ao centro da enzima AChE	36
Figura 7. Estrutura cristalográfica da AChE humana em complexo com o donepezil...	46
Figura 8. Na representação binária, o n° 1 representa uma característica presente, e o n° 0 uma característica ausente, seja nas estruturas A ou B.....	49
Figura 9. Comparação da similaridade molecular entre a molécula-alvo e outras estruturas através do índice de Tanimoto (S_T).....	50
Figura 10. Demonstração do núcleo (anéis) e de grupos rotaméricos presos a ele através de ligações rotacionáveis.	58
Figura 11. Layout da função similaridade do programa GLIDE.....	60
Figura 12. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos.....	63
Figura 13. As grades são calculadas dentro do espaço definido pela caixa exterior. Esta é também a caixa dentro da qual todos os átomos ligantes devem ser contidos.	65
Figura 14. Donepezil, utilizado como estrutura de referência para gerar e pontuar as sobreposições tridimensionais da base de dados.	68
Figura 15. Layout do programa GOLD para a configuração da eficiência da busca.	73

Figura 16. Layout do programa GOLD para a configuração da busca por restrição de similaridade.	75
Figura 17. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos utilizando a enzima humana e o donepezil como molécula de referência para as buscas por similaridade... 76	
Figura 18. Alinhamento sequencial das estruturas de AChE das espécies <i>Electrophorus electricus</i> (código PDB 1C2O), <i>Homo sapiens</i> (código PDB 1B41) e <i>Torpedo californica</i> (código PDB 2CKM)	83
Figura 19. Alinhamento estrutural de AChE das espécies <i>Electrophorus electricus</i> (código PDB 1C2O), <i>Homo sapiens</i> (código PDB 1B41) e <i>Torpedo californica</i> (código PDB 2CKM).	85
Figura 20. Sobreposição dos principais resíduos de aminoácidos dos sítios ativos de cada espécie de AChE envolvidos na interação de ligantes	86
Figura 21. Farmacóforo derivado pelo programa Discovery Studio 4.0, usado em triagens de inibidores da AChE.	88
Figura 22. Hipótese 1, gerada pelo programa Discovery Studio 4.0 mantendo-se rígidas as conformações cristalográficas dos inibidores dos complexos 1ACJ, 1UT6, 2CMF, 2CKM e 1ODC.	89
Figura 23. Grupos farmacofóricos dentro no sítio ativo da enzima AChE e próximos aos principais aminoácidos de interação desta enzima	90
Figura 24. Os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo I.	93
Figura 25. Os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo II	94
Figura 26. Os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III.	94
Figura 27. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo I.	99
Figura 28. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo II.	100

Figura 29. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III.	101
Figura 30. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo I.....	105
Figura 31. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo II.....	106
Figura 32. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III	107
Figura 33. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III	108
Figura 34. Campos de interação molecular calculados para os compostos ZINC32729496 (A) e ZINC33089640 (B) sobrepostos com o grupo de prova carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol.....	110
Figura 35. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos da parte 1 deste estudo.	112
Figura 36. Representações lineares de todos os compostos selecionados após todas as etapas iniciais realizadas na parte 1 deste estudo.	116
Figura 37. Alinhamento do donepezil, usado como molécula de referência, com os compostos da base de dados	126
Figura 38. Visão esquematizada do sítio ativo da AChE humana em complexo com donepezil.....	131
Figura 39. Compostos selecionados da etapa de screening virtual, onde se utilizou no docking a molécula de referência, donepezil, como uma restrição de similaridade. ...	132
Figura 40. Compostos selecionados da etapa de screening virtual baseada na similaridade de forma e eletrostática que, assim como o donepezil, fazem uma interação de ligação de hidrogênio com a Phe295 via carbonila, além de interações do tipo empilhamento- π com os resíduos de Trp286 e Trp86.	133

Figura 41. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos da parte 2 deste estudo.	135
---	-----

Figura 42. Em destaque, representado pela linha preta tracejada, está a interação <i>via</i> ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr334 da de Torpedo californica (vide os resultados de <i>docking</i> nas seções anteriores) e o oxigênio da carbonila do composto ZINC30019441	145
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de abreviaturas.....	20
Tabela 2. Comparação dos resíduos de aminoácidos da enzima AChE de três diferentes espécies, destacando a substituição de um resíduo de tirosina por um de fenilalanina na enzima de <i>Torpedo californica</i>	35
Tabela 3. Expressão de alguns coeficientes de similaridade.....	48
Tabela 4. Alinhamento sequencial múltiplo das três sequências de diferentes espécies da enzima AChE.....	81
Tabela 5. RMSD da sobreposição das estruturas tridimensionais da AChE humana (1B41), AChE de enguia elétrica (1C2O) e AChE de arraia elétrica (2CKM).	85
Tabela 6. Complexos cristalográficos selecionados do banco de dados PDB.....	87
Tabela 7. Ligantes dos complexos cristalográficos recuperados após a busca feita com o farmacóforo em uma base de dados contaminada.....	91
Tabela 8. Os seis compostos selecionados após a 1ª etapa de seleção.....	92
Tabela 9. Compostos selecionados da 1ª etapa que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.	94
Tabela 10. Compostos selecionados da 2ª etapa que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.	96
Tabela 11. Compostos selecionados da 3ª etapa que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.	102
Tabela 12. Valores de GlideScore obtidos para os compostos selecionados da 2ª etapa.	113
Tabela 13. Valores de GlideScore obtidos para os compostos selecionados da 3ª etapa.	113
Tabela 14. Valores de GlideScore obtidos para os compostos selecionados da 4ª etapa.	114

Tabela 15. Propriedades físico-químicas calculadas pelo programa QikProp para os compostos selecionados de todas as etapas executadas na parte 1 deste estudo.	117
Tabela 16. Predições do web-servidor SEA para todos os compostos selecionados na parte 1 deste estudo.	122
Tabela 17. Compostos selecionados da 1ª etapa (similaridade de forma e eletrostática) que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.	128
Tabela 18. Compostos selecionados da 2ª etapa (restrição de similaridade) que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.....	129
Tabela 19. Propriedades físico-químicas calculadas pelo programa QikProp para os compostos selecionados de todas as etapas executadas na Parte 2 deste estudo.	138
Tabela 20. Predições realizadas com o web-servidor SEA para os compostos selecionados na Parte 2 deste estudo.	141
Tabela 21. Resultados dos ensaios de inibição da enzima AChE-ee, realizados com as amostras em microplaca, a uma concentração inicial de 2000 µM.	143
Tabela 22. Resultados dos ensaios de inibição com a enzima AChE-ee, realizados com as amostras em microplaca, em diferentes concentrações.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	Doença de Alzheimer
ACh	Acetilcolina
APP	Proteína precursora amiloide
nAChRs	Receptores nicotínicos da ACh
mAChRs	Receptores muscarínicos da ACh
A β	Peptídeo beta-amiloide
AChE	Acetilcolinesterase
Ch	colina
SNC	Sistema nervoso central
PAS	Sítio aniônico periférico
CAS	Sítio ativo catalítico
BuChE	Butirilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
FDA	Food and Drug Administration
MIF	Campos de interação molecular

QSAR	Relação quantitativa de estrutura-atividade
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
PDB	Protein data bank
hAChE	Acetilcolinesterase humana
GA	Genetic Algorithm
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
PASS	Prediction of Activity Spectra for Substances
iAChE	Inibidores da acetilcolinesterase

Sumário

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	18
1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Doença de Alzheimer.....	26
1.2. Acetilcolinesterase (AChE) como alvo para o planejamento de potenciais fármacos para o tratamento do Doença de Alzheimer	28
1.3. A estrutura cristalográfica da enzima AChE: análise estrutural da enzima e do sítio PAS	32
1.3.1. Análise estrutural da enzima AChE e o sítio PAS	38
1.3.2. Deposição do peptídeo β -amiloide e agregação.....	39
1.4. Inibidores da AChE	40
1.5. Acetilcolinesterase humana	44
1.5.1. A estrutura cristalográfica da acetilcolinesterase humana em complexo com o donepezil	44
1.6. Screening virtual baseado na similaridade e múltiplos métodos de busca	46
1.6.1. Similaridade	47
1.6.2. Farmacóforo	51
1.6.3. Outras técnicas de quimioinformática.....	52
2. OBJETIVOS.....	53
3. MÉTODOS.....	54
3.1. Alinhamento múltiplo de sequências	54
3.2. BindingDB	55
3.3. Geração do modelo farmacofórico.....	56
3.4. Métodos de screening virtual	57

3.4.1. O programa GLIDE.....	57
3.4.2. Pontuação de similaridade por pares de átomos.....	59
3.5. Experimentos de screening virtual e docking molecular	60
3.6. Primeiros experimentos de screening virtual.....	62
3.7. Seleção de compostos por screening virtual – GLIDE	65
3.8. Campos de interação molecular – MIF.....	65
3.9. Abordagens baseadas na estrutura da enzima AChE Humana e abordagens baseadas no ligante de referência.....	67
3.9.1. Abordagem baseada no ligante	67
3.9.2. Abordagem baseada na estrutura.....	70
3.10. Estudos ADME/Tox	76
3.10.1. DEREK.....	77
3.10.2. QikProp	78
3.11. SEA (Similarity Ensemble Approach).....	79
3.12. Ensaio de atividade enzimática.....	80
3.12.1. Ensaio Ellman	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1. Alinhamento sequencial e análise estrutural.....	81
4.2. Seleção de ligantes ativos – BindingDB e PDB – Parte 1	87
4.3. Screening virtual baseado no ligante – Farmacóforo.....	88
4.3.1. Validação do farmacóforo	90
4.4. Etapas realizadas na abordagem de screening virtual – experimentos realizados durante a seleção dos compostos	91
4.4.1. 1ª etapa: screening virtual baseado na estrutura e no ligante – experimentos realizados com o programa GLIDE e farmacóforo.....	91
4.4.2. 2ª etapa: screening virtual baseado no ligante e na estrutura – experimentos realizados no programa GLIDE (similaridade) e farmacóforo	95

4.4.3. 3ª etapa: screening virtual baseado na estrutura e no ligante – experimentos de screening virtual baseado no farmacóforo e GLIDE	101
4.4.4. 4ª etapa: screening virtual baseado na estrutura – GLIDE.....	108
4.5. Compostos selecionados após os experimentos realizados na enzima AChE de <i>Torpedo californica</i>	110
4.6. Predição de propriedades físico-químicas para os compostos selecionados nestas etapas iniciais – QikProp	116
4.7. Predição de toxicidade para os compostos selecionados para os compostos selecionados nestas etapas iniciais – DEREK	120
4.7.1. Amidas aromáticas	120
4.7.2. Fenóis ou precursores fenólicos	121
4.7.3. Ácido carboxílico substituído na posição β por um oxigênio ou enxofre ou precursores e alquila arilo ou ácido carboxílico bis aril.....	121
4.7.4. Precursor aldeído.....	121
4.7.5. Alquila aldeído ou precursor	122
4.8. Predições do SEA	122
4.9. Início das etapas realizadas após a data de depósito do complexo AChE humana/Donepezil ser no PDB (código 4EY7) – Parte 2.....	124
4.10. Buscas por similaridade	125
4.11. Etapas realizadas na abordagem de screening virtual baseada na similaridade.....	125
4.11.1. 1ª etapa: busca por similaridade de forma e eletrostática, seguida de experimentos de docking.....	125
4.11.2. 2ª etapa: experimentos de docking com uma restrição de similaridade	128
4.12. Comparação do modo de ligação do donepezil com o dos compostos selecionados	130
4.13. Predição de toxicidade para os compostos selecionados nesta etapa do estudo – DEREK	135
4.13.1. Hidrazina ou precursor hidrazínio.....	136
4.13.2. Aril sulfonamida.....	136

4.13.3. Fenol ou precursor fenólico.....	136
4.13.4. Ácido carboxílico substituído na posição β por um oxigênio ou enxofre ou precursores	137
4.14. QikProp – Predições de propriedades ADME	137
4.15. Predições do SEA (Similarity Ensemble Approach)	140
4.16. PASS – predição do espectro de atividade biológica.....	142
4.17. Ensaios de atividade enzimática com os compostos selecionados e adquiridos comercialmente	143
5. CONCLUSÃO	145
6. PERSPECTIVAS DESTE TRABALHO	146
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência. A demência é um nome coletivo para as síndromes cerebrais degenerativas progressivas que afetam a memória, o pensamento, o comportamento e a emoção. Os sintomas podem incluir a perda de memória, dificuldade em encontrar as palavras corretas ou entender o que as pessoas estão falando, dificuldade na realização de tarefas de rotina e alterações de personalidade e humor (<http://www.alz.co.uk>).

Como descrito no Relatório Mundial de Alzheimer em 2009 (PRINCE, M.; JACKSON, J., 2009), a ADI (do inglês, Alzheimer's Disease International) estimou que 36 milhões de pessoas em todo o mundo estão vivendo com a demência; com esse número dobrando a cada 20 anos alcançará 66 milhões de pessoas até 2030 e 115 milhões até 2050. Os custos mundiais da demência (US\$604 bi em 2010) estão na quantia de mais de 1% do PIB global de acordo com o Relatório Mundial de Alzheimer em 2010 (WIMO, A.; PRINCE, M., 2010). De maneira conjunta, esses relatórios claramente demonstram que a doença de Alzheimer está entre as mais significativas das crises de saúde, crises sociais e crises econômicas do século 21 (PRINCE, M.; BRYCE, R.; FERRI, C., 2011).

A doença de Alzheimer está se transformando cada vez mais em uma das doenças mais letais em pessoas idosas. As prevalências de demência estimada a partir de uma recente revisão mais abrangente e uma meta-análise foram substancialmente maiores do que os resultados no Relatório Mundial de Alzheimer 2009. O número de pessoas vivendo com demência no mundo inteiro em 2013 está estimado em 44,35 milhões, atingindo 75,62 milhões em 2030 e 135,46 milhões em 2050. As estimativas atualizadas são maiores do que as estimativas originais relatadas no Relatório Mundial de Alzheimer 2009 com um aumento em 15% nas estimativas para o ano de 2030 e 17% para o ano de 2050 (PRINCE, M.; GUERCHET, M.; PRINA, M., 2013).

Esta doença é descrita como a principal desordem neurológica caracterizada clinicamente pela função cognitiva prejudicada e progressivos déficits de memória, levando ao comportamento alterado e inapropriado. O transtorno cognitivo leve (ou demência) impõe um grande desafio em nossa sociedade e o envelhecimento representa o fator de risco mais importante. Os pacientes com a doença de Alzheimer têm regiões do cérebro reduzidas em tamanho devido à degeneração das sinapses e morte neural

principalmente nos processos de aprendizagem e de memória, degeneração dos lobos temporal e frontal, assim como no hipocampo (Figura 1 e 2) (GUPTA, S. et al., 2011).

Figura 1. Modificações cerebrais. 1) Cérebro sem a doença; 2) Um cérebro com Alzheimer em estágio avançado e 3) Uma sobreposição entre os dois cérebros evidenciando a perda de tecido e seu encolhimento. Adaptado de http://www.alz.org/brain_portuguese/08.asp

Figura 2. Corte transversal pela metade entre os ouvidos. No cérebro com Alzheimer o córtex encolhe, assim, as regiões envolvidas com os pensamentos, planos e lembranças se danificam. O encolhimento é principalmente grave no hipocampo, uma região do córtex que exerce papel importante na formação de novas lembranças. Os ventrículos (espaços preenchidos por fluido dentro do cérebro) ficam maiores. Adaptado de http://www.alz.org/brain_portuguese/09.asp

A DA está aliado com certo número de fatores, incluindo grande falha dos neurônios colinérgicos em várias partes do cérebro que destroem gradualmente habilidades de pensamento, memória e, finalmente, até mesmo a capacidade de realizar atividades básicas da vida diária. O diagnóstico recente e o tratamento da DA é agora um campo de pesquisa emergente, embora não exista a cura para a doença com a existência de fármacos anti-Alzheimer e apenas o tratamento sintomático é possível (AMBURE, P.; KAR, S.; ROY, K., 2014).

Além disso, a DA é conhecida por ser um transtorno neurodegenerativo caracterizado pelo acúmulo de agregados protéicos e lesões neurofibrilares que têm em sua composição peptídeos β -amiloide ($A\beta$).

Embora existam placas intra e extracelulares na maioria dos cérebros com a doença, um número substancial de placas senis é observado ocasionalmente nos cérebros de indivíduos não dementes. Isso sugere que a deposição do $A\beta$ não é a única causa de demência e que deve haver alguns fatores moleculares subjacentes ao processo amiloidogênico que fazem as placas patogênicas. Recentemente, um grupo de proteínas foi identificado e nomeado “chaperonas patológicas $A\beta$ ”, devido à habilidade de promover a transformação conformacional do $A\beta$ e estabilizar sua estrutura anormal (HOU, L. N. et al., 2014). A enzima acetilcolinesterase (AChE) é uma das chamadas chaperonas patológicas e tem recebido muita atenção em anos recentes. Como uma chaperona molecular, a acetilcolinesterase desempenha um papel na patogênese da doença de Alzheimer. Esta enzima é um alvo fundamental na concepção de fármacos contra a DA (AMBURE, P.; KAR, S.; ROY, K., 2014).

Também em relação à doença está a proteína tau hiperfosforilada associada ao microtúbulo. No entanto, a neurodegeneração não se limita a um sistema neurotransmissor específico. Os sistemas neurotransmissores glutamatérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos e peptidérgicos são também desregulados na DA, assim como os neurotransmissores colinérgicos (THATHIAH, A.; DE STROOPER, B., 2011).

Diversas linhas de evidências sugerem que déficits colinérgicos podem contribuir para a fisiopatologia da DA. Um déficit na neurotransmissão colinérgica foi estabelecido como uma característica central fisiopatológica na doença de Alzheimer. Assim, a inibição da AChE é a estratégia mais bem sucedida para os atuais tratamentos sintomáticos para a doença (AGO, Y. et al., 2011).

1.2. Acetilcolinesterase (AChE) como alvo para o planejamento de potenciais fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer

A acetilcolinesterase é uma enzima que interrompe a neurotransmissão no sistema nervoso colinérgico através da fenda neurossináptica ou na junção neuromuscular (Figura 3). De um ponto de vista toxicológico, pesticidas e agentes nervosos são, provavelmente, os compostos mais tóxicos que inibem a atividade da AChE. Portanto, o sistema nervoso colinérgico é um alvo de muitos compostos sendo

importante devido a sua significância farmacológica ou toxicológica (POHANKA, M. et al., 2012).

Figura 3. Transmissão do impulso pela sinapse colinérgica. Um estímulo elétrico faz com que a acetilcolina seja armazenada em vesículas (a) para ser enviada para a fenda sináptica (b) e reversivelmente ser depositada no receptor específico (c), isso produz outro estímulo elétrico no órgão efector (nervo, músculo ou glândula). Para prevenir o estímulo contínuo, a acetilcolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (d) em acetato e colina. Como resultado, a acetilcolina é incapaz de estimular o receptor adicional e é reabsorvida na terminação nervosa (e). A acetilcolina nova é então sintetizada (f) e novamente é guardada nas vesículas para uso posterior.

A função da enzima acetilcolinesterase é catalisar rápida e eficientemente a hidrólise da acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas para acetato e colina. A rápida destruição da acetilcolina desativa o neurotransmissor após sua ligação ao receptor, de modo a impedir seu acúmulo nas sinapses e evitar a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas. A hipótese colinérgica postula que uma disfunção na acetilcolina contribui substancialmente para o declínio cognitivo observado na doença de Alzheimer. Isto é baseado na observação de que a transmissão colinérgica tem um papel fundamental na cognição e é interrompido em pacientes com a DA. A ACh é um neurotransmissor chave envolvido na aprendizagem e na memória que se liga a subtipos de receptores distintos no cérebro: receptores nicotínicos da ACh (nAChRs) e receptores muscarínicos de ACh (mAChRs). A neurotransmissão nicotínica está implicada na patogênese da DA. Evidências adicionais sugerem que os principais subtipos de mAChR envolvidos na DA são os mAChRs M1 pós-sinápticos que medeiam os efeitos da ACh e os mAChRs M2 pré-sinápticos que inibem a liberação da ACh. A

deposição de β -amiloide pode contribuir para a disfunção colinérgica na DA diminuindo a liberação da ACh pré-sináptica e prejudicando o acoplamento do mAChRs M1 pós-sináptico com as proteínas G. Isso leva a diminuição do sinal da transdução de sinal, deficiências na cognição, uma redução nos níveis da proteína precursora amiloide (APP), a geração de mais β -amiloide neurotóxica e uma redução ainda maior na liberação de ACh (THATHIAH, A.; DE STROOPER, B., 2011).

A AChE pode ser classificada de diversas maneiras. Mecanicamente, é uma serina hidrolase. O seu sítio catalítico contém uma tríade catalítica – serina, histidina e um resíduo ácido – assim como os sítios catalíticos das serina proteases, como a tripsina, vários fatores de coagulação do sangue e outros. No entanto, o grupo ácido na AChE é um glutamato enquanto que, na maioria dos outros casos, é um resíduo de aspartato (SOREQ, H.; SEIDMAN, S., 2001). As serina hidrolases são uma das maiores e mais diversificada classe de enzimas encontradas na natureza. Estas enzimas que incluem as lipases, esterases, tioesterases, amidases, peptidases e proteases, todas utilizam um nucleófilo de serina base-ativada para clivar amida ou éster (ou tioéster) ligado em substratos através de um intermediário covalente acil-enzima (BACHOVCHIN, D. A.; CRAVATT, B. F., 2012).

Em um primeiro passo, a enzima é acetilada e a colina (Ch) é liberada; uma molécula de água, em seguida, regenera a enzima livre com concomitante liberação de ácido acético (XU, Y. et al., 2010). No Esquema 1, a seguir, é mostrada como a AChE promove a hidrólise de ACh formando um intermediário acetil-AChE com a liberação de colina e a subsequente hidrólise do intermediário para a liberação do acetato.

(Esquema 1)

A natureza nucleofílica do carboxilato é transferida através do anel imidazol da histidina para o grupo hidroxila da serina, permitindo-lhe deslocar o meio de colina do substrato, formando um intermediário acetil-enzima. A etapa de hidrólise subsequente libera o grupo acetato (Esquema 2). A compreensão das propriedades catalíticas da proteína tem ajudado na compreensão da sua inibição por organofosforados e inibidores carbamatos (SOREQ, H.; SEIDMAN, S., 2001).

(Esquema 2)

A AChE provou ser o alvo terapêutico mais viável para melhora sintomática na doença de Alzheimer porque o déficit colinérgico é uma descoberta recente e consistente nesta doença (MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M., 2012). A DA tem sido associado a vários fatores tais como o estresse oxidativo, distúrbios neuroinflamatórios, anormalidades mitocondriais, enovelamento incorreto da proteína e agregação. A baixa atividade colinérgica em pacientes com DA conduziu a uma hipótese conhecida como a hipótese colinérgica. Esta hipótese afirma que a doença é associada com a disfunção colinérgica que causa a perda da memória (REMYA, C. et al., 2012).

Experiências clínicas mostraram que todos os fármacos utilizados atualmente como o donepezil, a rivastigmina e a galantamina, representam formas de terapia sintomática; porém, existe uma razão para suspeitar de seu envolvimento em certos efeitos modificadores da doença incluindo a formação do peptídeo β -amiloide e a neuroproteção. Os inibidores de AChE podem interagir no sítio ativo catalítico da enzima assim como em seu sítio de ligação aniônico periférico (chamado em inglês de “Peripheral Anionic Site” e reduzido para a sigla PAS que será utilizada neste trabalho ao citar esse sítio), no qual supõem-se possuir a habilidade de se ligar peptídeos $\text{A}\beta$, assim, promovendo a fibrilogênese. Os inibidores que atuam inibindo o sítio duplo da AChE influenciam na hidrólise da acetilcolina e influenciam a agregação da β -amiloide que é dependente do PAS. Compostos com estas propriedades podem ser definidas como ligantes multi-alvos. A estratégia do desenvolvimento *in silico* de ligantes multi-alvo é uma abordagem atrativa para buscar novos fármacos eficazes para o tratamento de distúrbios com mecanismos patológicos complexos tais como a doença de Alzheimer. Assim, existe uma razão para desenvolver novos inibidores do sítio de

ligação duplo das AChE multipotentes. Nos últimos anos muitos inibidores do sítio de ligação duplo da AChE com propriedades anti-agregação de β -amiloide foram descritos e coletados em artigos de revisão (IGNASIK, M. et al., 2012).

Enormes esforços têm sido feitos na pesquisa para entender a patogênese molecular da DA nas últimas décadas. Entretanto, o único tratamento sintomático baseado na hipótese colinérgica tendo um direcionamento à enzima AChE é uma das maiores estratégias terapêuticas adotadas para o alívio sintomático na doença. Essa hipótese provou ser bem sucedida, hoje, pelo uso efetivo de inibidores da AChE, entretanto, pacientes que foram submetidos a esses medicamentos mostraram apenas modesta recuperação com alguns efeitos adversos (GUPTA, S.; MOHAN, C. G., 2014).

1.3. A estrutura cristalográfica da enzima AChE: análise estrutural da enzima e do sítio PAS

As propriedades bioquímicas únicas e a significância fisiológica da AChE faz dela um alvo interessante para detalhada análise da função-estrutura. As sequências codificantes da AChE foram clonadas até agora de uma gama evolutivamente diversa de espécies de vertebrados e de invertebrados que inclui insetos, nematoides, peixes, répteis, aves e vários mamíferos, entre eles o homem. Os dados sequenciais foram logo seguidos pelo primeiro modelo cristalográfico da AChE de *Torpedo californica* (Figura 4) que historicamente tem sido uma das principais fontes de AChE para a pesquisa. Mais tarde, estruturas cristalográficas de rato, *Drosophila* e homem foram obtidas e consideradas, fundamentalmente, similares (SOREQ, H.; SEIDMAN, S., 2001). A determinação da estrutura cristalográfica da AChE de *Torpedo californica* permitiu a visualização, pela primeira vez à uma resolução atômica, de uma cavidade de ligação para a acetilcolina. As várias formas oligoméricas de AChE de órgãos elétricos de peixes elétricos, *Electrophorus electricus* e *Torpedo californica*, são estruturalmente similares à aquelas em nervos e músculos de vertebrados (DVIR, H. et al., 2010).

Figura 4. Monômero da acetilcolinesterase: uma proteína alfa/beta que contém 537 aminoácidos e consiste de uma mistura de 12 folhas beta envolvida por 14 alfa-hélices.

Com respeito à estrutura cristalográfica da AChE, seu sítio ativo é composto por vários subsítios: um esterásico, também chamado de tríade catalítica, uma cavidade oxiânion, um subsítio aniônico, uma cavidade de ligação acil e um subsítio aniônico periférico. No sítio de ligação esterásico e no sítio de ligação de colina, os grupos carbonil e amônio quaternário da acetilcolina ligam-se, respectivamente. O sítio de ligação de colina, chamado periférico está distante 14 Å do sítio ativo (KRYGER, G. et al., 1998). No sítio ativo da enzima os resíduos de aminoácidos Ser200, Glu327 e His440 são essenciais para a atividade catalítica e são conhecidos como a tríade catalítica fazendo parte do sítio esterásico (HAREL, M. et al., 1993 & BARTOLUCCI, C. et al., 2010).

O sítio ativo da AChE é preenchido por 14 resíduos de aminoácidos aromáticos, os anéis de cada um deles compõem cerca de 70% da cavidade, destacando o Trp84 que faz uma interação cátion- π com o grupo quaternário da acetilcolina e a Phe330 que também está envolvida no reconhecimento de ligantes quaternários. A cavidade oxiânion é formada pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Gly118, Gly119 e Ala201. Os resíduos de aminoácidos Trp84, Tyr130, Glu199, Gly441 e Ile444 fazem parte do subsítio aniônico. Os resíduos de aminoácidos que compõem a cavidade de ligação acil são o Trp233, Phe288, Phe290 e Phe331. O sítio aniônico periférico é composto pelo resíduo de aminoácido Asp72, Tyr121, Ser122, Trp279, Phe330 e Tyr334. Em

particular, o Trp84 é o responsável pelas interações cátion- π com o grupo quaternário do substrato, enquanto que a Tyr70 e o Trp279 contribuem para o sítio aniônico periférico na entrada da cavidade e serve como comutação do tráfego molecular para o substrato em direção ao sítio ativo. O Trp233, a Phe288 e a Phe290 constituem a cavidade de ligação acil que determina a especificidade desta enzima à ACh. Do meio para baixo da cavidade, existe um afunilamento formado pelos resíduos de Tyr121 e de Phe330 (Figura 5).

Figura 5. Cavidade do sítio ativo da enzima AChE. Em destaque, representado pelo círculo vermelho tracejado está o afunilamento causado pelos resíduos de aminoácidos Phe330 e Tyr121.

Enquanto a Tyr121 está fixa em toda estrutura cristalina, a Phe330 atua como uma porta oscilante, este resíduo é bastante flexível e adota diferentes conformações para interagir através de interações de empilhamento- π ou de cátion- π com os ligantes que possam se ligar nessa região (BARTOLUCCI, C. et al., 2010).

Os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo das espécies *Electrophorus electricus* e *Homo sapiens*, são os mesmos em relação à espécie *Torpedo californica* anteriormente descritos, apenas há uma mudança na numeração destes e uma mutação em relação a Tyr337 no subsítio aniônico periférico nas espécies *Electrophorus electricus* e *Homo sapiens*, essa mutação será discutida posteriormente (Tabela 2). Inibidores biquaternários da AChE têm um maior poder de inibição sobre

inibidores monoquaternários devido à sua habilidade de interagir com esses dois sítios aniônicos (FELDER, C. E. et al., 2002).

Tabela 2. Comparação dos resíduos de aminoácidos da enzima AChE de três diferentes espécies, destacando a substituição de um resíduo de tirosina por um de fenilalanina na enzima de *Torpedo californica*.

Resíduos de aminoácidos da AChE da espécie <i>Torpedo californica</i>	Resíduos de aminoácidos da AChE da espécie <i>Electrophorus electricus</i>	Resíduos de aminoácidos da AChE da espécie <i>Homo sapiens</i>
Ser200	Ser203	Ser203
His440	His447	His447
Glu327	Glu334	Glu334
Gly118	Gly121	Gly121
Gly119	Gly122	Gly122
Ala201	Ala204	Ala204
Trp84	Trp86	Trp86
Tyr130	Tyr133	Tyr133
Glu199	Glu202	Glu202
Gly441	Gly448	Gly448
Ile444	Ile451	Ile451
Trp233	Trp236	Trp236
Phe288	Phe295	Phe295
Phe290	Phe297	Phe297

Phe331	Phe338	Phe338
Asp72	Asp74	Asp74
Tyr121	Tyr124	Tyr124
Ser122	Ser125	Ser125
Trp279	Trp286	Trp286
Phe330	Tyr337	Tyr337
Tyr334	Tyr341	Tyr341

Estes aminoácidos cobrem todo o sítio ativo da AChE que encontra-se ao fundo de uma cavidade profunda de 20Å aproximadamente no centro da molécula (Figura 6).

Figura 6. A entrada do sítio ativo ao centro da enzima AChE.

O alto conteúdo aromático das paredes e da base da cavidade do sítio ativo, juntamente com as suas dimensões pode ajudar a explicar porque estudos bioquímicos revelaram uma variedade de sítios de ligação hidrofóbicos e aniônicos distintos do sítio ativo ou sobrepostos a ele. Os ligantes do sítio aniônico periférico que ficam empilhados entre as cadeias laterais do Trp279 e Phe330 ocluem a cavidade do sítio ativo. Assim, a ligação de qualquer molécula neste local iria bloquear a entrada de

substratos e a saída de produtos da base do sítio ativo. Portanto, este bloqueio pode ter uma importante significância funcional (DVIR, H. et al., 2010).

Devido ao incomum poder catalítico da AChE ($1000-10.000\text{ s}^{-1}$, dependendo da espécie), o profundo confinamento de seu sítio ativo veio como uma surpresa. Consequentemente, o tráfego de substrato e produtos dentro da cavidade do sítio ativo tem sido objeto de intensas pesquisas, acompanhada por uma considerável controvérsia visando a compreensão de como a incomum estrutura da AChE está relacionada a sua função. (XU, Y. et al., 2010).

A acetilcolinesterase é um alvo conhecido para muitas substâncias biologicamente ativas, exibindo uma ampla gama de atividades: do uso terapêutico para o tratamento da doença de Alzheimer, a pesticidas e agentes de envenenamento causando ação paralisante do nervo. Essa diversidade de respostas biológicas para a inibição da AChE por substâncias químicas pode ser explicada principalmente por diferenças no mecanismo inibitório que estão associadas com a existência de vários sítios de ligação no sítio ativo desta enzima (a tríade catalítica e um sítio de ligação periférico).

Os três mecanismos de interação da AChE com inibidores foram reconhecidos. O primeiro inclui ligação irreversível que é típico para a maioria dos compostos organofosforados: este mecanismo envolve a fosforilação da enzima com a formação de uma ligação covalente entre o átomo de fósforo do composto organofosforado e o átomo de oxigênio do grupo hidroxila da serina da tríade catalítica. A subsequente reação de eliminação geralmente incluindo desalquilação ou desaminação do conjugado de fósforo produz tal forma a enzima que não pode ser reativada por antídotos conhecidos como oximas. O segundo mecanismo, inibição pseudo-irreversível da AChE, também inclui a formação de ligação covalente com o resíduo de serina; entretanto, neste caso, a enzima sofre reativação espontânea rápida. Este mecanismo é típico para derivados carbamatos e alguns compostos organofosforados. O terceiro mecanismo, inibição reversível, é normalmente típico para compostos de várias classes químicas que interagem com o sítio aniônico periférico; este último está envolvido em uma interação de linha-cruzada com o sítio ativo. Neste caso, a inibição ocorre devido à ligação de hidrogênio, empilhamento- π ou interação elétron- π . Este mecanismo é típico para a tacrina, derivados da galantamina, E2020, etc (TIKHONOVA, O. V. et al., 2011).

1.3.1. Análise estrutural da enzima AChE e o sítio PAS

O sítio ativo periférico – PAS – foi provado ter uma estreita relação tanto com a hidrólise da acetilcolina (ACh) quanto para a cascata neurotóxica da DA através da agregação do peptídeo β -amiloide (A β) induzido pela AChE (CHEN, Y. et al., 2012).

Os estudos de ligantes da AChE demonstraram dois sítios de interação, o sítio ativo catalítico (CAS, sigla do inglês “Catalytic Anionic Site”) ao fundo da cavidade e o sítio aniônico periférico (PAS) próximo a entrada da cavidade. As estruturas tridimensionais dos complexos AChE-ligante revelam uma cavidade do sítio ativo estreita e profunda e indica que ligantes específicos para o sítio de acilação, na base da cavidade, devem primeiro atravessar o sítio periférico próximo a entrada da cavidade. Em estudos recentes na tentativa de esclarecer o papel do sítio periférico pela via catalítica da AChE, foi mostrado que ligantes que se ligam especificamente ao sítio periférico podem diminuir as taxas em que outros ligantes entram e saem do sítio de acilação, uma característica chamada de bloqueio estérico (MALLENDER, W. D.; SZEGLITES, T.; ROSENBERRY, T. L., 2000).

Os inibidores da AChE ligam-se ao sítio ativo catalítico (CAS), ou ao sítio aniônico periférico (PAS), ou eles abrangem os dois sítios, assim, ocupando a maior parte da cavidade do sítio ativo. O sítio aniônico periférico na AChE, localizado na entrada da cavidade do sítio ativo, engloba a sobreposição de sítios de ligação para ativadores alostéricos e inibidores. Os inibidores do PAS, como já mencionado, limitam a taxa catalítica por bloqueio estérico e eletrostático do ligante trafegando através da cavidade e alterando a conformação do sítio ativo. Estudos estruturais e mutagênicos revelaram o papel funcional dos resíduos Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 e Tyr334 no PAS. Um aglomerado de resíduos hidrofóbicos que interagem com o PAS da enzima e ocluem estericamente o acesso do substrato ao sítio catalítico (BOURNE, Y. et al., 2006).

Vários estudos iniciais forneceram evidências de que alguns inibidores da AChE ligam-se no sítio catalítico (inibidores competitivos) enquanto outros podem influenciar os parâmetros do estado estacionário por associação com um sítio alostérico remoto a partir do sítio ativo. Os inibidores do PAS inibem a catálise através de uma combinação de bloqueio estérico dos ligantes entrando e deixando a cavidade e por alteração alostérica da conformação da tríade catalítica e de sua eficiência. Evidências para as funções não catalíticas da AChE sugeriram que o PAS, além de seu papel na regulação alostérica da hidrólise catalisada pela AChE da acetilcolina liberada, também medeia a

associação de proteínas heterólogas que contribuem para o reconhecimento da célula e processos de adesão durante a sinaptogênese e para a nucleação dos peptídeos amiloide durante o aparecimento da doença de Alzheimer (BOURNE, Y. et al., 2003).

1.3.2. Deposição do peptídeo β -amiloide e agregação

A agregação é o resultado de alterações em proteínas como em peptídeos amiloides ou devido às reações químicas de proteínas com açúcares como na diabetes. Como a agregação é uma propriedade comum de qualquer cadeia polipeptídica, os agregados nativos e amiloides podem ser vistos a partir de uma origem comum da população de moléculas parcialmente desdobradas e de interconversão. Certo número de severas patologias humanas é baseado na deposição extracelular de agregados de proteínas insolúveis conhecidas como fibrilas amiloides. Portanto, pode haver vários tipos de agregados, incluindo agregados desordenados e amorfos, mas as fibrilas amiloides são mais características (NAEEM, A.; FAZILI, N. A., 2011).

Em adição a sua atividade catalítica, a AChE tem sido considerada, recentemente, como uma importante chaperona para a agregação $A\beta$. O evento do dobramento/enovelamento de proteínas é principalmente controlado por chaperonas moleculares, mas por elas mesmas não há um aumento das taxas de etapas individuais no dobramento de proteínas, ao invés disso, elas aumentam a eficiência do processo global reduzindo a probabilidade de reações concorrentes, particularmente, a agregação (NAEEM, A.; FAZILI, N. A., 2011).

A AChE está colocalizada com o $A\beta$ nos depósitos difusos pré-amiloides, placas senis maduras e vasos sanguíneos no cérebro de pacientes com a DA. Os estudos também descobriram que a quantidade total e atividade da AChE em cérebros com a doença é reduzido, enquanto que aquelas enzimas nas placas amiloides estão aumentadas. Além disso, estudos *in vitro* revelaram que a AChE é capaz de induzir a agregação $A\beta$ e formar complexos estáveis AChE- $A\beta$ que são mais tóxicos que os $A\beta$ agregados. Portanto, acredita-se que o incremento do local da AChE em áreas específicas do cérebro é culpado por desencadear a agregação $A\beta$ e deposição e, eventualmente, causa eventos neuropatológicos e comportamentais em pacientes com a DA. Entretanto, o mecanismo de interação AChE- $A\beta$ não foi definido claramente. O sítio aniônico periférico (PAS) na AChE foi determinado a ser o sítio de ligação do $A\beta$.

A AChE é pensada induzir a agregação A β através do PAS por mediar interações eletrostáticas com a área catiônica do A β . Recentemente, a estratégia do ligante bivalente foi usada para desenvolver inibidores da AChE como efeito de ligação duplo, visando o sítio ativo catalítico e o periférico. Tais inibidores podem melhorar o déficit cognitivo elevando os níveis de ACh e atrasando a formação das placas amiloides em modelos de DA (HOU, L. N. et al., 2014).

1.4. Inibidores da AChE

Os inibidores da AChE pertencem a diferentes classes químicas tais como, piperidina, tetra-hidro-acridina, tetrahidroazepina e carbamatos. Assim, é importante saber os principais parâmetros da classe diversa de inibidores da AChE, atuando neste alvo (GUPTA, S. et al., 2011).

Os inibidores da AChE não atacam a causa da doença que cria a neurodegeneração, ao invés disso, eles são os responsáveis por prevenir o progresso da doença. A administração de inibidores da AChE representa uma proposta para o tratamento da DA desde a sua correlação com a enzima e a formação do peptídeo β -amiloide (Bazzini, P.; Wermuth, C. G., 2008).

Existem quatro fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Alzheimer: galantamina, rivastigmina, donepezil e memantina. Os três primeiros são inibidores da AChE enquanto a memantina não é. A memantina é um antagonista não-competitivo de N-metil-D-aspartato (NMDA) e atua na melhoria moderada na memória e funções cognitivas (ROY, K. K. et al., 2008 & MEHTA, M. et al., 2012).

A fisostigmina, também conhecida como Eserina, foi o primeiro inibidor da acetilcolinesterase investigado para o tratamento da doença de Alzheimer. Este inibidor é normalmente usado para o tratamento do glaucoma. Por ele também ser um inibidor reversível da AChE, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, ele foi testado para o tratamento da DA (MARQUES, L. A. et al., 2011). Ela é isolada das sementes de *Physostigma venenosum* como um alcaloide vegetal parassimpatomimético. Embora ela seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), ela tem uma meia-vida curta e um estreito índice terapêutico. Ela também tem muitos efeitos colaterais tais como náusea, vômitos, dores de cabeça, diarreia e tontura. A fisostigmina estava em uso para myasthenia gravis, glaucoma e esvaziamento gástrico retardado. No entanto, o

fármaco não foi aprovado e foi abandonado para o uso em doença de Alzheimer devido a suas desvantagens mencionadas acima. Os novos fármacos provaram ser mais efetivos com um menor perfil de efeitos colaterais (MEHTA, M. et al., 2012).

Os fármacos como a rivastigmina, donepezil, galantamina e tacrina são inibidores de serina hidrolase humana e foram aprovados para o uso clínico. O alvo preferencial destes fármacos é a enzima AChE e seu uso é indicado para a demência associada a doença de Alzheimer.

A tacrina (Cognex) foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da doença de Alzheimer em 1993, sendo um inibidor reversível de ação central da AChE. Ela é um potente inibidor tanto da AChE quanto da butirilcolinesterase (BuChE). No entanto, o uso generalizado da tacrina foi limitado uma vez que causou um número de efeitos colaterais incluindo náusea, vômito, tontura, diarreia, convulsões e síncope. Além disso, a administração e a complacência foram desafiadoras devido a um regime posológico de quatro vezes por dia por causa de sua meia-vida curta. Ainda, para pacientes que usavam o fármaco era requerido um periódico monitoramento sanguíneo devido à hepatotoxicidade. Finalmente, a tacrina foi descontinuada devido a referida toxicidade ao fígado que foi pensado ser causado por sua afinidade a BuChE e por causa da menor toxicidade, fármacos com tolerância melhor com uma programação mais fácil de dosagem foram aprovados (MEHTA, M. et al., 2012 & MARQUES, L. A. et al., 2011).

A tacrina (1,2,3,4-tetrahidroacridina) estabelece fortes interações com o sítio de ligação de colina da AChE, porém não estabelece interações com o sítio periférico. Existe uma interação do tipo empilhamento- π entre o anel quinolínico da tacrina e o anel indólico do aminoácido Trp84. O átomo de nitrogênio protonado do anel quinolínico do tautômero da tacrina estabelece ligação de hidrogênio diretamente com a carbonila da cadeia principal do aminoácido His440, componente da tríade catalítica, e ainda, o anel quinolínico dispõe-se paralelamente e em contato com o grupo fenil do aminoácido Phe330.

O donepezil (Aricept) foi aprovado em 1996 para o tratamento da doença de Alzheimer de leve a moderada. É um inibidor reversível da AChE baseado em piperidina com uma significativa baixa afinidade para a BuChE. Cogita-se também de este fármaco ter um mecanismo de ação adicional que não seja apenas como um inibidor de acetilcolinesterase. Acredita-se que o donepezil não só atue apenas ao nível neurotransmissor, mas também a um nível molecular e celular em quase todos os

estágios envolvidos com a patogênese da doença de Alzheimer. Isso inclui, mas não limitados a isso, induzir uma isoforma neuroprotetora da AChE, bloqueando vários aspectos da cascata de excitotoxicidade induzido pelo glutamato abrandando os efeitos de estresse oxidativo e reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias. O donepezil é aprovado para uso em doença de Alzheimer brando, moderada e severa, mas não para outras formas de demência. Isso mostrou alguns benefícios no comprometimento cognitivo leve, mas não está aprovado para esta indicação (MEHTA, M. et al., 2012 & MARQUES, L. A. et al., 2011).

Os três segmentos de donepezil [R,S-1-benzil-4-(5,6-dimetoxi-1-indanon-2-il)-metilpiperidina] interagem ao longo de toda a extensão do sítio ativo da AChE, estabelecendo com esta enzima interações específicas, sendo que algumas destas interações são intermediadas por moléculas de água. O Donepezil interage com a enzima utilizando os grupos: i) benzílico; ii) nitrogênio piperidínico e iii) dimetoxi indanona. Este fármaco estabelece interações principalmente por empilhamento- π com resíduos de aminoácidos aromáticos presentes no sítio ativo enzimático, além de interações hidrofóbicas.

A interação com o sítio de ligação de colina ocorre pela interação do grupo benzílico da molécula de donepezil com o grupo indol do aminoácido Trp84, presente na cavidade enzimática. O donepezil não interage diretamente com a tríade catalítica (Ser200, His440 e Glu327), a não ser por intermédio de moléculas de água. Na região mediana da cavidade enzimática, localizada entre o sítio de ligação de colina e o sítio periférico, o átomo de nitrogênio piperidínico do ligante, contendo carga positiva, estabelece uma interação cátion- π com o grupo fenil do aminoácido Phe330 da cavidade enzimática. Adicionalmente, o resíduo Tyr334 forma com Phe330 e o anel piperidínico de donepezil um domínio do tipo “cálice”.

Portanto, a interação com Phe330 representa um sítio adicional de ligação quaternária, de significância funcional, na região mediana da cavidade do sítio ativo. No sítio periférico, o anel de indanona interage com o grupo indólico do aminoácido Trp279, através de uma clássica interação de empilhamento- π .

A rivastigmina (Exelon) é uma molécula pequena e tem fácil permeabilidade a barreira hematoencefálica. É um inibidor da AChE pseudo-irreversível do tipo carbamato. Ela também tem propriedades inibitórias para a BuChE e para a AChE. A rivastigmina foi aprovada para o tratamento da doença de Alzheimer de leve a moderada no ano 2000 e desde então ganhou aprovação para demências relacionadas com

Parkinson. Em 2007, a rivastigmina foi reformulada para a entrega através de um sistema transdérmico. Isso resultou em uma significativa diminuição de efeitos colaterais gastrointestinais comparados a cápsula oral. Ele é adequado para ser convertido para um sistema de entrega porque ela é uma molécula pequena (<300 Da em tamanho) e é tanto lipofílica quanto hidrofílica (MEHTA, M. et al., 2012 & MARQUES, L. A. et al., 2011).

Após se ligar ao sítio ativo da AChE, a rivastigmina é metabolizada em duas partes, uma chamada meio carbamil e a outra chamada NAP. A porção carbamil da rivastigmina é posicionada para fazer duas ligações de hidrogênio com os nitrogênios da amida dos resíduos Ala201 e da Gly119, assim como fazem contatos de van der Waals com os resíduos de Phe288 e Phe290. O NAP, a segunda parte da rivastigmina, faz ligações de hidrogênio com três moléculas de água e com o nitrogênio da amida do resíduo da Gly118, assim como fazem contatos de van der Waals com o Trp84 e com a Phe330.

A ação terapêutica da galantamina (Nivalin, Razadyne, Razadyne ER, Reminyl, Lycoremine) foi relatada para ser produzida principalmente pela sua ação de sensibilização em receptores nicotínicos de acetilcolina ao invés de melhora geral colinérgica devido à inibição da AChE. A galantamina foi aprovada para o tratamento da doença de Alzheimer de leve a moderada em fevereiro de 2001, sendo o fármaco mais recentemente aprovado para o tratamento da DA (MEHTA, M. et al., 2012 & MARQUES, L. A. et al., 2011).

A estrutura cristalográfica do complexo AChE-galantamina revelou que esse inibidor está situado no fundo da cavidade do sítio ativo da enzima e interage com o Trp84. Apenas uma ligação de hidrogênio direta é formada entre o inibidor e a cadeia lateral de um dos resíduos, e esta ligação ocorre entre o grupo hidroxila do inibidor e o Glu199. Uma segunda interação é possível entre o hidrogênio da Ser200 e o grupo O-metóxi da galantamina, mas uma melhor forma de ligação seria uma ligação bifurcada com a His440 da tríade catalítica. O resto das possíveis ligações de hidrogênio envolve moléculas de água ligadas à enzima. A associação relativamente apertada observada para este inibidor da AChE ganha uma favorável contribuição entrópica (energia livre de ligação) devido à natureza rígida do inibidor e ao deslocamento de algumas moléculas de água presentes na estrutura nativa (DOUCET-PERSONENI, C. et al., 2001).

1.5. Acetilcolinesterase humana

A AChE humana (hAChE) consiste de três sítios principais: a tríade catalítica – um sítio ativo aniônico, um sítio ativo periférico (PAS) e uma longa e estreita cavidade hidrofóbica que conecta o sítio aniônico e o PAS. A tríade catalítica é composta da Ser203 (um resíduo reativo cataliticamente), His447 e Glu334, todos estão posicionados no sítio ativo aniônico. O PAS que contém o amino quaternário positivo da ACh envolve vários resíduos aromáticos Tyr72, Asp74, Trp86, Tyr124, Trp286 e Tyr341. Sua função é guiar a orientação da parte carregada do substrato no sítio ativo e também oferece um sítio de ligação putativo para inibidores alostéricos.

Existem 14 resíduos aromáticos (Tyr72, Trp86, Phe123, Tyr124, Tyr133, Trp236, Trp286, Phe295, Phe297, Tyr337, Tyr341, Phe338, Trp439 e Tyr449) que revestem a cavidade hidrofóbica. Estes 14 aminoácidos são bem conservados entre espécies diferentes e o Trp86 é altamente importante para a ligação da ACh uma vez que a mutação resulta em diminuição de 3000 vezes na reatividade (AMBURE, P.; KAR, S.; ROY, K., 2014).

A cavidade aromática no sítio ativo é aproximadamente 20 Å de profundidade e penetra a meio caminho da hAChE. A interação entre a enzima hAChE e conhecidos inibidores potentes tais como o donepezil ou a tacrina é caracterizada por interações π -cation entre os resíduos aromáticos conservados (especialmente o Trp86) e átomos protonados desses inibidores. Além disso, interações de empilhamento- π entre os resíduos aromáticos acima mencionados e os grupos aromáticos presentes nos inibidores e as interações iônicas entre o aniônico Asp74 e os átomos protonados dos inibidores desempenham uma função vital na ligação receptor-ligante.

A maioria dos ligantes é colocada na base da cavidade hidrofóbica, enquanto que ligantes maiores, como o donepezil, estendem-se até a abertura da cavidade. Notavelmente, os ligantes que ligam a ambos os sítio aniônico e PAS são conhecidos como inibidores do sítio duplo de ligação.

1.5.1. A estrutura cristalográfica da acetilcolinesterase humana em complexo com o donepezil

Recentemente resolvida, Cheung e colaboradores (CHEUNG, J. et al., 2012) mostraram que o donepezil liga-se de forma diferente a AChE humana em comparação

a enzima de *Torpedo californica* demonstrando, assim, como a enzima humana é mais precisa para o estudo de ligação de fármacos. Demonstraram também que a ligação do donepezil a AChE humana é mais complexa e envolve resíduos que alcançam todo o comprimento da cavidade do sítio ativo.

O donepezil é uma mistura racêmica de enantiômeros R e S e ambas ligam-se a AChE humana com afinidades similares e o enantiômero R, após um refinamento, produziu uma melhor adequação a densidade eletrônica do que o enantiômero S, portanto, o modelo cristalográfico contém apenas a forma R (CHEUNG, J. et al., 2012).

A porção 5,6-dimetóxi-1-indanona está cercada pelos resíduos Tyr72, Leu289 e Trp286 através de interações hidrofóbicas na entrada da cavidade do sítio de ligação. Entre as interações realizadas, o grupo indanona forma uma interação de empilhamento π com o anel indol do Trp286 no PAS, enquanto que o grupo 5,6-dimetóxi interage com a Leu289 e com o Trp286 através de interações hidrofóbicas. O grupo carbonila da porção 5,6-dimetóxi-1-indanona, como um aceitador, forma uma interação de ligação de hidrogênio com o grupo NH da Phe295 (Figura 7). Esta interação do grupo carbonila pode parecer, inicialmente, intrigante tendo em vista o fato de que um homólogo do donepezil, que não possuía este grupo, foi relatado como sendo inativo. As sugestões baseadas na estrutura relatam que a interação feita pelo grupo carbonila do inibidor ajuda a orientar a porção indanona a fazer interações favoráveis com o anel indol do Trp286. No composto homólogo que não possui o grupo carbonila, a porção indanona seria menos restrita e faria, conseqüentemente, uma fraca interação com o Trp286 (KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L., 1999).

Figura 7. Estrutura cristalográfica da AChE humana em complexo com o donepezil. Os resíduos de aminoácidos em destaque alcançam todo o comprimento da cavidade do sítio ativo.

A região no meio da cavidade do sítio de ligação da enzima AChE humana é muito estreita e hidrofóbica com a presença de resíduos de aminoácidos com anéis aromáticos (Tyr124, Tyr337 e Phe338).

Próximo ao fundo da cavidade do sítio de ligação, uma face do anel benzeno exibe uma clássica interação de empilhamento- π com o anel indol do resíduo Trp86, ocupando, assim, o sítio de ligação para ligantes quaternários.

Dados estruturais da enzima acetilcolinesterase humana em complexo com fármacos anti-doença de Alzheimer estiveram disponíveis apenas recentemente e têm mostrado o quão importante é analisar os complexos formados com a enzima humana em relação a AChE de outras espécies. Em suma, a enzima humana é um melhor modelo de partida do que a enzima de *Torpedo californica* para o desenvolvimento de fármacos baseados na estrutura, modelagem, docking e cálculos de dinâmica molecular (CHEUNG, J. et al., 2012).

1.6. Screening virtual baseado na similaridade e múltiplos métodos de busca

Os custos sempre crescentes da descoberta de fármacos resultaram no desenvolvimento de muitas técnicas para screening virtual. Uma das técnicas mais simples e mais amplamente utilizada é a busca por similaridade em que uma conhecida estrutura bioativa de referência é procurada em uma base de dados para identificar as moléculas mais similares, uma vez que essas são as mais prováveis de exibir bioatividade de interesse (HOLLIDAY, J. D. et al., 2011)

O screening virtual usando tanto técnicas baseadas na estrutura e no ligante é hoje uma parte integrante do processo de descoberta de fármacos. Os métodos baseados na estrutura exigem o conhecimento sobre a estrutura tridimensional do alvo, enquanto que as abordagens baseadas no ligante usam a informação de no mínimo um ligante conhecido. O método de escolha muitas vezes depende da quantidade de informação que está disponível. Quando possível, tanto os métodos baseados na estrutura quanto no ligante podem ser usados juntos. Muitas vezes, isso é feito de uma forma sequencial filtrando o número de compostos em cada etapa. Um método comum é o docking molecular, isto é, o ajuste de moléculas ligantes dentro do sítio ativo de uma proteína para prever a afinidade de ligação. Outras estratégias envolvem o screening em bases de dados de compostos por correspondências em sítios farmacofóricos que, por sua vez, são considerados importantes para a atividade biológica e para o screening por similaridade baseados no princípio que compostos com as mesmas formas moleculares têm propriedades similares (SVENSSON, F.; KARLEN, A.; SKOLD, C., 2012).

1.6.1. Similaridade

Uma estratégia comumente aplicada durante o processo de triagem virtual baseada em ligantes consiste na busca por similaridade. O princípio da propriedade de similaridade preconiza que moléculas estruturalmente similares possuem alta probabilidade de compartilharem também propriedades físico-químicas e atividades biológicas semelhantes (HENDRICKSON, J. B., 1991). Entretanto, a similaridade e dissimilaridade entre estruturas químicas não são assim objetivamente definidas. Existem várias relações entre a estrutura e a atividade que demonstram que compostos similares podem ter atividades biológicas diferentes (KUBINYI, H., 2002).

Kubinyi, H. (2002), em seu trabalho sobre a similaridade química e atividades biológicas afirma que simples mudanças bioisostéricas de átomos e grupos em alguns compostos biologicamente ativos podem resultar em efeitos inesperados, alguns desses efeitos incluem até novos modos de ação. O que deve ser levado em consideração sobre a similaridade e a diversidade de moléculas é sua dependência em relação à estrutura alvo tridimensional, assim como as propriedades do sítio de ligação do alvo biológico, ou seja, sua complexação ao receptor biológico.

As buscas por similaridade consistem em uma das estratégias de screening mais simples e com menor gasto computacional. Na aplicação desta estratégia, como em qualquer busca baseada em ligantes, o ponto de partida corresponde à seleção de uma ou mais moléculas com atividade biológica conhecida, essas são chamadas estruturas-alvo ou de referência, e através da triagem em bases de dados de moléculas virtuais é possível filtrar moléculas que são estruturalmente mais similares às de referência. A lista de moléculas resultante da triagem distingue as moléculas mais prováveis de exibir propriedades similares às da(s) estrutura(s) de referência, tornando-as naturalmente em candidatas para testes biológicos. Assim, se o princípio de similaridade é aplicável, um conjunto de moléculas que ainda não foi testado para atividade biológica, mas que compartilha similaridade estrutural a uma ou mais moléculas bioativas de referência, apresenta, portanto, alta probabilidade de fornecer substâncias também bioativas (WILLETT, P., 2006).

Do ponto de vista prático, para efetuar a comparação entre duas moléculas é necessário empregar um padrão de medida, também conhecido como coeficiente de similaridade, o qual quantificará o grau de semelhança entre as entidades químicas avaliadas. Existem inúmeros coeficientes de medida (Tabela 3), sendo que o mais empregado em triagens virtuais é o coeficiente de Tanimoto. Nos coeficientes de similaridade, o termo “a” representa o número de características presentes em uma molécula A e ausente em uma molécula B, o termo “b” representa o número de características presentes em B, mas ausentes em A, o termo “c” representa o número de características comuns às moléculas A e B. Outro termo aparece nas fórmulas de medidas de similaridade que é o termo “d”, este termo representa o número de características que está ausente em ambas as moléculas (Gasteiger, J.; Engel, T., 2003).

Tabela 3. Expressão de alguns coeficientes de similaridade.

Coeficiente	Expressão
1. Coeficiente de combinação simples	$(c + d) \div (a + b + c + d)$
2. Tanimoto, Jaccard	$c \div a + b - c$
3. Dice, Sorensen, Czekanowski, Hodgkin-Richards	$c \div 0.5 [(a + c) + (b + c)]$
4. Cosine, Ochiai, Carbo	$c \div \sqrt{(a + c)(b + c)}$

5. Russell/Rao	$c \div (a + b + c + d)$
6. Rogers/Tanimoto	$(c + d) \div (2a + 2b + c + d)$
7. Baroni-Urbani/Buser	$(\sqrt{c \times d} + c) \div (\sqrt{c \times d} + a + b + c)$
8. Kulczynski-2	$\frac{1}{2} \left(\frac{c}{a + c} + \frac{c}{b + c} \right)$

Para as medidas de similaridade, considerando-se duas moléculas A e B, para cada uma delas uma sequência de “bits” é construída. Cada “bit” indica a presença ou ausência de uma característica estrutural específica (“fingerprint”) da molécula. Um “fingerprint” de uma estrutura química identifica uma molécula particular através de suas características especiais, da mesma maneira como uma impressão digital identifica um indivíduo (GASTEIGER, J.; ENGEL, T., 2003). Assim, através de seus “bits”, duas moléculas podem ser comparadas de acordo com seu grau de similaridade (Figura 8).

Molécula A	1	1	1	0	0	1	4 bits
Molécula B	1	1	0	1	1	1	5 bits
A + B	1	1	0	0	0	1	3 bits

Figura 8. Na representação binária, o nº 1 representa uma característica presente, e o nº 0 uma característica ausente, seja nas estruturas A ou B. O número de “bits” em A indica as características presentes em A e o número de “bits” em B as características presentes em B. Os “bits” em C indicam as características comuns às estruturas A e B.

O coeficiente de Tanimoto, por exemplo, fornece valores de comparação na faixa de 0 (zero) a 1. O valor de 0 (zero) significa que não há similaridade entre as moléculas comparadas, já o valor de 1 denota 100% de similaridade, ou seja, como as características moleculares mapeadas representam um “fingerprint”, o valor máximo de 1 garante a comparação de uma molécula a ela mesma ou a seu enantiômero. Através do coeficiente de Tanimoto, calcula-se a razão do número de características comuns entre as moléculas, pelo número total de características presentes em ambas, subtraído pelo número de características comuns (Tabela 2). Um aspecto importante dessa medida é a sua ênfase sobre a presença de características comuns (BALDI, P.; NASR, R., 2010).

O resultado de uma busca por similaridade é, basicamente, uma lista de moléculas ranqueadas de acordo com o coeficiente de medida empregado, seguindo uma ordem de similaridade em relação à(s) molécula(s) de referência. Para o coeficiente de Tanimoto, quanto mais próximo seu índice do valor de 1, mais similar é a molécula avaliada. Normalmente, os valores de similaridade acima de 0.7 são mais representativos, como por exemplo, entre a molécula referência A e os compostos C e D (Figura 9), os quais são derivados da molécula referência e apresentam, basicamente, diferenças entre heteroátomos e substituintes. Índices pouco abaixo de 0.7, normalmente, selecionam moléculas que podem apresentar não somente diferenças em relação aos substituintes, mas também em relação às mudanças no núcleo de heterociclos em relação à molécula referência A, como por exemplo, o composto E (Figura 9). Já índices muito baixos, normalmente, indicam moléculas muito distintas da molécula referência e com poucas características em comum, como por exemplo, o composto F (Figura 9).

Figura 9. Comparação da similaridade molecular entre a molécula-alvo e outras estruturas através do índice de Tanimoto (S_T).

Dada a importância atual das técnicas de triagem por similaridade no planejamento de fármacos, há muito interesse no uso e desenvolvimento de medidas de similaridade baseadas em “fingerprints” 2D, os quais focam na presença ou ausências de fragmentos moleculares nas moléculas avaliadas. Entretanto, vale ressaltar que existem outros tipos de representação estrutural sugeridos para o cálculo de similaridade intermolecular, entre eles está a representação por propriedades físico-químicas,

gráficos químicos, índices topológicos, padrão farmacofórico 3D, dentre outros (WILLETT, P., 2006).

1.6.2. Farmacóforo

O conceito de farmacóforo foi introduzido pela primeira vez em 1909 por Ehrlich (EHRlich, P., 1909) que definiu o farmacóforo como uma entidade molecular que contém as características essenciais responsáveis por uma atividade biológica de um fármaco. Após um século de desenvolvimento, o conceito básico de farmacóforo permanece inalterado, mas o seu significado intencional e faixa de aplicação tem se expandido consideravelmente (YANG, S. Y., 2010).

Desta forma, o farmacóforo pode ser definido como um conjunto de atributos funcionais (como características eletrônicas e estéricas) essenciais que permitem que uma molécula ligante interaja com um alvo-receptor específico, assim desencadeando ou bloqueando sua resposta biológica (BUREAU, R. et al., 2002; DROR, O. et al., 2009; WERMUTH et al., 1998). Algumas características típicas de farmacóforos são grupos hidrofóbicos, aromáticos, aceptores de ligação de hidrogênio, doadores de ligação de hidrogênio, cátions, ânions. Essas características precisam combinar diferentes grupos químicos com propriedades similares, contribuindo para identificar novos ligantes.

A modelagem do farmacóforo é um método muito útil para identificar novos fármacos em potencial, e é um mecanismo eficaz para o método de screening virtual. O sucesso dessa metodologia dependerá da precisão e da especificidade do farmacóforo obtido (BUREAU, R. et al., 2002). A modelagem farmacofórica gera um modelo para o desenvolvimento de futuros fármacos.

Na ausência de uma estrutura alvo-receptor conhecida, o farmacóforo pode ser identificado a partir de um conjunto de ligantes que apresentem alguma atividade para interagir com o alvo-receptor (DROR, O. et al., 2009). Uma vez que é extraído de um conjunto de ligantes, o farmacóforo pode ser usado como um modelo para a construção de outras moléculas que possam realizar a mesma atividade, pois ele é baseado na premissa de que diferentes grupos químicos podem apresentar os mesmos tipos de interação com uma proteína, agrupando-se em uma mesma categoria de grupo farmacofórico.

Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido feitos não apenas na modificação de inibidores da AChE existentes, mas também na descoberta de potenciais estruturas novas por técnicas de descoberta de fármacos auxiliado pelo computador. E é, também, diante dessa hipótese que este trabalho será baseado.

1.6.3. Outras técnicas de quimioinformática

Na descoberta de fármacos, as técnicas de quimioinformática tais como o screening virtual, modelagem de farmacóforo, relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR), data mining, etc., são de grande importância, sendo consideravelmente precisos bem como na economia de tempo e custo.

Vários métodos computacionais têm sido aplicados para identificar inibidores da AChE. Muitos exemplos de modelos de farmacóforo, QSAR, busca por similaridade, topologia molecular e abordagens de docking têm mostrado sua aplicabilidade em métodos de screening virtual baseado no ligante e na estrutura para atingir esse objetivo (HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A., 2007).

Como parte deste estudo, foram exploradas ambas as abordagens para screening virtual baseadas no ligante e na estrutura da enzima AChE. As abordagens baseadas no ligante envolviam as buscas feitas por similaridade a um ligante ativo da AChE, enquanto que o docking molecular foi usado como uma abordagem baseada na estrutura da enzima AChE. A decisão mais importante na busca por similaridade diz respeito à escolha da molécula de referência. Frequentemente, se faz o uso de um composto potente de uma série de inibidores conhecidos. As seguintes ferramentas para screening virtual foram usadas para este estudo: (i) docking molecular usando o programa GLIDE 5.5 e GOLD 5.2.2, (ii) busca por similaridade usando o programa ROCS e o programa EON para buscas baseadas na similaridade eletrostática e (iii) Discovery Studio 4.0 para a derivação do padrão farmacofórico e screening virtual.

No desenvolvimento de novos compostos, o desenvolvimento baseado na estrutura, tal como o docking molecular, pode ser aplicado baseado na estrutura cristalográfica disponível da AChE em complexo com inibidores. Simulações de docking molecular têm sido utilizadas com sucesso em muitos projetos de química medicinal fazendo delas ferramentas valiosas na descoberta de fármacos (BERG, L. et al., 2011).

Nos últimos anos, muitas ferramentas diferentes foram desenvolvidas e empregam diferentes representações de propriedades moleculares e que muitas vezes têm diferentes características de velocidade e precisão. Os métodos tridimensionais usam as coordenadas atômicas da estrutura do ligante para calcular as pontuações da similaridade baseada na forma. O ROCS usa funções de Gaussian para representar a forma molecular. As moléculas são, então, sobrepostas maximizando a sobreposição de volume das estruturas sendo comparadas e a similaridade tridimensional é expressa numericamente usando uma medida de Tanimoto. Enquanto o ROCS se concentra nas sobreposições químicas e de forma, o programa EON compara campos eletrostáticos calculados da equação de Poisson-Boltzmann.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é planejar, testar e otimizar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de novos compostos protótipos como futuros candidatos a fármacos em doença de Alzheimer. Os potenciais inibidores serão selecionados de diversas bases de dados de compostos comerciais contendo propriedades de fármacos, utilizando diferentes estratégias de Química Medicinal Computacional.

Com o objetivo de identificar novos potenciais compostos inibidores da enzima AChE humana recorreremos a métodos *in silico* baseados, primeiramente, na estrutura do ligante, donepezil e na busca por similaridade a este inibidor e, posteriormente, a métodos baseados na estrutura da enzima humana.

Os objetivos específicos do trabalho consistem em:

- Estudar o perfil farmacocinético dos compostos identificados, buscando selecionar os que apresentam um perfil mais adequado, e otimizar os compostos com propriedades não favoráveis;
- Otimizar as interações dos compostos com baixa afinidade pelo sítio ligante da enzima AChE, bem como explorar os compostos com alta afinidade e gerar possíveis análogos mais potentes;
- Obter, por colaboração com o grupo de síntese orgânica do grupo de Química Farmacêutica, compostos modificados por sugestão da modelagem;

- Realizar ensaios biológicos com os compostos selecionados e otimizados, buscando verificar os níveis de atividade dos mesmos;
- Propor o modo de ligação dos protótipos na enzima AChE.

3. MÉTODOS

3.1. Alinhamento múltiplo de sequências

Para realizar o alinhamento múltiplo de sequências foi utilizado o programa ClustalX 2.0.11 e ClustalW2 (LARKIN, M. A. et al., 2007). Esses alinhamentos são agora uma das análises mais utilizadas na bioinformática e são necessários como parte das análises de sequências de resíduos de aminoácidos de enzimas de diferentes espécies.

O alinhamento múltiplo foi realizado a partir das sequências de três AChE de espécies diferentes com os seguintes códigos PDB:

- 1B41 – *Homo sapiens* (Humana)
- 1C2O – *Electrophorus electricus* (Enguia elétrica)
- 2CKM – *Torpedo californica* (Arraia elétrica)

A fim de fazer um alinhamento múltiplo de sequências utilizando o ClustalX, foram feitos downloads das sequências dos complexos acima citados no formato FastA a partir da web Page <http://www.pdb.org> inserindo os códigos das sequências na barra de busca.

O método de alinhamento procura organizar as sequências de tal maneira que as regiões mais similares são sobrepostas. Os aminoácidos nessas regiões podem ser idênticos ou similares. A similaridade é baseada nas propriedades dos aminoácidos, tais como acidez, basicidade, polaridade, aromaticidade, etc. Então, para cada par de aminoácidos é atribuída uma pontuação, normalmente uma porcentagem de similaridade. O alinhamento de duas sequências (alinhamento aos pares) é resolvido por meio de algoritmos de programação dinâmica. O alinhamento de mais sequências

(alinhamento múltiplo) calcula primeiramente o alinhamento aos pares para finalmente construir um alinhamento múltiplo.

O ClustalW2 é um programa cujo propósito geral é o alinhamento múltiplo de sequências de proteínas. Ele calcula a melhor combinação para as sequências selecionadas e as alinha para que as identidades, similaridades e diferenças possam ser vistas.

Normalmente, cada uma das ferramentas usadas para alinhamento tem no mínimo dois passos a serem seguidos sendo que, algumas, podem ter até mais. Mas basicamente são:

- Os primeiros passos são geralmente onde o usuário define os dados para serem usados na ferramenta (por exemplo, as sequências, as bases de dados, etc.);
- Nas etapas seguintes, o usuário tem a possibilidade de alterar os parâmetros-padrão do programa.

Para a sobreposição das estruturas tridimensionais, foi usado o procedimento “Magic fit” para CA (carbono alfa) apenas. Este procedimento está implementado no programa Swiss-Pdb Viewer 4.0.1 (GUEx, N.; PEITSCH, M. C., 1997).

3.2. BindingDB

O BindingDB (LIU, T. Q. et al., 2007) é um banco de dados acessível ao público e contém cerca de 947.406 afinidades de ligação experimentalmente determinadas para 6.667 proteínas-alvo e 393.164 moléculas pequenas. O site BindingDB suporta uma vasta gama de tipos de pesquisa, incluindo pesquisas por estrutura química, estrutura e sequência da proteína similar; ligante e nomes de proteína; e peso molecular, como foco principalmente nas interações de proteínas consideradas a serem alvos terapêuticos para pequenas moléculas e moléculas com propriedades de fármacos. Existem 1757 estruturas cristalográficas de complexos proteína-ligante com medições de afinidade para proteínas com 100% de sua sequência identificada e 5009 estruturas cristalográficas com identidade sequencial de 85%.

Os resultados gerados pela consulta no BindingDB podem ser obtidos por download da molécula para uma análise mais aprofundada, ou utilizados como base para screening virtual de um conjunto de compostos enviados pelo usuário. Os dados do BindingDB estão ligados aos dados estruturais do PDB (através do PDB ID), e também à literatura, pelo PubMed (através do PubMed ID). Através de uma pesquisa sobre os inibidores da acetilcolinesterase, foi encontrado um número considerável de ligantes para este alvo. Pela reordenação da tabela por valores de IC_{50} , foi possível selecionar tanto aqueles ligantes que tinham um valor de IC_{50} menor que 10 μM , sendo este o limiar pré-estabelecido para a seleção dos ligantes da AChE, quanto aqueles ligantes que se espera ocupar ambos os sítios da enzima simultaneamente.

3.3. Geração do modelo farmacofórico

O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se define os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. A análise, por métodos computacionais, dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do padrão farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão.

A técnica utilizada para a derivação do padrão farmacofórico foi através do programa Discovery Studio 4.0 da Accelrys. Este programa oferece uma grande variedade de métodos que podem ser usados para modelar um farmacóforo. No Discovery Studio, um farmacóforo é definido como as características essenciais ou subestruturas químicas, além de suas respectivas localizações tridimensionais que são responsáveis pelas semelhantes atividades biológicas de um conjunto de compostos. Normalmente, as características farmacofóricas são grupos hidrofóbicos, aromáticos, aceptores de ligação de hidrogênio, doadores de ligação de hidrogênio, ionizáveis positivos e ionizáveis negativos, entre outros. O Discovery Studio é capaz de realizar uma rápida modelagem e identificação do farmacóforo, com ou sem a presença da estrutura-alvo (Accelrys Software Inc., 2007).

O método HipHop do programa Discovery Studio 4.0 foi utilizado para geração do modelo. O HipHop é gerado baseado nas características comuns presentes no conjunto de moléculas ativas escolhidas para se derivar o modelo farmacofórico. A satisfatória variedade de moléculas bioativas utilizada para esta derivação permitiu,

após a geração do modelo, as atividades de screening virtual em uma grande base de dados.

O módulo “Common Feature Pharmacophore Generation” presente no protocolo “Pharmacophore” do programa Discovery Studio calcula todas as possíveis características químicas do conjunto de moléculas ativas selecionadas. Um mínimo de 3 a um máximo de 5 características incluindo as seguintes características aceitador de ligação de hidrogênio, doador de ligação de hidrogênio, hidrofóbico e anel aromático foram selecionadas na geração do modelo farmacofórico. Assim, dez modelos foram gerados, o melhor modelo selecionado foi aquele que demonstrou ter um bom relacionamento entre as estruturas do conjunto de moléculas ativas utilizado para a sua geração e ter as características químicas do farmacóforo condizente com as características dos resíduos de aminoácidos da enzima ao analisarmos o farmacóforo dentro do sítio ativa da AChE.

Neste trabalho, as características químicas do modelo do farmacóforo tridimensional foram desenvolvidas baseadas em cinco potentes inibidores da enzima AChE obtidos através das buscas feitas no web-servidor bindingDB e PDB. O melhor modelo consiste de dois anéis aromáticos e um aceitador de ligação de hidrogênio.

3.4. Métodos de screening virtual

Os dados iniciais deste estudo, realizados antes do complexo AChE humana-donepezil ter sido resolvida, foram gerados por docking, busca e análise por farmacóforo e similaridade de forma, abrangendo tanto os métodos baseados no ligante como os métodos baseados na estrutura da enzima AChE de *Torpedo californica*. Quatro métodos que medem diferentes princípios de screening virtual foram aplicados neste estudo inicial: experimentos de docking usando o programa Glide 5.5, busca e screening virtual por farmacóforo usando o Discovery Studio 4.0 e similaridade de forma aos ligantes de referência realizada também no programa Glide 5.5.

3.4.1. O programa GLIDE

O programa GLIDE 5.5 (“grid”-based Ligand Docking with Energetics) (FRIESNER, R. A. et al., 2004 & HALGREN, T. A. et al., 2004) é um dos programas

mais eficientes de screening virtual da atualidade (CHENG, T. et al., 2009; CROSS, J. B. et al., 2009 & GARCIA-SOSA, A. T. et al., 2010). Ele utiliza uma série hierárquica de filtros para procurar as melhores localizações possíveis para o ligante na região do sítio ligante do receptor determinada na configuração do programa. A forma e as propriedades do receptor são representadas em um “grid” por diversos conjuntos de campos diferentes que proveem progressivamente classificações mais precisas para as conformações dos ligantes.

3.4.1.1. Modo HTVS (High-Throughput Virtual Screening) e modo SP (Standard-Precision)

Nestes modos de configuração, o programa GLIDE divide a molécula em “núcleo” e “grupos rotaméricos”, sendo estes ligados ao núcleo através de ligações rotacionáveis, mas eles em si "não possuem" ligações rotacionáveis, não nos primeiros estágios (Figura 10). A diferença entre estes dois modos se dá na complexidade do algoritmo empregado para a busca, sendo o HTVS mais simples e mais leve, indicado para buscas em grandes bases de dados, e o SP mais complexo, indicado para as diversas aplicações do programa, porém a um maior custo computacional.

Figura 10. Demonstração do núcleo (anéis) e de grupos rotaméricos presos a ele através de ligações rotacionáveis.

3.4.1.2. GLIDE XP (Extra Precison)

O modo XP combina um poderoso protocolo de amostragem ao uso de uma função de escore personalizada para assim identificar conformações que sejam energeticamente desfavoráveis. Presume-se que somente os compostos ativos terão

conformações que transcorram a estas penalidades e também sejam as conformações/moléculas mais bem classificadas.

Esta ferramenta foi desenvolvida para uso somente em boas conformações de ligantes e é computacionalmente mais pesada que os modos SP e HTVS, então ela é usada somente para os experimentos de rescore.

3.4.2. Pontuação de similaridade por pares de átomos

O programa Glide usa um algoritmo de pontuação de similaridade por pares de átomos. A função de similaridade é normalizada de modo que o resultado é um número entre 0.0 (nenhum par de átomos em comum) e 1.0 (lista idêntica de pares de átomos).

O modo de busca selecionado foi o modo “Find similar ligands”, esse modo penaliza os ligantes que são diferentes das moléculas ativas conhecidas. Nos resultados, os ligantes que tiveram melhor pontuação e, portanto, são similares as moléculas ativas conhecidas serão melhor classificados.

Após a busca feita no servidor BindingDB, um conjunto de ligantes ativos conhecidos foi selecionado de acordo com o limiar pré-estabelecido para a seleção dos ligantes da AChE, parâmetros estes já citados. Logo após esta seleção foi criado um conjunto de ligantes ativos que preenchiam aqueles requisitos e estes foram salvos em um arquivo no formato sdf. Quando se tem especificado o conjunto de ligantes ativos que será usado é possível então criar um modelo de similaridade.

As informações da similaridade são incorporadas nos resultados de acordo com uma função de pontuação que atribui uma penalidade do GlideScore com base na pontuação de um ligante de similaridade que foi normalizado para um valor entre 0.00 e 1.00. No caso deste trabalho, o modo de similaridade selecionado foi o “Find similar ligands”, no qual as penalidades diminuem com o aumento da similaridade (Figura 11).

Figura 11. Layout da função similaridade do programa GLIDE.

Para a função de pontuação do modo de similaridade “Find similar ligands”, temos o “Maximum GlideScore penalty” parametrizado a um valor de 6.0 kcal/mol que dá pontuação de similaridade e GlideScore pesos aproximadamente iguais. Este valor é a penalidade máxima para ligantes com baixa pontuação de similaridade.

A opção “Partially penalize between” foi deixado entre os valores 0.3 e 0.7. Os ligantes com pontuação de similaridade menor do que 0.3 receberão maior penalidade e aqueles com similaridade maior do que 0.7 não receberão penalidade. As pontuações de similaridade entre os valores 0.3 e 0.7 receberão uma penalidade que diminui linearmente a partir do valor máximo 0.3 até zero no valor 0.7.

3.5. Experimentos de screening virtual e docking molecular

Uma das aplicações dos programas de docking ocorre em screening virtual em bases de dados de compostos. Neste procedimento, amplas coleções virtuais de compostos são submetidas às simulações de docking em um sítio ligante proteico, e os respectivos compostos são ordenados/classificados de acordo com suas afinidades teóricas pelo alvo macromolecular, assim avaliado por uma determinada função de escore.

As simulações de screening virtual são normalmente utilizadas na fase inicial do processo de concepção do fármaco, a fim de testar um conjunto de compostos com potencial para apresentar atividade contra o alvo escolhido. O screening virtual tornou-se uma metodologia importante para preceder os ensaios *in vitro* (ZOETE, V. et al., 2009).

A subcoleção utilizada da base de dados ZINC foi a CNS-permeável. Esta subcoleção é composta por moléculas que têm maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica. A ZINC é uma base de dados gratuita para experimentos de screening virtual contendo mais de 21 milhões de compostos. Uma vez que este estudo requer a geração de novos inibidores que possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, utilizou-se a subclasse pré-filtrada da ZINC com compostos que possuem permeabilidade ao sistema nervoso central. Os compostos com peso molecular variando de 150 a 400 Da, área de superfície polar de 0 a 60 Å e valores de logP de 1.5 a 2.7 fazem parte da base de dados permeáveis ao sistema nervoso central (CNS ZINC).

As propriedades físico-químicas associadas com os compostos que possuem boa penetração na barreira hematoencefálica, ótima biodisponibilidade oral, baixa ou quase nenhuma toxicidade e também ótima solubilidade são filtros significantes para a seleção de compostos ativos no sistema nervoso central e há uma necessidade de compostos com boas propriedades farmacocinéticas (GUPTA, S.; MOHAN, C. G., 2014).

Ela é composta por 377.655 compostos. Após essa preparação das bases de dados, os experimentos de screening virtual baseados na estrutura da enzima foram realizados com o programa GLIDE 5.5 e os experimentos de screening virtual baseados no ligante foram realizados submetendo a base de dados CNS ZINC no programa Discovery Studio 4.0 para screening virtual por farmacóforo. A busca por similaridade também foi realizada utilizando esta mesma base de dados aplicada ao programa GLIDE em sua configuração de busca por similaridade, logo após, as moléculas que alcançaram uma alta pontuação de similaridade (acima de 0.7) foram submetidas ao screening virtual por farmacóforo e desta seleção foi realizado um docking por estrutura utilizando a enzima de *Torpedo californica* (código PDB 2CKM) no programa GLIDE 5.5.

3.6. Primeiros experimentos de screening virtual

É importante destacar que nesta etapa do trabalho não havia ainda a informação a respeito do complexo AChE humana-donepezil resolvido e depositado no PDB. Por isso, esta etapa de seleção foi inteiramente realizada a partir dos dados obtidos da enzima AChE de *Torpedo californica* (código PDB 2CKM), assim sendo, a realização dos experimentos e da seleção de novos ligantes seguiu-se com a utilização desta enzima.

Os modos do GLIDE, já citados, foram utilizados para os experimentos de screening virtual na base de dados CNS ZINC. O algoritmo do programa GLIDE aproxima-se de uma sistemática busca de posições, orientações e conformações do ligante no sítio de ligação receptor, assim como buscas por similaridade. A estrutura da enzima AChE, advinda do complexo de código PDB 2CKM, foi utilizada para estas etapas de screening virtual. Cada uma das etapas está resumidamente descrita na Figura 12.

Figura 12. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos.

Os modos selecionados para esta primeira etapa de seleção de compostos utilizando o GLIDE foi o HTVS e o XP e a função de escore utilizada é a função implementada no próprio programa, o GlideScore. Essa função parece ser efetiva para triagem nas bases de dados com o desempenho consistente através do sítio de ligação.

O GlideScore, recentemente desenvolvido pela Schrodinger, Inc., usa o ChemScore, uma função de escore do programa GOLD, como o modelo inicial. Ele foi especificamente desenvolvido para maximizar o enriquecimento no screening em bases de dados e é reivindicado a ser uma ferramenta eficaz em sua habilidade de discriminar

entre compostos ativos e inativos em uma variedade de sistemas (PEROLA, E. et al., 2004).

Antes da realização do screening virtual, se faz necessária a preparação da enzima, pois um arquivo de uma estrutura do PDB não contém átomos de hidrogênio, podendo conter ainda águas, cofatores e íon metálicos e a enzima pode ser multimérica. Portanto, a estrutura geralmente não tem informações de ordens de ligação, topologia ou cargas atômicas formais. Os cálculos no GLIDE utilizam um campo de força de todos os átomos para uma avaliação energética precisa. Assim, o GLIDE necessita de ordens de ligação e estados de ionização para serem adequadamente atribuídos e terem um melhor desempenho quando as cadeias laterais são reorientadas.

Este procedimento é realizado no painel “Protein Preparation Wizard”, implementado ao programa. As opções selecionadas para a preparação foram as seguintes:

- Assing Bond Orders: esta opção seleciona a atribuição de ordens de ligação.
- Cap termini: esta adiciona grupos ACE (N-acetil) e NAM (N-metil amida) a N terminal e C terminal não nivelados.

O GLIDE busca as interações favoráveis entre a molécula do ligante e o receptor enzimático. A forma e as propriedades do receptor são representadas em um “grid” por vários conjuntos diferentes de campos que proporcionam um escore progressivamente mais preciso das poses do ligante. O “grid” receptor pôde ser configurado e gerado no painel “Receptor grid Generation”. Este painel permite definir a posição e o tamanho do sítio ativo determinado por esse “grid”. O termo pose é uma especificação completa do ligante: posição e orientação relativa em relação ao receptor, a conformação do núcleo e as conformações dos grupos rotaméricos.

O sítio de ligação é definido por uma caixa retangular confinando a translação do centro de massa do ligante. Foi delimitada uma caixa interna (local onde o GLIDE considerará as interações com o sítio ligante) com 14 Å nas direções x, y e z (Figura 13). Utilizaram-se as coordenadas cartesianas do átomo OH do resíduo de aminoácido Tyr121 e utilizou-se o modo SP para as buscas, pois seu custo computacional foi aceitável e o resultado produzido é melhor que o com o modo HTVS. Além disso, a opção pelo docking flexível também foi selecionada.

Figura 13. As grades são calculadas dentro do espaço definido pela caixa exterior. Esta é também a caixa dentro da qual todos os átomos ligantes devem ser contidos.

3.7. Seleção de compostos por screening virtual – GLIDE

As buscas na base de dados ZINC foram feitas com o algoritmo configurado de forma “branda” e selecionaram-se as 5000 melhores moléculas da base selecionada, utilizando seu modo HTVS. Posteriormente, o refinamento das 5000 melhores moléculas para as 50 melhores moléculas foi feito ainda no GLIDE utilizando-se o modo XP (extra precision).

Foi permitido aos compostos da base de dados gerarem 10 poses por corrida do docking e 10 poses por ligante. Além disso, selecionou-se a opção de ser realizada uma minimização das poses dos compostos que foram realizadas pós-docking. As poses selecionadas são minimizadas em “grids” OPLS-AA van der Waals e eletrostáticos que são pré-calculados para o receptor.

3.8. Campos de interação molecular – MIF

Uma diferente e robusta metodologia do planejamento racional de fármacos, agora já mais direcionada à otimização *in silico* de protótipos, consiste-se em investigar as condições energéticas entre moléculas as quais se aproximam uma da outra, gerando os campos de interação molecular (“Molecular Interaction Field” - MIF), assim denominados. Esses campos descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo de prova que se move confinado ao interior de uma “caixa”

de energia (um “grid” 3D), o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo biológico (o sítio receptor).

Pioneiramente baseado na linguagem de programação Delphi (GILSON, M. K.; SHARP, K. A.; HONIG, B. H., 1988) e posteriormente implementado no programa Insight II (INSIGHT II USER GUIDE, 2005), o método resolve numericamente a equação de Poisson-Boltzmann gerando um mapa de potencial eletrostático clássico. As diferentes sondas virtuais que usualmente são testadas refletem as características químicas que deveriam possuir ou o ligante ideal ou fragmentos de sua estrutura. Os campos de interação molecular resultantes do cálculo podem ser visualizados como regiões bem definidas no espaço interior ao “grid”, as quais indicam as posições de mais baixa energia de interação que deveria haver entre o sítio receptor e os grupos de prova testados (ou átomos equivalentes no ligante ideal).

Neste trabalho foi utilizado o programa GRID v.22 (Molecular Discovery Ltd) (GOODFORD, P. J., 1985) que é o pioneiro e um dos mais amplamente utilizados para investigação dos MIF. Ele faz cálculos tanto para pequenas moléculas bem como para grandes moléculas de proteínas, como as enzimas. A lista de sondas virtuais é bem variada e a energia de interação é calculada em uma grade regular de pontos ao redor da molécula alvo.

As sondas virtuais que podem ser usadas para o cálculo são pequenas moléculas, fragmentos químicos ou átomos particulares, como por exemplo, uma molécula de água, um grupo hidroxila ou um íon cálcio. Estas sondas virtuais simulam as características químicas de um potencial sítio receptor de proteína.

Esse método permitiu prever as interações intermoleculares ligante-receptor baseando-se nos critérios de reconhecimento molecular, fornecendo subsídios para a proposição de novos ligantes. Através dos MIFs gerados foi possível sugerir importantes pontos de interação entre um receptor e um ligante.

Os cálculos foram realizados dentro de uma região selecionada (o sítio ativo), o qual foi posicionado dentro de uma caixa (o “grid”). Utilizou-se a estrutura da AChE (código PDB 2CKM) e o grupo químico de prova para carbono aromático

A utilização desses grupos de provas distintos tem por objetivo a definição de regiões significativas no sítio ligante da AChE (“hot spots”) que sejam capazes de acomodar ligantes com características químicas consideradas relevantes para a realização de interações com a proteína. Como todos os compostos selecionados apresentam anéis aromáticos em sua estrutura, um dos grupos de sondas virtuais

analisado foi o Carbono Aromático, que é um grupo de prova hidrofóbico mais específico que o clássico grupo de prova DRY (hidrofóbico). Estes dois grupos de sondas virtuais identificam sítios na proteína que favorecem a acomodação, do ponto de vista energético, destes anéis hidrofóbicos e outras regiões hidrofóbicas dos ligantes.

Assim sendo, campos de interação molecular foram calculados para os compostos selecionados.

3.9. Abordagens baseadas na estrutura da enzima AChE Humana e abordagens baseadas no ligante de referência

Nesta mais recente etapa deste estudo, as abordagens baseadas na estrutura foram utilizadas após a disponibilidade da estrutura cristalográfica da proteína humana em complexo com o ligante (AChE humana-donepezil) resolvida e depositada no banco de dados PDB (código PDB ID 4EY7) e que fornece uma margem para a pesquisa de novos inibidores que poderiam se ligar no sítio ativo da proteína AChE humana.

As estratégias baseadas no ligante propuseram e avaliaram potenciais compostos ligantes baseados na similaridade tanto de forma quanto eletrostática do conhecido inibidor donepezil de modo a conservar os arranjos tridimensionais de grupos funcionais que se acredita serem os mais importantes para atividade de inibidores já conhecidos. Foi proposto, então, integrar as metodologias baseadas tanto no ligante quanto na estrutura para o desenvolvimento do fármaco.

A abordagem baseada na estrutura usada aqui toma os melhores compostos que passaram por experimentos de docking advindos, primeiramente, da abordagem de busca por similaridade de forma e eletrostática.

3.9.1. Abordagem baseada no ligante

3.9.1.1. ROCS (Rapid Overlay Of Chemical Structures) – similaridade por forma

Neste estudo, o programa ROCS v2.4.1 (Rapid Overlay of Chemical Structures, OpenEye) foi utilizado como uma ferramenta para as buscas por similaridade molecular tridimensional. O uso do ROCS conduz a identificação de um conjunto de novos

inibidores apresentando oportunidades sintéticas para otimizar ainda mais a afinidade biológica (RUSH, T. S. et al., 2005).

O programa ROCS é uma poderosa ferramenta de screening virtual que pode rapidamente identificar compostos potencialmente ativos por comparação de forma. Este software foi desenvolvido para realizar pesquisas em bancos de dados tridimensionais em grande escala. Ele desempenha uma busca por similaridade usando um método de sobreposição baseado na forma do ligante tendo como base apenas os átomos pesados do ligante ignorando os hidrogênios (MISHRA, N.; BASU, A., 2013). Neste método de sobreposição baseado na forma, as moléculas são alinhadas pela maximização do volume de sobreposição entre uma estrutura de referência (a molécula consulta) e cada molécula contida na base de dados. A forma é uma característica molecular de fundamental importância que desempenha um papel crucial nas interações moleculares entre ligantes e alvos biológicos (WIGGERS, H. J. et al., 2011).

As abordagens baseadas na forma, ou seja, o modelo de alguns aspectos físicos do reconhecimento molecular tem sido bem sucedido em screening virtual para estratégias de geração de protótipos. No entanto, é óbvio que o screening baseado na forma apenas, não seria suficientemente discriminatório. Este fato influenciou a comparação de potenciais eletrostáticos além da complementariedade de forma (BOSTROM, J. et al., 2013).

A base de dados CNS ZINC contendo 377.655 compostos foi inicialmente escaneada e classificada usando o algoritmo do programa ROCS para gerar e pontuar as sobreposições tridimensionais da base de dados com a estrutura de referência do inibidor donepezil utilizado nesta etapa como a molécula consulta (Figura 14).

Figura 14. Donepezil, utilizado como estrutura de referência para gerar e pontuar as sobreposições tridimensionais da base de dados.

Para quantificar a similaridade entre duas moléculas o coeficiente de Tanimoto foi usado para a comparação e pode variar de 0.0 a 1.0 com o valor 1.0 representando uma correspondência exata. O ROCS classifica as moléculas com base na sua similaridade com a molécula consulta ou de referência usando funções de Gaussian centrados no átomo para permitir a maximização rápida da sobreposição molecular (volume e características atômicas), chamado “ComboScore”.

Durante essa rodada inicial de filtragem por forma, as moléculas da base dados da CNS ZINC foram classificadas com base na sua concordância de forma usando o critério de pontuação “ComboScore”. Os melhores compostos com pontuação Tanimoto maior do que 0.7 foram então reclassificados usando o programa EON, um programa designado para calcular correlações eletrostáticas de moléculas pré-alinhadas.

3.9.1.2. EON – similaridade eletrostática

O EON é um programa que efetua comparação eletrostática, ele compara mapas de potencial eletrostático de moléculas pré-alinhadas e determina as medidas Tanimoto para a comparação. A classificação das moléculas é feita utilizando o “Eletrostatic Tanimoto Combo Score” (ET_combo) que é a soma do coeficiente eletrostático de Tanimoto Poisson-Boltzmann (ET_pb) e o “shape Tanimoto (ST).

As estruturas sobrepostas no arquivo de saída do ROCS são usadas como arquivo de entrada para análise no programa EON. O EON não executa qualquer sobreposição ou altera a orientação das estruturas utilizadas. Portanto, uma vez que o alinhamento usado em ambos os programas é o mesmo, desempenhos similares nas unidades métricas podem ser esperados (WIGGERS, H. J. et al., 2011).

Os métodos de screening virtual tridimensional baseado no ligante (ROCS e EON) foram usados neste estudo para escanear a base de dados em comparação ao ligante de referência, donepezil (molécula consulta ou de referência). Primeiro, a forma do composto em particular foi considerada usando o ROCS, a quantidade de informação explorada pela ferramenta de screening foi progressivamente aumentada levando em consideração as características dos átomos presentes na estrutura da molécula introduzindo um campo de força de cor no ROCS e finalmente combinando o ROCS

com a ferramenta de comparação eletrostática EON. Os resultados do ROCS e do EON são altamente dependentes da molécula consulta.

Para identificar potentes inibidores da enzima AChE que atuem simultaneamente no CAS e no PAS é importante conhecer as exigências químicas desses inibidores, assim como, as similaridades estruturais e eletrostáticas com inibidores ativos conhecidos de referência.

Os melhores compostos no arquivo de saída do ROCS foram usados como arquivo de entrada para análise no programa EON. O programa EON calcula o Eletrostático Tanimoto entre cada molécula da base de dados e a molécula consulta (moléculas sobrepostas no ROCS). O EON não executa qualquer sobreposição ou altera a orientação das estruturas utilizadas como arquivo de entrada. Ele calcula novas cargas parciais para as moléculas de entrada usando o MMFF94. Os arquivos de saída são agrupados de acordo com a pontuação do EON (“ET_combo”) que é a soma do coeficiente eletrostático de Tanimoto Poisson-Boltzmann (ET_pb) e o “shape Tanimoto” (ST). Os resultados foram, assim, classificados com base no “ET_combo” análogo ao “ComboTanimoto”.

A classificação eletrostática baseada na pontuação “ET_combo” varia de 1.0 (idênticas) para valores negativos resultantes da sobreposição de cargas positivas e negativas. Foram selecionados, nesta etapa, os 1000 melhores compostos.

Os compostos escaneados foram então, adicionalmente, validados usando as análises de docking molecular para entender os modos de interação no sítio de ligação duplo da AChE humana.

Foi aplicado o uso simultâneo de métodos baseados no ligante e na estrutura, similaridade de forma e eletrostática e docking molecular em vista de se fazer a descoberta de novos ligantes de uma maneira mais eficiente neste processo de seleção.

3.9.2. Abordagem baseada na estrutura

A disponibilidade da estrutura cristalográfica do complexo acetilcolinesterase humana-donepezil, recentemente resolvida e depositada no banco de dados do PDB, facilitou o uso das abordagens de screening virtual aplicadas, primeiramente, baseadas no ligante e, posteriormente, baseadas na estrutura da enzima para a obtenção de novos

protótipos através do escaneamento em uma base de dados pré-filtrada de compostos permeáveis ao sistema nervoso central da biblioteca ZINC (CNS ZINC).

Para a abordagem de screening virtual baseada na estrutura, a enzima de AChE humana em complexo com o donepezil (PDB ID 4EY7) foi usada. Esta estrutura de proteína é considerada ser melhor do que as estruturas de AChE usadas anteriormente de diferentes espécies como a de *Torpedo californica*, *Mus musculus* ou *Electrophorus electricus*. A estrutura da AChE humana em complexo com o donepezil é vantajosa devido a sua alta qualidade estrutural (2.16 Å) em comparação com sua versão anterior (PDB ID 1B41) com uma resolução de 2.76 Å. Além disso, permite diretamente prever os aminoácidos da proteína humana que interagem.

O screening virtual baseado na estrutura depende de métodos computacionais rápidos e precisos para estimar os modos de ligação e afinidades de ligação do modelo receptor-ligante.

Foi adotada uma estratégia de screening virtual sequencial para reduzir o espaço de busca para potenciais candidatos a fármacos filtrando compostos pouco prováveis de interagir com a enzima AChE humana.

3.9.2.1. O programa GOLD e a abordagem baseada na estrutura

O docking molecular é um método computacional intensivo e proeminente no processo de descobrimento de fármaco. O screening virtual seguido pelo docking tem se tornado um dos métodos mais importantes para melhorar a eficiência das buscas. O benefício do docking é identificar o modo de ligação dos ligantes no sítio de ligação da enzima através de interações-chave específicas e de prever a afinidade de ligação entre os complexos proteína-ligante (GUPTA, S.; MOHAN, C. G., 2014).

O programa GOLD (do inglês, “Genetic Optimisation for Ligand Docking”) é um algoritmo genético para fins de experimentos de docking flexível de ligantes dentro de sítios de ligação de proteínas. Uma população de soluções potenciais (isto é, possíveis orientações docadas dos ligantes) está configurada de forma aleatória. Cada membro da população é codificado como um cromossomo que contém as informações sobre o mapeamento de ligações de hidrogênio de átomos do ligante para (complementares) ligações de hidrogênio de átomos da proteína, mapeamento de pontos

hidrofóbicos no ligante para pontos hidrofóbicos na proteína e a conformação em torno das ligações flexíveis do ligante e grupos OH da proteína.

Predizer como uma molécula pequena irá ligar-se a uma proteína é difícil e nenhum programa pode garantir sucesso. A próxima etapa a ser realizada é medir a maior precisão possível da confiabilidade do programa, isto é, a chance de que ele vai fazer uma boa predição em uma determinada instância. Por esse motivo, o GOLD tem sido testado com um grande número de complexos extraídos do PDB. A conclusão geral desses testes foi que as soluções melhor classificadas pelo GOLD estavam corretas em 70-80% dos casos.

O docking de ligantes é uma abordagem amplamente usada em screening virtual. Para isso, a estrutura da AChE humana do complexo de código PDB 4EY7 foi preparada para os experimentos adicionando átomos de hidrogênio, ordenando os hidrogênios, removendo íons e outros ligantes do sítio ativo e todas as moléculas de água foram removidas.

O programa GOLD versão 5.2.2 foi usado para investigar os modos de ligação entre os compostos selecionados e gerar um conjunto de conformações para esses ligantes após os experimentos com o programa EON e a enzima AChE humana.

O ChemPLP é a mais recente função de pontuação introduzida no programa GOLD. Esta função trata os contatos neutros e repulsivos com um potencial linear por partes (do inglês, “Piecewise Linear Potencial”). Este simples potencial tem tanto uma parte atrativa e repulsiva para contatos neutros e unicamente uma parte repulsiva para contatos anti-complementares (ligação doador-doador, metal-doador e aceitador-doador). O termo de ligação de hidrogênio Chemscore para ligações de hidrogênio e o termo de energia interna Chemscore são também usados. O ChemPLP efetua cálculos mais rápidos em comparação a antiga função GoldScore (LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O., 2012).

Dada a estrutura cristalográfica do alvo, o docking molecular automaticamente apresenta amostras das conformações dos ligantes com uma região específica de ligação da enzima. Tem sido usado de maneira bem-sucedida para identificar compostos ativos filtrando aqueles que não se encaixam no sítio ativo (GUPTA, S.; MOHAN, C. G., 2014).

O sítio de ligação da enzima foi definido com todos os resíduos dentro de uma esfera de 11 Å de raio do ponto x: -13,949; y: -41,461; z: 29,515 localizado ao centro do sítio ativo. Para a etapa inicial dos experimentos de docking alguns parâmetros do

algoritmo genético (GA) foram aplicados para buscar os modos de ligação razoáveis dos compostos selecionados da etapa anterior mantendo-os rígidos, já que havia a necessidade de preservar a conformação bioativa similar ao donepezil utilizado como molécula de referência.

Uma busca de máxima eficiência foi realizada (auto configuração de 100% de eficiência) foi realizada (Figura 15).

Figura 15. Layout do programa GOLD para a configuração da eficiência da busca.

Os melhores compostos selecionados nesta etapa foram classificados de acordo com a função de pontuação ChemPLP que avaliou os modos de ligação desses compostos ao sítio de ligação. Uma inspeção visual foi realizada para a seleção das melhores poses dos compostos que revelaram interações de empilhamento- π com os resíduos de aminoácidos Trp86 e Trp286, além de apresentarem uma carbonila em sua estrutura para realizar uma interação de ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Phe295, seguindo, assim, os mesmos padrões de interação do inibidor donepezil.

3.9.2.2. Experimentos de docking baseados na similaridade

A predição exata da geometria de interação proteína-ligante é essencial para o sucesso das abordagens de screening virtual aplicadas durante o desenvolvimento do fármaco baseado na estrutura. Este procedimento requer ferramentas de docking que são capazes de gerar conformações adequadas de um ligante dentro do sítio de ligação da proteína e exige avaliações energéticas confiáveis para a determinação da qualidade de interação (DANUELLO, A. et al., 2012).

A base de dados CNS ZINC foi utilizada mais uma vez nesses novos experimentos de docking utilizando o programa GOLD e a preparação da enzima AChE humana foi realizada seguindo os mesmos procedimentos mencionados no tópico anterior com uma exceção inicial em relação ao primeiro experimento realizado utilizando os programas ROCS e EON. Neste caso, a configuração do programa foi programada para fazer buscas com 30% de eficiência (isto é, 0.3X do padrão, é uma configuração de busca chamada “Virtual screening”), devido a grande exigência de cálculo requerida para o número de compostos da base de dados CNS ZINC. Esta configuração é adequada para experimentos de rotina e geralmente dá a precisão da previsão comparável às configurações mais lentas.

O número mínimo de operações realizadas durante os cálculos de docking, por conseguinte, irá depender da eficiência de pesquisa que está definida.

Nesta etapa, a conformação bioativa do donepezil em complexo com a enzima humana foi utilizada como um composto de referência para o alinhamento utilizando este inibidor como uma restrição de similaridade. Esse modelo de restrição de similaridade é feito para tendenciar a conformação dos compostos que serão docados no sentido de uma determinada solução ou de um modelo, neste caso, a molécula de referência, o donepezil (Figura 16).

Figura 16. Layout do programa GOLD para a configuração da busca por restrição de similaridade.

Esta restrição adicionará um termo de energia à função de pontuação selecionada baseado na similaridade entre o ligante da base de dados que estará sendo docado e a molécula de referência. A similaridade entre os dois é avaliada como um termo de sobreposição de Gaussian.

Assim, as conformações finais para cada ligante seriam selecionados com base nos seguintes critérios: primeiramente, considerando a conformação com o maior ChemPLP, após isso, através de uma inspeção visual dos compostos selecionados, observar a conformação do composto que fazia uma boa interação de empilhamento- π entre os aminoácidos Trp286 e Trp86, além de se sobreporem e possuírem uma carbonila na mesma posição da carbonila do donepezil favorecendo a interação de ligação de hidrogênio que este faz com o grupo NH do aminoácido Phe295.

Os melhores compostos selecionados de acordo com a pontuação ChemPLP para as configurações iniciais, citadas acima, para este cálculo foram selecionados para, posteriormente, através de cálculos mais eficientes, serem filtrados e seu número fosse reduzido para, assim, obter compostos potencialmente melhor classificados para seguirem às próximas etapas.

Para isso, uma busca, agora, de máxima eficiência foi realizada (auto configuração de 100% de eficiência). Esses experimentos de predição de poses foram também submetidos ao rescore em que cada cálculo é repetido 10 vezes para cada

composto, gerando assim, 10 conformações diferentes que, posteriormente, seriam visualmente inspecionados para a seleção das melhores conformações para cada composto levando em consideração as características já citadas acima.

As configurações do GOLD, citados acima, fornecem todas as funcionalidades necessárias para o docking de ligantes e os experimentos de screening virtual realizados dentro do sítio de ligação da proteína. Cada uma das etapas efetuadas neste estudo utilizando a estrutura da enzima AChE humana e o donepezil como molécula de referência para a similaridade está resumidamente descrita na Figura 17.

Figura 17. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos utilizando a enzima humana e o donepezil como molécula de referência para as buscas por similaridade.

3.10. Estudos ADME/Tox

Fracas propriedades farmacocinéticas e a toxicidade dos compostos são uma das principais razões para que se encerre o desenvolvimento de candidatos a fármacos (GUPTA, S.; MOHAN, C. G., 2014). Neste contexto, foram computados algumas propriedades farmacocinéticas dos compostos que incluiu o peso molecular, a área de superfície polar (PSA), logP, logBB, porcentagem de absorção oral humana, atividade predita no sistema nervoso central, permeabilidade aparente em Caco-2, entre outras usando o módulo QikProp do software Schrödinger.

O perfil de toxicidade dos compostos foi avaliado usando o programa DEREK. O DEREK é um sistema especialista baseado no conhecimento para a predição qualitativa de toxicidade. O DEREK realiza essas predições tendo como base uma série de regras e cada regra descreve a relação entre uma característica estrutural ou um toxicóforo e sua toxicidade associada. Além de carcinogenicidade, pontos toxicológicos atualmente abrangidos pelo sistema do DEREK ainda incluem mutagenicidade, sensibilização da pele, irritação, teratogenicidade e neurotoxicidade (DEREK 10.0, LHASA Limited, Leeds, UK, 2010).

3.10.1. DEREK

Predizer se um fármaco será tóxico, específico ou, ainda, se não sofrerá algum tipo de biometabolismo até chegar ao seu alvo receptor, contribui para agilizar a descoberta de um novo fármaco, reduzindo etapas desse processo. É de grande importância se preocupar, desde os estágios iniciais do planejamento de um fármaco, com a baixa toxicidade e alta especificidade deste fármaco proposto.

Assim, propriedades tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) podem ser preditas a partir do screening em bancos de dados contendo essas informações, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos (TESTA, B. et al., 2005). Entre os programas mais utilizados para esses fins, destaca-se o DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge).

Para a predição de toxicidade dos compostos sugeridos como potenciais ligantes da proteína AChE foi utilizado o programa DEREK (SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G., 1991). Este programa faz predições de forma qualitativa e, dessa forma, gera alertas sobre a possível ação tóxica dos compostos químicos por ele analisados. O sistema é capaz de interpretar subestruturas toxicofóricas presentes nos

compostos como possíveis indutoras de certos tipos de toxicidade, através das regras de correlação implementadas no programa, operando em duas linguagens diferentes: na primeira, que é mais simples, faz uso do número de átomos e ligações para definir o grupo toxicofórico; na segunda, que é mais complexa, consegue responder questões a respeito da estrutura do grupo químico analisado (RIDINGS, J. E. et al., 1996).

O programa DEREK foi utilizado para prever carcinogenicidade, mutagenicidade e sensibilização da pele para os compostos investigados. Esta análise fornece um critério para excluir substâncias potencialmente nocivas na fase de seleção, para a síntese de compostos e futuros testes experimentais.

Os compostos selecionados após as várias etapas de screening virtual baseado na estrutura e no ligante foram analisadas. Como resultado, o programa DEREK indicou se uma resposta tóxica específica pode ocorrer. Este programa não fornece uma estimativa quantitativa de predição, ao invés disso ele possui algumas regras básicas que consistem de descrições das subestruturas moleculares como se fossem alertas estruturais que estão associados com específicos pontos tóxicos, ou seja, uma vez que uma subestrutura pode existir em uma variedade de contextos moleculares, as regras básicas não são quimicamente específicas, ao invés disso, servem como generalizações amplas no que diz respeito à estrutura química.

3.10.2. QikProp

O QikProp é um programa rápido e preciso para a predição de propriedades físico-químicas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Além de prever propriedades moleculares, o QikProp apresenta faixas de comparação entre as propriedades da molécula ou composto que se está analisando com 95% dos fármacos conhecidos e utilizados como referência.

Dentre as propriedades calculadas pelo programa, pode-se destacar àquelas cujos melhores valores para a penetração da barreira hematoencefálica já foram relatadas na literatura (JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S., 2010). As propriedades físico-químicas de interesse são: peso molecular que deve ser menor do que 450 Daltons, área de superfície polar que deve ser menor do que 90 Å, coeficiente de partição octanol/água (LogP) de aproximadamente 2,5 e coeficiente de partição cérebro/sangue (LogBB) maior do que -0,5. Além dessas propriedades, a propriedade “Predicted CNS Activity”

também foi analisada para ser levada em consideração para as análises dos compostos selecionados.

As propriedades ADME dos compostos selecionados foram preditas usando este módulo do pacote de programas Schrödinger Maestro 9.1. Essa abordagem deu uma estimativa das propriedades físico-químicas e a biodisponibilidade dos compostos selecionados. A aceitabilidade dos compostos baseados na regra dos cinco de Lipinski foram também estimadas a partir dos resultados.

3.11. SEA (Similarity Ensemble Approach)

O SEA é uma ferramenta de busca online (<http://sea.bkslab.org/>) que relaciona as proteínas com base na semelhança química dos seus ligantes. Essa abordagem é baseada na hipótese de que duas moléculas similares são susceptíveis de ter propriedades similares e se ligarão ao mesmo grupo de proteínas. Considerando que esta hipótese pode ser violada em casos específicos como o de uma pequena mudança na estrutura química alterar drasticamente a afinidade de ligação, a similaridade química é muitas vezes um bom guia para a ação biológica de uma molécula orgânica.

O objetivo desse método é relacionar receptores entre si quantitativamente com base na semelhança química entre os seus ligantes. Assim, esta ferramenta foi validada utilizando uma coleção de aproximadamente 65.000 ligantes em conjuntos de centenas separados e relacionados a alvos farmacológicos. A pontuação de similaridade (coeficiente de Tanimoto) entre cada conjunto foi calculado usando a topologia do ligante e um modelo estatístico foi desenvolvido para classificar a significância dos resultados obtidos com a pontuação de similaridade mostrando, assim, que as proteínas-alvo podem ser relacionadas quantitativamente pelos seus ligantes (KEISER, M. J. et al., 2007).

A similaridade do conjunto de ligantes estabelecida a apenas alguns outros ligantes deve-se às diferenças químicas intrínsecas entre a maioria dos conjuntos e à discriminação do modelo estatístico entre similaridade significativa ($E\text{-value} < 1 \times 10^{-10}$) e insignificante ($E\text{-value} > 1.0$) (KEISER, M. J. et al., 2007).

Portanto, foi investigada a relação entre os ligantes selecionados das etapas efetuadas após os experimentos de screening virtual com a base de dados do SEA e a significância da similaridade entre eles através do E-value.

3.12. Ensaio de atividade enzimática

As amostras foram submetidas a ensaios para determinação de atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase (AChE de *Electrophorus electricus*).

O ensaio de atividade da AChE foi determinado através da adaptação do método colorimétrico originalmente descrito por Ellman et al. (1961). Resumidamente, 125 µl de 10 mM DTNB, 50 µl de H₂O Mili-Q e 25 µl de acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) Tipo VI-S (1U/mL) foram adicionados a microplacas seguido por 30 µl do fármaco teste ou a tacrina (controle positivo). Após 15 minutos de incubação a 25°C, 30 µl de 0,8 mM de iodeto acetiltiocolina (ATChI) foram adicionados a microplaca. A microplaca foi lida a 415nm cada 30 segundos durante 5 minutos (Microplate Reader Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK). Os experimentos foram realizados em triplicata e as atividades da AChE são expressas como % (porcentagem) de inibição.

A concentração inicial testada para verificar se os compostos possuem atividade sobre a enzima, foi de 2000 µM. Para aqueles compostos que apresentaram efeito a curva para determinar o IC₅₀ foi feita. As concentrações da curva foram: 1000, 500, 250 e 125 µM.

A concentração da enzima é padrão para todo o experimento. Uma curva foi feita durante a padronização do método até chegar a concentração ótima de 1U/mL. O pH utilizado foi 7 para simular condições corpóreas.

3.12.1. Ensaio Ellman

Os ensaios de atividade foram feitos de acordo com o método modificado de Ellmann (ELLMAN, G. L. et al., 1961). Tal método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina (ATChI). A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 415 nm (Esquema 3).

Esquema 3. Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a absorbância da enzima na presença do inibidor (A_i) com a absorbância inicial da enzima (A_0), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alinhamento sequencial e análise estrutural

Existem no banco de dados de estruturas PDB 153 estruturas da AChE de vários organismos, incluindo *Torpedo californica*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Dendroaspis angusticeps*, *Drosophila melanogaster*, *Electrophorus electricus*, *Rattus norvegicus*, e outros.

O alinhamento sequencial múltiplo das três sequências biológicas de diferentes espécies da enzima AChE (código PDB 1B41, 1C2O e 2CKM) revelou uma relação evolucionária entre elas mostrando uma homologia acima de 50% de identidade. Na Tabela 4, está a relação aos pares de cada uma das sequências.

Tabela 4. Alinhamento sequencial múltiplo das três sequências de diferentes espécies da enzima AChE.

Alinhamento sequencial	Escore (%)
2CKM : 1C2O	58

É aceito em modelagem de proteínas por homologia que um modelo de homologia é provável que seja preciso quando a identidade sequencial é maior do que 40% (WIESNER, J. et al., 2007). É normalmente suposto que sequências similares possuem uma função e estrutura similar, pode-se afirmar, portanto, que determinar o grau de similaridade entre duas sequências é uma forte evidência a essa suposição. Frente a isso é apresentado na Figura 18 o alinhamento múltiplo das sequências de resíduos de aminoácidos das diferentes enzimas e estão em destaque as regiões do sítio ativo de cada sequência que é conservado em todas as diferentes espécies.

```

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      --DPQLLVVRVGGQLRGIRLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVGSRRFMPPEP 48
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      --DAELLVTVRGGRLRGIRLKTPGGPVSAFLGIPFAEPPMGPRRFLPPEP 48
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      DDHSELLVNTKSGKVMGTRVPVLSSTHSAFLGIPFAEPPVGNMRRFRPEP 50
                                   ..*** ..*: * *: . . :*****:* ** **

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KRPWSGVLDATTQNVCYQYVDTLYPGFEGTEMNPNRELSDECLYLNWV 98
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KQPWSGVVDATTQNSVCYQYVDTLYPGFEGTEMNPNRELSDECLYLNWV 98
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KKPWSGVWNASTYPNNCQYQYDEQFPFGSGSEMNPNNREMSDECLYLNW 100
                                   *:***** :*: . * * :*: :*:*****:*****:

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      TPYPRPASPTPVLWIYGGGYSAGASLDVYDGRFLAQVEGAVLVSMNYR 148
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      TPYPRPSTPTPVLWIYGGGYSAGASLDVYDGRFLVQAERTVLVSMNYR 148
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VPSRPKS-TTVMVWIYGGGYSAGSSTLDVYNGKYLAYTEEVVLVLSYR 149
                                   . * * * * *:*****:*****:*. * . * :*****:

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VGTFGFLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWVQENIAAFGGDPMSVTLFGE 198
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VGAFGFLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWVQENVAAFGGDPTSVTLFGE 198
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VGAFGFLALHGSQEAEPGNVGLLDQRMALQWHDNIQFFGGDPKTVTLFGE 199
                                   *:***** ** :*****:*****:*. * :*****:

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      SAGAASVGMHILSLFSPSLFHRVQLQSGTPNGPWATVSAGEARRRATLLA 248
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      SAGAASVGMHLLSPPSRGLFHRVQLQSGAPNGPWATVGMGEARRRATQLA 248
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      SAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCWASVSAEGRRRAVELG 249
                                   *:*****: * * * :*****:*****: * * . * :*****:

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      RLVGCPPGGAGGNDTELIACLRTRPAQDLVDHWHVLPQESIFRFSFVPV 298
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      HLVGCPPGGTGGNDTELVACLTRPAQVLVNHWHVLPQESVFRFSFVPV 298
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      RNLNCLN----SDEELIHCLREKKPQELIDVBNVLPFDSIFRFSFVPV 295
                                   : . * . . * * : * * : * * : * : * : * :*****

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VDGDFLSDTPEALINTGDFQDLQVLGVVVKDESSYFLVYGVPGFSGDNES 348
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VDGDFLSDTPEALINAGDFHGLQVLGVVVKDESSYFLVYGAPGFSGDNES 348
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      IDGEFFPTSLSEMLNSGNFKKTQILLGVNKHDESSFFLLYGAPGFSGDNES 345
                                   **:*. : : :*: * : * : * : * : * : * : * : * : * :

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LISRAQFLAGVRIGVPQASDLAAEAVVLHYTDWLHPEDPTHLRDAMSADV 398
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LISRAEFLAGVRVGVPQVSDLAEEAVVLHYTDWLHPEDPARLREALSDV 398
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KISRDFMSGVKLSVPHANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIV 395
                                   * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : : : : :

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      GDHNVCVPVQLAGRLAAQGARGVYAYIFEHRASTLWPLWVGVRHGYEIE 448
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      GDHNVCVPVQLAGRLAAQGARGVYAYVFEHRASTLWPLWVGVRHGYEIE 448
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      GDHNVICPLMHFVNKYTKFNGTYLYFFNHRAENLVPEWVGVRHGYEIE 445
                                   *****: : : : : * * * : * : * : * : * : * : * :

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FIFGLPLDPSLNYTTEERIFAQRLMKYWTNFARTGDPNPRDPSKSPQWPP 498
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FIFGILDPSTRNYTAEKIFAQRLMRWANFARTGDPNEPRDPKAPQWPP 498
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FVFGPLPLVKELNYTAEELSRIMHYWATFAKTGNPNPHSQES-KWPL 494
                                   *:*** : * : * : : : : * : * : * : * : * : * : : :

1C2O_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      YTTAAQQYVSLNLKPLEVRRGLRAQTCAFWNRFLPKLLSAT----- 539
1B41_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      YTAGAQQYVSLDLRPLEVRRGLRAQCAFWNRFLPKLLSAT----- 539
2CKM_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FTTKEQKFIDLNTEPMKVHQLRVQMCVFVNQFLPKLLNATACDGEISS 543
                                   :*: * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 18. Alinhamento sequencial das estruturas de AChE das espécies *Electrophorus electricus* (código PDB 1C2O), *Homo sapiens* (código PDB 1B41) e *Torpedo californica* (código PDB 2CKM). As letras únicas representam os aminoácidos. Os aminoácidos de cor vermelha representam os aminoácidos pequenos, hidrofóbicos e aromáticos com exceção do resíduo de tirosina; os de cor azul representam os aminoácidos com características ácidas; os aminoácidos de cor magenta, são os aminoácidos com características básicas; os de cor verde são os aminoácidos que possuem hidroxila, amina e são básicos, com exceção do resíduo de glicina. Os outros aminoácidos, com outras características são coloridos de cinza. Os símbolos consensuais usados representam: “*”, significa que os resíduos nesta coluna são idênticos em todas as sequências no alinhamento; “:”, significa que substituições conservativas foram observadas e o símbolo “.”, significa que foram observadas substituições semiconservativas.

Através da análise da matriz de alinhamento, pode-se observar que os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo da AChE e que na Figura 17 estão destacados por retângulos, têm como características principais serem hidrofóbicos, aromáticos, alguns possuem características ácidas, outros possuem características

básicas, possuem um grupo hidroxila, e uns um grupo indol. Outro destaque deve ser dado ao fato de que todos os principais aminoácidos do sítio ativo das diferentes espécies são idênticos sendo apenas a tirosina de *Electrophorus electricus* e *Homo sapiens* substituída pela fenilalanina na estrutura de *Torpedo californica*, mas essa substituição é conservativa.

O alinhamento sequencial é uma abordagem da bioinformática e é uma maneira de organização para identificar regiões de similaridade que podem ser uma consequência do relacionamento funcional, estrutural ou evolucionário entre as sequências. Esses alinhamentos de sequências de resíduos de aminoácidos são representados como linhas dentro de uma matriz e os espaços (“gaps”) são inseridos entre os resíduos para que os caracteres idênticos ou similares sejam alinhados em colunas sucessivas.

Em alinhamentos de sequências de proteínas, o grau de similaridade entre os aminoácidos ocupando uma posição particular na sequência, neste caso, analisando os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, pode ser interpretado como uma medida aproximada de quão conservada uma região particular ou um motivo sequencial é entre as linhagens evolutivas. A ausência de substituições ou a presença de apenas substituições conservativas (ou seja, as substituições de aminoácidos cujas cadeias laterais têm propriedades bioquímicas similares), como é o caso, em uma região particular da sequência, o sítio ativo, sugere que esta região tem uma importância estrutural ou uma importância funcional (WIESNER, J. et al., 2007).

Este alinhamento de três espécies diferentes de AChE mostra que elas são enzimas evolutivamente muito conservadas e, embora, as estruturas primárias sejam diferentes, os seus sítios ativos são similares. Esta suposição levou Wiesner, J. e colaboradores (WIESNER, J. et al., 2007) a concluir que este fato pode levar a dificuldades, como por exemplo, na procura de inibidores específicos para uma espécie em particular. Porém, a conservação de resíduos do sítio ativo indica que há uma grande conservação estrutural e funcional das AChEs das diferentes espécies estudadas. Na Figura 19 é apresentado a sobreposição da estrutura da AChE das três espécies diferentes, evidenciando a conservação estrutural.

Figura 19. Alinhamento estrutural de AChE das espécies *Electrophorus electricus* (código PDB 1C2O), *Homo sapiens* (código PDB 1B41) e *Torpedo californica* (código PDB 2CKM).

O alinhamento tridimensional pode fornecer informações úteis para este tipo de estudo, como a observação de que as estruturas compartilham do mesmo tipo de enovelamento e, assim, têm funções similares. O alinhamento 3D procura combinar duas estruturas de tal maneira que o RMSD (do inglês, Root-Mean-Square Deviation) entre os átomos das estruturas sobrepostas seja o menor possível. Na Tabela 5, está apresentado o resultado para o cálculo de RMSD da sobreposição das estruturas tridimensionais da AChE humana, AChE de enguia elétrica e AChE de arraia elétrica. Estas estruturas são muito importantes para a compreensão do modo de ação da AChE. Uma vez que essas estruturas cristalográficas são conhecidas e o sítio ativo delas é muito bem descrito.

Tabela 5. RMSD da sobreposição das estruturas tridimensionais da AChE humana (1B41), AChE de enguia elétrica (1C2O) e AChE de arraia elétrica (2CKM).

Alinhamento tridimensional	RMSD (Å)
1B41 – 1C2O	0,60
1B41 – 2CKM	1,18
1C2O – 2CKM	1,19

Quando se consideram as estruturas 3D dos sítios ativos pode ser observado que os sítios são similares. O sítio ativo do complexo 2CKM de *Torpedo californica* é quase idêntico as AChEs de enguia elétrica e da humana. A única pequena diferença é a mutação da Tyr337 em humana e na enguia para Phe330 na estrutura de *Torpedo californica*. Na Figura 20, pode-se observar os resíduos de aminoácidos dos sítios ativos de cada espécie de AChE e a mutação que ocorre com relação a *Torpedo californica*, a humana e a de enguia elétrica.

Figura 20. Sobreposição dos principais resíduos de aminoácidos dos sítios ativos de cada espécie de AChE envolvidos na interação de ligantes. Em destaque, pode-se observar a mutação que ocorre entre a enzima de enguia elétrica (2CKM), a enzima humana (1B41) e a enzima de enguia elétrica (1C2O).

A mutação observada não causa nenhuma diferença significativa em ambas às propriedades eletrostáticas e estéricas da cavidade do sítio ativo, sendo, essa mutação, portanto, uma mutação conservativa. Ambos os resíduos de aminoácidos, tirosina e fenilalanina, possuem o grupo R aromático, são hidrofóbicos e tendem a se situar no interior de proteínas.

De acordo com os valores de RMSD é notável que todos os alinhamentos das estruturas de AChE têm o mesmo enovelamento e as diferenças específicas estão em uma posição exata e também pode ser visto que o tipo de cadeia lateral influencia na posição da cadeia principal. Por esta razão e como observado na Tabela 3 (escore%) e na Tabela 4 (RMSD) o alinhamento que possui o maior escore em porcentagem de similaridade é o alinhamento tridimensional que possui o menor RMSD, a recíproca desse resultado também é verdadeira. As estruturas terciárias das espécies *Electrophorus electricus* e *Homo sapiens* são muito similares à estrutura terciária de

Torpedo californica. Portanto, suas sequências primárias e terciárias, como observado, são muito similares, pois a identidade de alinhamento é muito alta.

4.2. Seleção de ligantes ativos – BindingDB e PDB – Parte 1

Através da busca feita na base de dados do BindingDB, foram encontrados 3488 inibidores da enzima AChE. Os resultados apresentados por esse web-servidor foi ordenado para mostrar apenas os inibidores com os menores valores de IC₅₀ (nM) e os selecionados foram aqueles que apresentavam esse valor menor do que 10000 nM, ou seja, 10 µM, sendo este o limiar pré-estabelecido para a seleção dos ligantes da AChE, quanto aqueles ligantes que se espera ocupar ambos os sítios da enzima simultaneamente.

Destes, foram selecionados 460 inibidores que foram utilizados como base de dados para a atividade de screening virtual baseados na similaridade desse ligante frente a base de dados CNS ZINC, etapa esta que será detalhada posteriormente.

Dos 461 inibidores selecionados com valor de atividade menor do que 10 µM, 8 inibidores com complexos depositados no banco de dados do PDB foram encontrados (Tabela 6) e alguns dos inibidores bioativos desses complexos foram selecionados para a derivação do padrão farmacofórico, a saber, apenas foram selecionados os que possuíam maior atividade biológica de acordo com o IC₅₀ fornecido pelo web-servidor BindingDB e a característica de ocuparem simultaneamente o sítio periférico e o sítio catalítico da enzima AChE.

Tabela 6. Complexos cristalográficos selecionados do banco de dados PDB.

Ligantes dos complexos cristalográficos	IC ₅₀ (nM)
2CKM	0,2
1UT6	1,5
1EVE	1,7
1GPK	5,0
1ACJ	7,6
1ODC	8,8
1W6R	100,0

Por uma pesquisa feita no banco de dados do PDB, outros inibidores da AChE (ligante dos complexos 3I6M, 2CMF, 1W4L, 1H23, 1H22 e 1E3Q) foram selecionados para completarem a base de dados tanto daqueles ligantes que seriam utilizados para a derivação do padrão farmacofórico, quanto daqueles que seriam utilizados servindo de “contaminantes” a uma base de dados aleatória e utilizada para as validações tanto do modelo farmacofórico quanto do método de screening virtual do programa GLIDE a fim de analisar a recuperação dos ligantes bioativos, totalizando 13 inibidores de complexos cristalográficos.

4.3. Screening virtual baseado no ligante – Farmacóforo

Os compostos virtuais com enumeradas conformações foram mapeados através de um farmacóforo que foi derivado de compostos bioativos conhecidos. O modelo farmacofórico utilizado neste trabalho para melhorar a eficácia do screening virtual foi construído com base nas características químicas de cinco compostos bioativos: a tacrina, ligante do complexo com o código PDB 1ACJ e um fármaco já utilizado como inibidor reversível da AChE; um dímero da tacrina ligado por uma cadeia alquílica de cinco átomos de carbono, ligante da AChE do complexo 1UT6; o ligante bis-(5)-tacrina do complexo 2CMF também um dímero da tacrina; um dímero da tacrina ligado por uma cadeia alquílica de sete átomos de carbono (bis-(7)-tacrina) em complexo com a AChE, código PDB 2CKM e o ligante do complexo de código PDB 1ODC (Figura 21).

Figura 21. Farmacóforo derivado pelo programa Discovery Studio 4.0, usado em triagens de inibidores da AChE. O farmacóforo derivado possui dois anéis aromáticos (esferas em laranja) e um grupo aceitador de ligação de hidrogênio (esferas em verde).

O modelo farmacofórico foi derivado de acordo com as interações ligante-proteína, assim, o farmacóforo para a proteína-alvo, AChE, foi construído baseado na

estrutura cristalográfica do complexo ligante-proteína usando o programa Discovery Studio 4.0. As características comuns de todas as hipóteses encontradas após a geração dos modelos foram, primeiramente, validadas para serem usadas para as atividades de screening virtual.

As hipóteses foram classificadas de acordo com o número de ligantes que se combinaram para formar o farmacóforo, os pontos dados por essa classificação, a recuperação dos compostos bioativos utilizados para a geração do modelo frente a uma base de dados de vários compostos desconhecidos e sua disposição dentro do sítio ativo da enzima AChE. Foram gerados 10 modelos farmacofóricos, o melhor modelo selecionado indicou três características para o ligante a ser selecionado. A qualidade do mapeamento entre os compostos e a melhor hipótese do modelo farmacofórico foi indicado pelo “Fit Value”.

Entre todas as hipóteses, o modelo Hypo 1 foi o escolhido e apresenta as seguintes características químicas: dois anéis aromáticos e um aceitador de ligação de hidrogênio (Figura 22).

Figura 22. Hipótese 1, gerada pelo programa Discovery Studio 4.0 mantendo-se rígidas as conformações cristalográficas dos inibidores dos complexos 1ACJ, 1UT6, 2CMF, 2CKM e 1ODC.

O farmacóforo escolhido das 10 hipóteses propostas possui, portanto, as características dos ligantes que também são importantes na estrutura da enzima (Figura 23), sendo que um dos dois anéis aromáticos está próximo dos resíduos de aminoácido Trp279 e Tyr70 que são importantes resíduos do sítio ativo periférico (PAS). Estudos revelaram que os inibidores do PAS mostraram-se inibir a catálise através de uma combinação de bloqueio estérico dos ligantes entrando e deixando a cavidade e por alteração alostérica da conformação da tríade catalítica e de sua eficiência (BOURNE,

Y. et al., 2003). Em relação à formação do peptídeo β -amiloide, é descrito na literatura que este sítio pode estar envolvido na aceleração da formação da fibrila, uma vez que tanto os inibidores do PAS e um anticorpo monoclonal voltados para o PAS bloquearam o efeito amiloidogênico da AChE, mostrando assim a grande importância da ocupação de inibidores nesse sítio (DE FERRARI, G. V. et al., 2001). Esta região do sítio ativo periférico possui capacidades cruciais de empilhamento do anel indol do Trp279 através principalmente de interações de empilhamento- π .

O outro anel aromático do farmacóforo encontra-se na região denominada sítio ativo catalítico (CAS). Os resíduos importantes de interação deste sítio são o Trp84, a Phe330 e o resíduo de aminoácido His440, este fazendo parte da tríade catalítica da enzima AChE e claramente relacionado com a região aceitadora de ligação de hidrogênio. As interações que podem ocorrer nesta porção do sítio dizem respeito a interações de empilhamento- π com o Trp84 e com a His330, assim como em interações cátion com a His440 através de seus elétrons π . O farmacóforo atua no sítio ativo duplo da enzima e é capaz de ser usado para identificar os compostos estruturalmente diversos que têm maior atividade para o tratamento da doença de Alzheimer com base no método de screening virtual.

Figura 23. Grupos farmacofóricos dentro no sítio ativo da enzima AChE e próximos aos principais aminoácidos de interação desta enzima. Este modelo farmacofórico foi analisado dentro do sítio e um pequeno ajuste foi feito para que os grupos aromáticos ficassem melhor arranjados no sítio ativo.

4.3.1. Validação do farmacóforo

A validação do farmacóforo foi realizada através da contaminação de uma pequena parte da subcoleção CNS da base de dados ZINC com 13 inibidores de referência: os 13 inibidores cristalográficos e bioativos. Sendo assim, a base de dados utilizada para a validação do melhor modelo farmacofórico continha 585 compostos desconhecidos e aleatórios da base de dados ZINC e 13 ligantes bioativos da AChE selecionados a partir das buscas feitas no BindingDB e no PDB. Desses 13 ligantes bioativos, 9 ligantes tinham a possibilidade de ligarem-se a ambos os sítios da AChE. Após a validação, o melhor modelo selecionado foi o que recuperou 4 desses ligantes bioativos capazes de se ligarem tanto no sítio ativo periférico como no sítio ativo catalítico (Tabela 7). Os outros modelos mal recuperaram os ligantes bioativos, pois muitas das outras hipóteses não obtiveram as características necessárias para interação simultânea em ambos os sítios da enzima.

Tabela 7. Ligantes dos complexos cristalográficos recuperados após a busca feita com o farmacóforo em uma base de dados contaminada.

Ligantes dos complexos cristalográficos	FitValue
2CKM	2,95
1ODC	2,58
2CMF	2,58
1EVE	1,82

4.4. Etapas realizadas na abordagem de screening virtual – experimentos realizados durante a seleção dos compostos

4.4.1. 1ª etapa: screening virtual baseado na estrutura e no ligante – experimentos realizados com o programa GLIDE e farmacóforo

Na primeira parte da etapa desse estudo, as simulações de screening virtual foram realizadas com o programa GLIDE contra a estrutura da AChE de *Torpedo californica* (código PDB 2CKM). A base de dados de compostos utilizada foi a subcoleção CNS da ZINC.

Em um primeiro momento, essa base de dados foi utilizada com o objetivo de selecionar os compostos com o potencial de se ligarem em ambos os sítios da enzima AChE preenchendo esse sítio e efetuando interações similares as interações propostas

para o composto bis-tacrina, sendo este ligante tomado como modelo e padrão de interações em todas as etapas aqui descritas para os estudos de interação dos compostos desconhecidos.

Após a preparação da enzima para serem efetuadas todas as etapas subsequentes e através da abordagem de docking flexível presente no programa GLIDE selecionando o modo HTVS, foram selecionados, nesta primeira simulação, os 5000 melhores compostos da subcoleção CNS ZINC.

Essa base de dados composta por 5000 moléculas foi, então, submetida a novas simulações de screening virtual agora por farmacóforo a fim de selecionar aqueles compostos que melhor se posicionavam no modelo construído, utilizando-se o algoritmo que gera um maior número de confôrmeros (“Best”).

Após essa simulação foram selecionadas 36 moléculas. Esse resultado foi filtrado, sendo considerada apenas uma conformação para cada molécula (“MapNumber” igual a 1), ou seja, a de maior pontuação (“FitValue”). Foram também consideradas apenas as moléculas que se ajustaram aos três grupos farmacofóricos do modelo (“PharmType” igual a 3), de uma só vez. Portanto, dessas 36 moléculas apenas aquelas que tinham obtido a melhor conformação, excluindo-se mais de um confôrmero gerado para cada molécula pelo programa Discovery Studio, e que se posicionavam dentro das três esferas de exclusão e que obtiveram as melhores pontuações (“Fit Value”) que de acordo com a validação das moléculas bioativas conhecidas fica entre 1,8 e 3, seis moléculas foram selecionadas após a filtragem por farmacóforo que obtiveram as características supracitadas (Tabela 8).

Tabela 8. Os seis compostos selecionados após a 1ª etapa de seleção.

Compostos selecionados 1ª etapa	FitValue
ZINC32213028	3,49
ZINC32065780	2,35
ZINC30181322	2,21
ZINC32065636	2,01
ZINC32758868	1,95
ZINC32761010	1,93

Nas Figuras 24 a 26 estão representados os modos de ligação para os compostos selecionados nesta etapa do trabalho. Os compostos selecionados nesta etapa foram divididos em três grupos distintos. Podem-se destacar as interações de empilhamento- π que ocorrem entre os compostos selecionados e os resíduos de aminoácidos Trp279 e Tyr70 do sítio PAS e entre os resíduos de aminoácido Trp84 e Phe330 do sítio CAS. Alguns dos compostos que foram selecionados também interagem via interação de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido Tyr334 e Asp72 que também fazem parte do sítio PAS tornando, assim, favoráveis as ligações desses compostos no sítio ativo da enzima. Portanto, o Grupo I foi formado pelos compostos que além de interagirem com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS, também interagiam via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr334 e o oxigênio da carbonila do composto selecionado.

O Grupo II foi formado pelos compostos que além de interagirem com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS, também interagiam via ligação de hidrogênio com seu oxigênio da carbonila interagindo com o oxigênio da carboxila do resíduo de aminoácido Asp72.

Finalmente, o Grupo III é formado por aqueles compostos selecionados que não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS.

Figura 24. Os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo I. Em destaque (círculo vermelho) está representada pela linha preta tracejada a interação via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr334 e o oxigênio da carbonila do composto.

Figura 25. Os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo II. Em destaque (circulo vermelho) está representada pela linha preta tracejada a interação via ligação de hidrogênio do oxigênio da carbonila do composto com o oxigênio da carboxila do resíduo de aminoácido Asp72.

Figura 26. Os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III. Este grupo é formado por aqueles compostos selecionados que não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS.

Na Tabela 9, a seguir, estão destacados os compostos que além de interagirem por meio de interações de empilhamento- π com os aminoácidos já mencionados ainda fazem importantes interações de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos ao longo do sítio ativo.

Tabela 9. Compostos selecionados da 1ª etapa que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.

Composto	Tipo de interação	Resíduos de interação com o composto	Distância (Å)
----------	-------------------	--------------------------------------	---------------

ZINC32065780	Ligação de hidrogênio	Tyr334	2,9
ZINC32065636	Ligação de hidrogênio	Tyr334	3,3
ZINC32758868	Ligação de hidrogênio	Asp72	3,4
ZINC32761010	Ligação de hidrogênio	Tyr334	3,3

4.4.2. 2ª etapa: screening virtual baseado no ligante e na estrutura – experimentos realizados no programa GLIDE (similaridade) e farmacóforo

Nesta etapa desse trabalho, uma busca através do programa GLIDE foi feita na base de dados CNS ZINC, mesma base de dados de compostos virtuais utilizada na etapa anterior e que também será usada nas etapas subsequentes, para encontrar compostos estruturalmente similares a base de dados construída a partir dos compostos ativos selecionados do web-servidor BindingDB. Os 460 compostos foram unidos em um único arquivo e submetido a esta busca.

Como resultado deste primeiro passo desta etapa, foram selecionados os 5000 melhores compostos de acordo com os menores valores de GlideScore e de acordo com a pontuação dada a partir da similaridade já descrita no tópico dos métodos. Estes compostos foram, então, usados para screening virtual por farmacóforo.

O farmacóforo final que foi construído a partir da derivação do padrão farmacofórico dos ligantes bioativos selecionados, foi agora utilizado para a triagem através do programa Discovery Studio nesse novo banco de dados formado pelos 5000 melhores compostos utilizando-se o algoritmo “Best” para a geração de confôrmeros. Após essa triagem, o resultado foi filtrado e foi considerada apenas uma conformação para cada molécula selecionando a opção “MapNumber” igual a 1. Foram consideradas também apenas as moléculas que se ajustaram aos 3 grupos farmacofóricos de uma só vez do modelo selecionando a opção “Pharmtype” igual a 3. O “FitValue”, valor atribuído de acordo com o ajuste do inibidor ao farmacóforo, foi organizado em ordem decrescente. Assim, foram obtidos, após essa filtragem, 181 compostos.

Em mais um passo desta segunda etapa, os 181 compostos foram então usados para o screening virtual de alto rendimento no programa GLIDE (modo XP) contra a

enzima AChE de *Torpedo californica*. Baseado no GlideScore, os 50 melhores compostos, com as melhores pontuações, foram selecionados para o próximo passo desta etapa.

Os 50 melhores compostos do passo anterior foram submetidos, agora, a simulações de docking flexível ainda no programa GLIDE a um procedimento denominado de rescore. Neste procedimento, o programa gera 10 conformações para cada molécula submetida a ele e o resultado dado são algumas das melhores conformações obtidas para cada molécula.

Sendo que algumas conformações geradas por este método, preliminarmente, são descartadas e outras apresentam orientações com interações favoráveis no sítio ativo da enzima AChE, obteve-se, assim, 143 conformações após este procedimento.

Após uma análise minuciosa de cada uma dessas 143 conformações no sítio ativo da enzima, foram selecionadas 31 compostos que ainda foram submetidos a outros filtros para a seleção dos melhores a serem comercialmente adquiridos.

Como último passo, filtros de toxicidade, propriedades físico-químicas e análises de campos de interação molecular foram aplicados a esses 31 compostos selecionados. Após a aplicação dessa nova filtragem foram selecionados, finalmente, 14 compostos.

Na Tabela 10, a seguir, estão destacados os compostos que além de interagirem por meio de interações de empilhamento- π com os aminoácidos já mencionados ainda fazem importantes interações de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos ao longo do sítio ativo.

Tabela 10. Compostos selecionados da 2ª etapa que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.

Composto	Tipo de interação	Resíduos de interação com o composto	Distância (Å)
ZINC01462359	Ligação de hidrogênio	Asp72	3,3
	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,6
ZINC32066030	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,6
ZINC09980941	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,8
		Asp72	3,0

	Ligação de hidrogênio		
ZINC32760148	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,6
ZINC32760177	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,9
ZINC32760927	Ligação de hidrogênio Ligação de hidrogênio	Tyr121 Asp72	2,8 3,3
ZINC28976526	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,7

4.4.2.1. Análise dos modos de ligação e análise dos campos de interação molecular

Com o objetivo de se quantificar a habilidade do sítio ativo da AChE em interagir com inibidores, foram realizados novos e adicionais cálculos de campos de interação molecular (MIF), para a proteína.

Os campos de interação molecular foram gerados utilizando-se o programa GRID, a estrutura da AChE da espécie *Torpedo californica* e os grupos químicos específicos (as sondas virtuais). Os cálculos foram realizados dentro de uma região selecionada (o sítio ativo), o qual foi posicionado dentro de uma caixa (o “grid”). Utilizou-se a estrutura da AChE (código PDB 2CKM) e o grupo químico de sonda virtual: Carbono aromático.

A utilização desse grupo de prova tem por objetivo a definição de regiões significativas no sítio ligante da AChE (“hot spots”) que sejam capazes de acomodar ligantes com características químicas consideradas relevantes para a realização de interações com a proteína. São as seguintes características gerais:

- Como todos os compostos selecionados apresentam anéis aromáticos em sua estrutura, um dos grupos de sonda virtual analisado foi o Carbono aromático, que é um grupo de prova hidrofóbico mais específico que o

clássico grupo de sonda virtual DRY (hidrofóbico). Estes dois grupos de sonda virtual identificam sítios na proteína que favorecem a acomodação, do ponto de vista energético, destes anéis hidrofóbicos e outras regiões hidrofóbicas dos ligantes.

Assim sendo, campos de interação molecular foram calculados para a proteína. Nas Figuras 27 a 29 estão representados os modos de ligação para os compostos selecionados nesta etapa do trabalho e as regiões que apresentaram interação. Os compostos selecionados nesta etapa, assim como na etapa anterior, também foram divididos em três grupos distintos. Em suas respectivas legendas mostramos em qual nível energético (energias em kcal/mol) elas são apresentadas. As interações de empilhamento- π que ocorrem entre os compostos selecionados e os resíduos de aminoácidos Trp279 e Tyr70 do sítio PAS e entre os resíduos de aminoácido Trp84 e Phe330 do sítio CAS podem ser observadas, assim como as interações que alguns dos compostos que foram selecionados também fazem via interação de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido Tyr121 e Asp72 que também fazem parte do sítio PAS tornando, assim, favoráveis as ligações desses compostos no sítio ativo da enzima.

Assim sendo, o Grupo I foi formado pelos compostos que além de interagirem via empilhamento- π com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS, também interagem via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o oxigênio da carbonila do composto selecionado e entre a carboxila do resíduo de aminoácido Asp72 e o nitrogênio do composto selecionado.

O Grupo II foi formado pelos compostos que além de interagirem com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS, interagem via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o oxigênio da carbonila do composto selecionado. E o Grupo III é formado por aqueles compostos selecionados que não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS via empilhamento- π .

Figura 27. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo I. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol. (B) Em destaque (círculo vermelho) está representada pela linha preta tracejada a interação via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o oxigênio da carbonila do composto selecionado e entre a carboxila do resíduo de aminoácido Asp72 e o nitrogênio do composto selecionado.

Figura 28. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo II. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3.8 kcal/mol. (B) Em destaque (círculo vermelho) está representada pela linha tracejada a interação via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr 121 e o oxigênio do composto selecionado.

Figura 29. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol. (B) Representação dos compostos selecionados que não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS via empilhamento- π .

4.4.3. 3ª etapa: screening virtual baseado na estrutura e no ligante – experimentos de screening virtual baseado no farmacóforo e GLIDE

Nesta etapa do trabalho, o primeiro passo a ser realizado foi a submissão da base de dados CNS ZINC ao screening virtual por farmacóforo. O uso de modelos farmacofóricos na etapa de triagem de compostos é um procedimento eficiente, pois elimina rapidamente as moléculas que não possuem os recursos necessários, como por exemplo, o ajuste do composto aos grupos farmacofórico, levando a um aumento relevante na qualidade dos resultados.

O farmacóforo final que foi construído a partir da derivação do padrão farmacofórico dos ligantes bioativos selecionados, foi utilizado para a triagem através

do programa Discovery Studio para a base de dados CNS ZINC utilizando-se o algoritmo “Fast” para uma rápida triagem. Após esse experimento inicial, o resultado foi a seleção de 13.262 compostos que se ajustaram relativamente bem ao farmacóforo. Estes compostos, então, foram filtrados e foi considerada apenas uma conformação para cada molécula selecionando a opção “MapNumber” igual a 1, foram consideradas também apenas as moléculas que se ajustaram aos 3 grupos farmacofóricos de uma só vez do modelo selecionando a opção “Pharmtype” igual a 3. O “FitValue”, valor atribuído de acordo com o ajuste do inibidor ao farmacóforo, foi organizado em ordem decrescente e, assim, foram obtidos, após essa filtragem, 200 compostos.

O próximo passo realizado foi o screening virtual baseado na estrutura, no qual os 200 compostos advindos do passo anterior foram usados para a realização do screening virtual de alto rendimento no programa GLIDE (modo XP) contra a enzima AChE de *Torpedo californica*. Baseado no GlideScore, os 50 melhores compostos, com as melhores pontuações, foram selecionados para o próximo passo desta etapa.

Os 50 melhores compostos do passo anterior foram submetidos ao experimento rescoring no programa GLIDE. Sendo assim, obteve-se 129 conformações após este procedimento.

Após uma análise minuciosa de cada uma dessas 129 conformações no sítio ativo da enzima, foram selecionados 27 compostos que ainda foram submetidos a outros filtros para a seleção dos melhores a serem comercialmente adquiridos.

Como último passo, filtros de toxicidade, propriedades físico-químicas e análises de campos de interação molecular foram aplicados a esses 27 compostos selecionados. Após a aplicação dessa nova filtragem foram selecionados, finalmente, 16 compostos.

Na Tabela 11, a seguir, estão destacados os compostos que além de interagirem por meio de interações de empilhamento- π com os aminoácidos já mencionados ainda fazem importantes interações de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos ao longo do sítio ativo.

Tabela 11. Compostos selecionados da 3ª etapa que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.

Composto	Tipo de interação	Resíduos de interação com o composto	Distância (Å)
ZINC30318819	Ligação de	Tyr121	2,7

	hidrogênio		
ZINC30363274	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,6
ZINC31489398	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,8
ZINC32066030	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,6
ZINC32400169	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,7
ZINC32400601	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,9
	Ligação de hidrogênio	Ty70	3,3
ZINC32400603	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,7
ZINC32428810	Ligação de hidrogênio	Tyr121	3,2
ZINC32428809	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,8
ZINC32735781	Ligação de hidrogênio	Tyr121	2,6

4.4.3.1. Análise dos modos de ligação e análise dos campos de interação molecular

Para as moléculas selecionadas no screening virtual que mostraram maior escore de interação com o sítio ligante da AChE e que foram refinadas no procedimento de rescore, observou-se que esses inibidores podem tirar vantagem de uma característica do sítio ativo da enzima e fazer uma série de interações. A cavidade que conduz ao sítio ativo é revestida por resíduos de aminoácidos aromáticos, portanto, as interações hidrofóbicas serão favorecidas.

Como todos os compostos selecionados apresentam anéis aromáticos em sua estrutura, um dos grupos de sonda virtual analisado foi o Carbono Aromático, que é um

grupo de prova hidrofóbico mais específico que o clássico grupo de sonda virtual DRY (hidrofóbico). Estes dois grupos de prova identificam sítios na proteína que favorecem a acomodação, do ponto de vista energético, destes anéis hidrofóbicos e outras regiões hidrofóbicas dos ligantes.

Assim sendo, campos de interação molecular foram calculados para os dezesseis compostos selecionados. Nas Figuras 30 a 33 estão representados os modos de ligação para os compostos selecionados nesta etapa do trabalho e as regiões que apresentaram interação. Assim como foi feito nas outras etapas, os compostos selecionados também foram divididos em três grupos distintos. Em suas respectivas legendas mostramos em qual nível energético (energias em kcal/mol) elas são apresentadas. As interações de empilhamento- π que ocorrem entre os compostos selecionados e os resíduos de aminoácidos Trp279 e Tyr70 do sítio PAS e entre os resíduos de aminoácido Trp84 e Phe330 do sítio CAS podem ser observadas, assim como as interações que alguns dos compostos que foram selecionados também fazem via interação de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido Tyr121, Tyr70 e Asp72 que também fazem parte do sítio PAS tornando, assim, favoráveis as ligações desses compostos no sítio ativo da enzima.

O Grupo I foi formado pelos compostos que além de interagirem com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS via empilhamento- π , apenas interagiam via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o átomo de oxigênio da carbonila do composto selecionado.

O Grupo II foi formado pelos compostos que além de interagirem com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS via empilhamento- π , também interagiam via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o átomo de nitrogênio do composto selecionado e pela ligação de hidrogênio formada entre o átomo de oxigênio da Tyr70 e o átomo de oxigênio da carbonila.

O Grupo III é formado por aqueles compostos selecionados que além de interagirem via empilhamento- π com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS, interagiam via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o átomo de nitrogênio do composto selecionado e entre a carboxila do resíduo de aminoácido Asp72 e o átomo de oxigênio do composto selecionado.

Finalmente, o Grupo IV é formado por aqueles compostos selecionados que não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de

aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações de empilhamento- π com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS.

Figura 30. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo I. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol. (B) Em destaque (círculo vermelho) está representada pela linha preta tracejada a interação via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o oxigênio da carbonila do composto selecionado.

Figura 31. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo II. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol. (B) Em destaque (círculo vermelho) está representada pela linha preta tracejada a interação via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o átomo de nitrogênio do composto selecionado.

Figura 32. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol. (B) Em destaque (círculo vermelho) está representada pela linha tracejada a interação via ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr121 e o átomo de nitrogênio do composto selecionado e entre a carboxila do resíduo da Tyr121 e o átomo de nitrogênio do composto selecionado e entre a carboxila do resíduo de aminoácido Asp72 e o átomo de oxigênio do composto selecionado.

Figura 33. Campos de interação molecular calculados e os modos de ligação propostos por simulações de docking flexível para os compostos do Grupo III. Em (A) está representada a sobreposição do composto selecionado sobre o grupo de prova Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol. (B) Representação dos compostos selecionados que não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS via empilhamento- π .

4.4.4. 4ª etapa: screening virtual baseado na estrutura – GLIDE

Nesta etapa, a base de dados CNS ZINC foi submetida apenas ao método de screening virtual baseado na estrutura. As simulações de screening virtual foram realizadas com o programa GLIDE contra a estrutura da AChE de *Torpedo californica*.

Em um primeiro momento, essa base de dados foi utilizada com o objetivo de selecionar os compostos com o potencial de se ligarem em ambos os sítios da enzima AChE preenchendo esse sítio e efetuando interações similares as interações propostas para o composto bis-tacrina, sendo este ligante tomado como modelo e padrão de interações em todas as etapas iniciais aqui descritas para os estudos de interação dos compostos desconhecidos da base de dados com a enzima da espécie *Torpedo californica*.

Após a preparação da enzima para serem efetuadas todas as etapas subsequentes e através da abordagem de docking flexível presente no programa GLIDE selecionando o modo HTVS, foram selecionados, nesta primeira simulação, os 5000 melhores compostos da subcoleção CNS ZINC. Estes compostos foram então usados para o screening virtual de alto rendimento no programa GLIDE (modo XP). Baseado no GlideScore, os 50 melhores compostos, com as melhores pontuações, foram selecionados para o próximo passo desta etapa.

Os 50 melhores compostos do passo anterior foram submetidos, mais uma vez, ao experimento de rescore. Obteve-se, assim, 135 conformações após este procedimento.

Após uma análise minuciosa de cada uma dessas 135 conformações no sítio ativo da enzima, foram selecionadas apenas 2 compostos (ZINC32729496 e ZINC33089640) que foram submetidos a análises de toxicidade e propriedades físico-químicas. Neste caso, apenas interações de empilhamento- π ocorrem entre os compostos selecionados e os resíduos de aminoácidos Trp279 e Tyr70 do sítio PAS e entre os resíduos de aminoácido Trp84 e Phe330 do sítio CAS podem ser observadas.

Estas duas moléculas selecionadas no screening virtual mostraram maior escore relativo de interação com o sítio ligante da AChE e após serem refinadas no procedimento de rescore, observou-se que esses inibidores podem tirar vantagem de uma característica do sítio ativo da enzima e fazer uma série de interações tanto no sítio PAS quanto no sítio CAS. O sítio ativo é revestido por resíduos de aminoácidos aromáticos, portanto, as interações hidrofóbicas serão favorecidas.

Como todos os compostos selecionados apresentam anéis aromáticos em sua estrutura, um dos grupos de prova analisado no passo de análise de campos de interação foi o Carbono aromático, que é um grupo de prova hidrofóbico mais específico que o clássico grupo de prova DRY (hidrofóbico). Estes dois grupos de prova identificam sítios na proteína que favorecem a acomodação, do ponto de vista energético, destes anéis hidrofóbicos e outras regiões hidrofóbicas dos ligantes.

Assim sendo, campos de interação molecular foram calculados para os dois compostos selecionados. Na Figura 34, estão representados os modos de ligação para os compostos selecionados nesta etapa do trabalho e as regiões que apresentaram interação.

Figura 34. Campos de interação molecular calculados para os compostos ZINC32729496 (A) e ZINC33089640 (B) sobrepostos com o grupo de prova carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol.

Estes dois compostos selecionados nesta etapa não realizavam nenhuma interação via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, apenas as interações de empilhamento- π com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS e pode-se observar que não há uma boa sobreposição dos anéis aromáticos de ambos os compostos com os campos de interação molecular gerados em comparação com a boa sobreposição que ocorreu com os outros compostos selecionados em outras etapas.

4.5. Compostos selecionados após os experimentos realizados na enzima AChE de *Torpedo californica*

Como resultado do screening virtual realizado na biblioteca de compostos ZINC (subcoleção CNS), e após todas as etapas terem sido feitas com a seleção daqueles compostos que eram os mais bem classificados, obtivemos 34 compostos, sendo estes os candidatos mais promissores. Todos os 34 compostos orientam-se no sítio ativo da AChE de modo similar aos mais ativos relatados, assim sugerido pela análise da posição do compostos de referência, a bis-tacrina, e condizem também com as características esperadas através do modelo farmacofórico construído.

Pode-se destacar também que os inibidores da AChE selecionados neste trabalho atuam tanto no sítio catalítico aniônico (CAS) como no sítio aniônico periférico (PAS). Estas características são estratégias farmacêuticas promissoras, pois há relatos na literatura de que além de estimular o sistema colinérgico, a atuação de um inibidor no sítio PAS também inibe a produção e agregação do peptídeo β -amiloide promovido pela AChE (MUNOZ-MURIEDAS, J. et al., 2004).

Na Figura 35 a seguir, todas as etapas realizadas neste trabalho estão apresentadas de maneira resumida, apresentando cada passo desde a escolha da base de dados de compostos virtuais que seria utilizada até a seleção final dos compostos que foram comercialmente adquiridos.

Figura 35. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos da parte 1 deste estudo.

É fundamental destacar que houve uma repetição de alguns compostos selecionados de etapas diferentes. O composto ZINC32065636 repetiu-se na 1ª e na 2ª etapa. O composto ZINC32761010 repetiu-se, também, na 1ª e na 2ª etapa. Os compostos ZINC32066030 e ZINC32760927 repetiram-se na 2ª e na 3ª etapa.

Nas próximas tabelas (Tabela 12 a 14) estão dispostos os valores do GlideScore obtido nas simulações de docking após o procedimento de rescore. Como os compostos da primeira etapa da seleção não passaram por esse procedimento, sendo estes selecionados através de sua pontuação obtida pelo “FitValue”, estes compostos não

serão apresentados nesta tabela. A comparação entre os valores de GlideScore obtidos para os 28 diferentes compostos selecionados não é exatamente confiável no que diz respeito à predição de atividade, uma vez que não existe a função de escore ideal em docking. Dessa forma, não é possível ainda afirmar que, dos compostos selecionados, os que apresentam os relativamente menores valores, no caso do GlideScore, sejam os mais potentes. Pode-se observar, somente, que dentre os compostos selecionados os menores valores de GlideScore significam um maior potencial de interação com o sítio ligante da proteína, do ponto de vista de energia das interações sugeridas pelas simulações de docking.

Tabela 12. Valores de GlideScore obtidos para os compostos selecionados da 2ª etapa.

Compostos selecionados na 2ª etapa	GlideScore
ZINC28976526	-11,066
ZINC09980941	-10,661
ZINC01462359	-10,652
ZINC30198016	-10,543
ZINC32066030	-10,297
ZINC32760177	-10,093
ZINC32760927	-10,216
ZINC25436206	-9,464
ZINC32483639	-9,093
ZINC32065636	-8,837
ZINC33221971	-8,490
ZINC32760148	-8,167
ZINC32761010	-7,800
ZINC32760959	-7,724

Tabela 13. Valores de GlideScore obtidos para os compostos selecionados da 3ª etapa.

Compostos selecionados na 3ª etapa	GlideScore
ZINC30318819	-15,659
ZINC32735781	-14,530

ZINC32760977	-14,514
ZINC32400603	-14,399
ZINC23441056	-13,047
ZINC32400169	-12,823
ZINC27677514	-12,661
ZINC32400601	-12,452
ZINC32760927	-12,439
ZINC32428809	-12,334
ZINC30363274	-12,215
ZINC32066030	-12,202
ZINC26443398	-11,984
ZINC32428810	-11,968
ZINC31489398	-11,259
ZINC30019441	-10,097

Tabela 14. Valores de GlideScore obtidos para os compostos selecionados da 4^a etapa.

Compostos selecionados na 4^a etapa	GlideScore
ZINC33089640	-13,723
ZINC32729496	-12,483

De forma geral, as análises dos modos de ligação apresentados ocorrem de maneira semelhante ao que ocorre com o inibidor original do complexo 2CKM, a bis-(7)-tacrina. Os compostos selecionados ocupam todo o comprimento da cavidade do sítio ativo.

Estes compostos selecionados a partir do screening virtual da base selecionada fazem interações do tipo empilhamento- π com resíduos aromáticos de dois aminoácidos no sítio catalítico aniônico no fundo da cavidade (Trp84 e Phe330). E o mesmo tipo de interação ocorre no sítio aniônico periférico, próximo à superfície da cavidade (Tyr70 e Trp279).

As representações bidimensionais de todos os compostos selecionados após todas as etapas realizadas nesta parte do trabalho com relativo melhor escore, que apresentaram um bom ajuste relativo ao farmacóforo construído através de moléculas bioativas e que se sobrepunham aos campos de interação molecular estão presentes na Figura 36.

Figura 36. Representações bidimensionais de todos os compostos selecionados após todas as etapas iniciais realizadas na parte 1 deste estudo.

4.6. Predição de propriedades físico-químicas para os compostos selecionados nestas etapas iniciais – QikProp

As características físico-químicas fundamentais de um fármaco que atua no sistema nervoso central estão relacionadas à sua capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica e exibir atividade no sistema nervoso central. Para os efeitos de um fármaco que atua no sistema nervoso central ocorrer, ele precisa primeiro ser entregue para o cérebro. Esse tipo de fármaco mostra valores de peso molecular, lipofilicidade, doador e receptor de ligação de hidrogênio que, em geral, têm um intervalo menor do que os outros fármacos (PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R., 2005).

Para qualquer fármaco ou candidato a fármaco atingir uma eficácia terapêutica ótima, ele deve possuir uma alta potência e seletividade para a interação com um alvo biológico, bem como ter a capacidade para atingir as concentrações dos tecidos-alvos que estão acima de um determinado valor limite. Os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) desempenham um importante papel em definir a disposição de um candidato a fármaco e, assim, sua eficácia terapêutica. Sendo a difusão através da barreira hematoencefálica um processo cinético e as concentrações

no sangue e no cérebro estão em equilíbrio, uma concentração do fármaco no sangue suficientemente elevada para produzir uma concentração do fármaco no seu receptor no cérebro é essencial (PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R., 2005).

Portanto, para a avaliação das propriedades farmacocinéticas dos inibidores de referência, bem como dos compostos selecionados, foi utilizado o programa QikProp, o qual calcula parâmetros importantes para a predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), como QPloS, QPlogP, QPlogK, Elétron Afinidade, Globularidade, Polaridade, Momento Dipolo, Potencial de Ionização e Carbono Pi. O programa possui como referência aproximadamente 95% dos fármacos utilizados na terapêutica. Assim, os desvios dos compostos analisados, em relação a cada propriedade físico-química, são dados em relação a estes compostos já em uso na terapêutica.

Na Tabela 15 abaixo, é apresentada algumas propriedades calculadas pelo programa QikProp para todos os compostos selecionados das etapas iniciais realizadas nesse trabalho.

Tabela 15. Propriedades físico-químicas calculadas pelo programa QikProp para os compostos selecionados de todas as etapas executadas na parte 1 deste estudo.

Composto selecionado	Predições do QikProp	Composto selecionado	Predições do QikProp
ZINC32213028	Peso molecular = 383,42	ZINC09980941	Peso molecular = 366,45
	PSA = 63,06		PSA = 70,40
	LogP = 2,20		LogP = 3,70
	LogBB = 0,07		LogBB = -0,54
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +/-
ZINC32065780	Peso molecular = 397,42	ZINC32760148	Peso molecular = 392,50
	PSA = 61,67		PSA = 64,55
	LogP = 2,57		LogP = 3,29
	LogBB = 0,31		LogBB = 0,24
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC30181322	Peso molecular = 384,47	ZINC32760177	Peso molecular = 365,47
	PSA = 50,92		PSA = 70,22
	LogP = 3,70		LogP = 2,62
	LogBB = 0,20		LogBB = 0,02
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC32065636	Peso molecular = 371,45	ZINC32760927	Peso molecular = 397,49
	PSA = 53,80		PSA = 76,25
	LogP = 3,00		LogP = 2,11

	LogBB = 0,55		LogBB = -0,15
	Predicted CNS activity ++		Predicted CNS activity +
ZINC32758868	Peso molecular = 371,45	ZINC33221971	Peso molecular = 390,50
	PSA = 55,66		PSA = 55,19
	LogP = 3,07		LogP = 3,67
	LogBB = 0,45		LogBB = -0,56
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +/-
ZINC32761010	Peso molecular = 353,46	ZINC25436206	Peso molecular = 346,43
	PSA = 54,57		PSA = 62,52
	LogP = 2,80		LogP = 3,24
	LogBB = 0,42		LogBB = -0,39
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC01462359	Peso molecular = 366,45	ZINC32760959	Peso molecular = 367,49
	PSA = 70,33		PSA = 54,14
	LogP = 3,68		LogP = 2,61
	LogBB = -0,37		LogBB = 0,38
	Predicted CNS activity +/-		Predicted CNS activity +
ZINC30198016	Peso molecular = 395,47	ZINC28976526	Peso molecular = 372,43
	PSA = 62,59		PSA = 61,80
	LogP = 2,54		LogP = 3,28
	LogBB = -0,06		LogBB = -0,21
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC32066030	Peso molecular = 379,50	ZINC30318819	Peso molecular = 395,51
	PSA = 73,72		PSA = 71,66
	LogP = 2,04		LogP = 2,67
	LogBB = -0,18		LogBB = -0,26
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC32483639	Peso molecular = 391,51	ZINC30363274	Peso molecular = 354,42
	PSA = 59,59		PSA = 73,87
	LogP = 2,13		LogP = 2,83
	LogBB = -0,01		LogBB = -0,43
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC30019441	Peso molecular = 378,47	ZINC31489398	Peso molecular = 397,44
	PSA = 59,85		PSA = 78,13
	LogP = 2,88		LogP = 2,29
	LogBB = -0,29		LogBB = -0,39
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC33089640	Peso molecular = 379,50	ZINC32400169	Peso molecular = 362,47
	PSA = 71,36		PSA = 61,85
	LogP = 2,95		LogP = 3,50
	LogBB = -0,43		LogBB = -0,33
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +

ZINC32400601	Peso molecular = 364,44	ZINC32400603	Peso molecular = 364,44
	PSA = 83,76		PSA = 80,74
	LogP = 2,28		LogP = 2,25
	LogBB = -0,56		LogBB = -0,50
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC32729496	Peso molecular = 356,4	ZINC27677514	Peso molecular = 389,53
	PSA = 56,09		PSA = 71,61
	LogP = 4,62		LogP = 2,38
	LogBB = -0,45		LogBB = -0,18
	Predicted CNS activity -		Predicted CNS activity +
ZINC26443398	Peso molecular = 388,41	ZINC23441056	Peso molecular = 283,42
	PSA = 65,95		PSA = 70,06
	LogP = 2,99		LogP = 1,70
	LogBB = -0,15		LogBB = 0,05
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
ZINC32760977	Peso molecular = 353,46	ZINC32735781	Peso molecular = 371,45
	PSA = 49,07		PSA = 55,02
	LogP = 2,55		LogP = 2,76
	LogBB = 0,59		LogBB = 0,55
	Predicted CNS activity ++		Predicted CNS activity ++
ZINC32428809	Peso molecular = 368,49	ZINC32428810	Peso molecular = 368,49
	PSA = 59,90		PSA = 58,18
	LogP = 3,29		LogP = 3,19
	LogBB = -0,03		LogBB = 0,01
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +

Das análises realizadas com os dois fármacos para a doença de Alzheimer, Galantamina e Donepezil e com o inibidor Bis-(7)-tacrina usado, neste trabalho, como inibidores de referência, tem-se que:

- A propriedade Peso Molecular está entre 285,34 e 492,70 Da;
- A propriedade PSA (área de superfície polar) está entre 38,51 e 47,29 Å²;
- A propriedade logP está entre 1,8 e 8,2;
- A propriedade logBB está entre -0,02 e 0,3.

De acordo com o que é relatado na literatura (JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S., 2010), as propriedades físico-químicas de interesse para que um fármaco atravesse a barreira hematoencefálica é: peso molecular que deve ser menor do que 450 Daltons, área de superfície polar que deve ser menor do que 90 Å², coeficiente de partição octanol/água (LogP) de aproximadamente 2,5 e coeficiente de partição cérebro/sangue

(LogBB) maior do que -0,5. A maioria dos compostos selecionados nestas etapas iniciais está dentro dessa faixa de valores.

Além dessas propriedades, a propriedade “Predicted CNS Activity” também foi analisada para ser levada em consideração para as análises dos compostos selecionados. O programa pontua esta propriedade em uma faixa que vai de “- -” (negativo, negativo) a “+ +” (positivo, positivo), sendo que as pontuações próximas a “- -” (negativo, negativo) não mostram uma boa atividade no sistema nervoso central e as pontuações próximas a “+ +” (positivo, positivo) apresentam uma boa atividade no sistema nervoso central. A maioria dos compostos selecionados apresentou a pontuação “+” (positivo). Os compostos ZINC32760977, ZINC32065636 e ZINC32735781, apresentaram a pontuação máxima “+ +” (positivo, positivo) e apenas o composto ZINC32729496, apresentou a pontuação “-” (negativo), este composto foi selecionado da etapa em que apenas o programa GLIDE foi utilizado em todos os passos da seleção.

4.7. Predição de toxicidade para os compostos selecionados para os compostos selecionados nestas etapas iniciais – DEREK

Por intermédio do programa DEREK realizou-se a etapa de predição de efeito tóxico para os 34 compostos selecionados. Esses compostos foram analisados quanto à presença de grupamentos toxicofóricos. Vale lembrar que este programa gera alertas de toxicidade, mostrando, nas estruturas analisadas, os grupamentos químicos que podem causar determinado efeito tóxico.

4.7.1. Amidas aromáticas

O programa DEREK identificou a presença de amidas aromáticas nas estruturas dos compostos ZINC30318819, ZINC23441056, ZINC27677514, ZINC30198016, ZINC33221971 e ZINC33089640.

É plausível a associação de amidas aromáticas ao processo de carcinogênese em humanos, pois esse grupamento pode ser convertido a hidroxilamina por redutases, oxidases ou hidrolases na maioria dos tecidos endógenos. A hidroxilamina é reconhecida por ser um agente indutor do processo de carcinogênese (RIDINGS et al., 1996).

Os alertas gerados apenas indicam a presença de uma subestrutura com histórico de causar um determinado efeito tóxico, e não necessariamente que os compostos supracitados sejam carcinogênicos. Em relação a tais compostos, esse alerta não aparenta ser motivo de grande preocupação, pois os grupamentos de amida aromática se encontram estericamente protegidas por outros anéis, o que de fato pode dificultar o acesso de enzimas.

4.7.2. Fenóis ou precursores fenólicos

Os compostos formados por fenóis e seus precursores apresentam grande potencial de causar hipersensibilidade cutânea. Normalmente, essas subestruturas são capazes de reagir com proteínas cutâneas, mas apenas a presença desses grupamentos em uma molécula não a credencia a induzir tal efeito. Outros aspectos inerentes às propriedades físico-químicas da molécula em questão, como por exemplo, capacidade de absorção percutânea, deve ser levada em consideração (BASKETTER et al., 1999).

Dos 34 compostos selecionados, os compostos ZINC01462359, ZINC32065636, ZINC09980841, ZINC32761010, ZINC32760959 e ZINC32758868 apresentaram subestruturas que se encaixam no perfil de sensibilizadores cutâneos.

4.7.3. Ácido carboxílico substituído na posição β por um oxigênio ou enxofre ou precursores e alquila arilo ou ácido carboxílico bis aril

O alerta gerado para os compostos ZINC32735781, ZINC32760977, ZINC30318819, ZINC23441056, ZINC27677514 diz respeito à presença de um átomo de oxigênio ou de enxofre substituindo o átomo de carbono do ácido carboxílico na posição β e no caso do composto ZINC33221971 a presença de um alquila arilo ou de um ácido carboxílico bis aril.

Estes alertas abrangem a proliferação de peroxissomos que produzem carcinomas hepáticos considerados ser diretamente relacionados com a proliferação de peroxissomos em camundongos e ratos, mas não no homem (ASHBY et al., 1994).

4.7.4. Precursor aldeído

O alerta de toxicidade gerado para o composto ZINC32213028 está relacionado à presença de um precursor aldeído em sua estrutura indicando o potencial de causar hipersensibilidade da pele.

Se a molécula será ou não um agente sensibilizador da pele também dependerá da sua absorção percutânea. Geralmente, pequenas moléculas lipofílicas são mais facilmente absorvidas pela pele e, portanto, são mais propensas a causar a hipersensibilização.

4.7.5. Alquila aldeído ou precursor

Além da presença de um precursor aldeído, o programa DEREK gerou outro alerta de toxicidade para o composto ZINC32213028 que diz respeito à presença de um grupo alquila aldeído ou precursor.

Compostos com um alquila aldeído ou precursor podem estar envolvidos com danos cromossômicos, genotoxicidade e mutagenicidade.

4.8. Predições do SEA

O web-servidor SEA compara alvos moleculares pela similaridade dos seus ligantes que se ligam a ele expressos como valores esperados, adaptando os algoritmos do BLAST (KEISER, M. J. et al., 2009).

Na Tabela 16, é mostrado o resultado para as predições feitas no web-servidor SEA dos compostos selecionados após as várias etapas de screening virtual realizadas neste trabalho e que o programa detectou similaridade com os inibidores da AChE, a partir do seu banco de dados.

Tabela 16. Predições do web-servidor SEA para todos os compostos selecionados na parte 1 deste estudo.

Composto selecionado	Semelhança aos ligantes da AChE	E-value	Discriminação do modelo estatístico
ZINC32065780	AChE de rato	$8,6 \times 10^{-17}$	Similaridade significativa
	AChE humana	$1,9 \times 10^{-13}$	Similaridade significativa
	AChE de <i>Torpedo</i>	$3,0 \times 10^{-10}$	Similaridade

	<i>californica</i>		significante
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	$1,1 \times 10^{-4}$	Similaridade significante
	AChE bovina	$1,8 \times 10^{-2}$	Similaridade significante
ZINC32065636	AChE de rato	$5,0 \times 10^{-25}$	Similaridade significante
	AChE humana	$5,81 \times 10^{-19}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	$2,2 \times 10^{-2}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Torpedo californica</i>	$2,4 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
	AChE bovina	$5,7 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
ZINC32758868	AChE de rato	$8,2 \times 10^{-45}$	Similaridade significante
	AChE humana	$3,0 \times 10^{-24}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	$2,5 \times 10^{-3}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Torpedo californica</i>	$7,2 \times 10^{-3}$	Similaridade significante
	AChE bovina	$1,3 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
ZINC32761010	AChE de rato	$2,3 \times 10^{-41}$	Similaridade significante
	AChE humana	$1,1 \times 10^{-30}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	$8,7 \times 10^{-4}$	Similaridade significante
	AChE bovina	$7,4 \times 10^{-3}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Torpedo californica</i>	$1,9 \times 10^{-2}$	Similaridade significante
ZINC01462359	AChE de rato	$4,3 \times 10^{-6}$	Similaridade significante
	AChE humana	$1,2 \times 10^{-3}$	Similaridade significante
ZINC32066030	AChE de rato	$5,7 \times 10^{-9}$	Similaridade significante
ZINC32483639	AChE de rato	$6,4 \times 10^{-19}$	Similaridade significante

	AChE humana	$7,3 \times 10^{-16}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Torpedo californica</i>	$8,8 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
	AChE bovina	$9,5 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	1,6	Similaridade insignificante
ZINC09980941	AChE humana	$3,1 \times 10^{-16}$	Similaridade significante
	AChE de rato	$1,1 \times 10^{-12}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Torpedo californica</i>	$4,5 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
	AChE bovina	$6,6 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	1,3	Similaridade insignificante
ZINC32760148	AChE de rato	$1,5 \times 10^{-10}$	Similaridade significante
	AChE humana	$3,6 \times 10^{-1}$	Similaridade significante
ZINC32760177	AChE de rato	$1,1 \times 10^{-2}$	Similaridade significante
ZINC32760927	AChE de rato	$1,6 \times 10^{-10}$	Similaridade significante
	AChE humana	$4,8 \times 10^{-2}$	Similaridade significante
ZINC30363274	AChE de rato	$1,5 \times 10^{-8}$	Similaridade significante
ZINC32760977	AChE de rato	$2,3 \times 10^{-1}$	Similaridade significante

Sabendo que a similaridade do conjunto de ligantes estabelecida a apenas alguns outros ligantes deve-se às diferenças químicas intrínsecas entre a maioria dos conjuntos e à discriminação do modelo estatístico entre similaridade significativa (E-value < 1×10^{-10}) e insignificante (E-value > 1.0), apenas houve similaridade insignificante para os compostos ZINC09980941 em relação a AChE de *Electrophorus electricus* e para o composto ZINC32483639 também em relação a AChE de *Electrophorus electricus*.

4.9. Início das etapas realizadas após a data de depósito do complexo AChE humana/Donepezil no PDB (código 4EY7) – Parte 2

4.9.1 Buscas por similaridade

Três estratégias computacionais foram aplicadas: buscas por similaridade baseadas na forma de ligantes ativos – realizadas com o programa ROCS, buscas por similaridade eletrostática – realizadas com o programa EON e screening virtual em base de dados CNS ZINC, baseado na estrutura da enzima AChE humana – resolvida e depositada no PDB recentemente (código PDB 4EY7), e tendenciado à similaridade do donepezil. Os resultados desses experimentos revelaram a importância de considerar ambos os parâmetros, de forma e eletrostáticos, durante a análise das buscas por similaridade de inibidores da AChE humana.

4.10. Etapas realizadas na abordagem de screening virtual baseada na similaridade

4.10.1. 1ª etapa: busca por similaridade de forma e eletrostática, seguida de experimentos de docking

A forma é uma característica molecular fundamentalmente importante, pois esta característica desempenha um papel crucial nas interações moleculares entre os ligantes e o alvo biológico, sendo a forma do ligante decisiva para o reconhecimento do inibidor. Os 377.655 compostos da base de dados CNS ZINC foram inicialmente alinhados com o donepezil, e a seguir, utilizou-se o programa ROCS para estabelecer uma comparação por forma das moléculas da base de dados com o donepezil, utilizando uma função de Gauss. Desse modo, cada um dos compostos da base de dados foi sobreposto ao donepezil e, na sequência, uma classificação/pontuação foi obtida com base na qualidade de cada sobreposição.

A Figura 37, a seguir, mostra o alinhamento do donepezil, usado como molécula de referência, com os compostos da base de dados CNS ZINC de melhor pontuação gerada pelo programa ROCS a partir da função de escore “ComboScore”. Estes compostos ora selecionados foram então usados em experimentos posteriores para análise de similaridade eletrostática, por intervenção do programa EON.

Figura 37. Alinhamento do donepezil, usado como molécula de referência, com os compostos da base de dados. O ROCS realiza uma sobreposição baseada na forma e pontuação dos alinhamentos obtidos. Eles estão alinhados através da maximização do volume de sobreposição, na qual também é levada em conta a sobreposição adequada de grupos funcionais com propriedades semelhantes (por exemplo, aceitadores de ligação de hidrogênio, anéis aromáticos, etc.) em ambos os cálculos de alinhamento e sobreposição.

Isso pode ser atribuído ao método de alinhamento: o programa EON não executa alinhamentos e depende, portanto, do resultado do alinhamento realizado com o programa ROCS. Assim, após o alinhamento ter sido realizado, foram selecionados os 2000 melhores compostos da base de dados CNS ZINC que serviram como uma pequena e nova “base de dados” para os cálculos realizados posteriormente com o programa EON. Dentre os compostos selecionados, o “ComboScore” (classifica os compostos por uma combinação de sua similaridade por forma e similaridade química; é a soma da sobreposição da forma e da cor dos compostos) variou de 1,077 a 1,409, considerando uma escala que varia de 0 a 2, onde 2 é a melhor sobreposição possível e 0 significa nenhuma similaridade; o “TanimotoCombo” (Tanimoto da forma + Tanimoto da cor) variou de 0,807 a 1,311, para uma escala de 0 a 2, onde 2 representa uma correspondência exata de ambas as formas e grupos funcionais entre duas moléculas; o “ShapeTanimoto” (classificação de similaridade baseada apenas na forma, ele é a medida padrão da similaridade por forma) variou de 0,451 a 0,813, em escala de 0 a 1, onde 1 representa uma correspondência exata.

Assim, foram selecionados os 1000 compostos mais similares ao donepezil, baseados numa classificação eletrostática. A classificação eletrostática considera uma pontuação eletrostática de Tanimoto (ET_combo), que é a soma do coeficiente eletrostático de Tanimoto Poisson-Boltzmann (ET_pb) e o “shape Tanimoto” (ST). A pontuação “ET_combo” para os 1000 compostos variou de 0,825 a 1,653, onde

resultados mais próximos de 2 representam a melhor sobreposição possível e 0 significa nenhuma similaridade; o EON_shape_Tanimoto, uma pontuação do tipo Tanimoto, variou de 0,497 a 0,811, onde valores mais próximos de 1 representam uma correspondência/identidade exata.

Após esta filtragem baseada na similaridade eletrostática desses compostos da base de dados CNS ZINC com o donepezil, foram então realizados experimentos de docking, nos quais os 1000 compostos selecionados anteriormente foram mantidos rígidos para os cálculos de ligação e afinidade pelo sítio de ligação da enzima AChE humana.

Os experimentos de docking foram realizados com o programa GOLD 5.2.2. Uma esfera de 11 Å de raio foi centralizada no ponto x: -13,949; y: -41,461; z: 29,515 da enzima AChE humana do complexo 4EY7 sob o modo de precisão do GOLD a 100% de eficiência. Os 50 melhores compostos de acordo com o função de pontuação ChemPLP e que apresentavam orientações com interações favoráveis no sítio ativo da enzima AChE foram selecionados nesta etapa de seleção.

Após uma análise minuciosa (por inspeção visual) de cada um desses 50 compostos no sítio ativo da enzima, foram selecionados 6 compostos os quais ainda foram submetidos a posteriores análises. Por fim, estes compostos selecionados foram comercialmente adquiridos para serem testados a respeito de sua atividade enzimática.

A pose (conformação + orientação) final para cada ligante foi selecionada com base nos seguintes critérios: primeiramente, a pose com o maior valor de ChemPLP; em seguida foram consideradas as poses que teoricamente faziam interações de empilhamento- π com os resíduos de aminoácidos Trp286 e Trp86; por último, aqueles compostos que possuíam um grupo carbonila sobreposto ao mesmo grupo do donepezil, o que favorecia, assim, uma interação de ligação de hidrogênio entre este grupo e o grupo NH da Phe295.

Na Tabela 17, a seguir, estão destacados os compostos que, além de interagirem por empilhamento- π com os aminoácidos já mencionados, ainda fazem importantes interações de ligação de hidrogênio com outros resíduos de aminoácidos ao longo do sítio ativo, similares às interações que acontecem com o donepezil.

Tabela 17. Compostos selecionados da 1ª etapa (similaridade de forma e eletrostática) que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.

Composto	Tipo de interação	Resíduos de interação com o composto	Distância (Å)
26231	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,1
32065	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,0
32398	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,0
32399	Ligação de hidrogênio	Phe295	2,8
32911	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,2
32912	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,4

4.11.2. 2ª etapa: experimentos de docking com uma restrição de similaridade

Nesta etapa, o docking molecular foi usado como uma abordagem baseada na estrutura da enzima AChE humana, utilizando ainda a molécula de referência, donepezil, como uma restrição de similaridade.

Esta restrição foi usada para tendenciar os compostos da base de dados, similares ao donepezil, a se ligarem à AChE de modo similar ao do fármaco de referência – donepezil. As simulações de docking molecular com a AChE (PDB ID 4EY7) foram realizadas com o programa GOLD e os parâmetros que foram utilizados estão descritos na seção Metodologia.

Os modos de ligação para os 377.655 compostos da base de dados CNS ZINC foram classificados de acordo com a função de escore/pontuação ChemPLP, primeiramente, utilizando a configuração “Virtual screening” do programa. Foram selecionados, então, os 5000 compostos melhor classificados de acordo com essa função ChemPLP. Esta configuração define a eficiência da busca em 30%, com parâmetros

relaxados, sendo adequada para cálculos de triagem inicial de grande volume de dados. Para o próximo passo realizado, os 5000 melhores compostos advindos do passo anterior foram usados para a realização do screening virtual de alto rendimento, ou seja, com a mais alta eficiência do programa.

Com a eficiência na busca estabelecida em 100%, o programa GOLD aplica as configurações ótimas para cada ligante. As buscas tornam-se mais exaustivas e, portanto, mais lentas. Baseado ainda na função ChemPLP, os 50 compostos melhor classificados foram selecionados para o próximo passo desse processo. Eles foram então submetidos ao Rescore. Neste procedimento, o programa gerou 10 poses para cada molécula docada. Sendo assim, obteve-se 500 poses após este procedimento, sendo 10 poses para cada composto selecionado.

Após uma análise minuciosa de cada uma dessas poses no sítio ativo da enzima, foram selecionadas 6 moléculas que ainda foram submetidas a outras análises/cálculos para, após isso, serem comercialmente adquiridos. A pose final para cada ligante foi selecionada com base nos mesmos critérios anteriormente mencionados, em três etapas.

Na Tabela 18, a seguir, estão destacados os compostos que, além de interagirem por meio de interações de empilhamento- π com os aminoácidos já mencionados, ainda fazem importantes interações de ligação de hidrogênio com outros resíduos de aminoácidos ao longo do sítio ativo.

Tabela 18. Compostos selecionados da 2ª etapa (restrição de similaridade) que fazem interação por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido da enzima.

Composto	Tipo de interação	Resíduos de interação com o composto	Distância (Å)
05109	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,1
	Ligação de hidrogênio	Tyr337	3,2
28649	Ligação de hidrogênio	Tyr124	3,2
	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,0
28874	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,1

	Ligação de hidrogênio	Tyr124	3,3
302187	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,1
	Ligação de hidrogênio	Tyr124	3,4
30218	Ligação de hidrogênio	Phe295	3,3
	Ligação de hidrogênio	Tyr124	3,4
	Ligação de hidrogênio	Glu202	2,6
30657	Ligação de hidrogênio	Phe295	2,7

Pelos resultados de docking, todos os compostos selecionados apresentam uma pose similar à do donepezil na cavidade do sítio ativo, interagindo com o sítio ativo catalítico e com o sítio ativo periférico da AChE. Os compostos são do tipo inibidores do sítio duplo de ligação, o que é muito vantajoso, uma vez que eles são capazes de influenciar em numerosas funções da AChE. Por exemplo, esses compostos, teoricamente, são capazes de aumentar a transmissão colinérgica bloqueando o sítio de se ligar à acetilcolina e ainda de inibir o processo de agregação do peptídeo β -amiloide através do PAS da enzima que interage com oligômeros e promovem sua agregação. Todos os compostos selecionados apresentam uma conformação estendida envolvida na formação de duas características interações de empilhamento- π com os resíduos Trp286 e Trp86.

4.11. Comparação do modo de ligação do donepezil com o dos compostos selecionados

Na estrutura cristalográfica do complexo donepezil-AChE humana, o nitrogênio carregado do anel de piperidina faz uma interação do tipo cátion- π com o anel fenila da Tyr337 (Figura 37).

Figura 38. Visão esquematizada do sítio ativo da AChE humana em complexo com donepezil. Todos os resíduos de aminoácido que fazem parte deste sítio estão representados por esferas coloridas e, em destaque, estão as interações enzima-inibidor.

Para os compostos 05109, 28649, 28874, 302187, 30218 e 30657 pode-se observar uma interação do tipo empilhamento- π com a Tyr337 e uma interação de ligação de hidrogênio entre este resíduo e a carbonila do composto 05109 (Figura 39), ausente na ligação do donepezil com a enzima. Todos esses compostos citados acima são resultantes da seleção feita da etapa realizada utilizando-se no docking a molécula de referência, donepezil, como uma restrição de similaridade.

Figura 39. Compostos selecionados da etapa de screening virtual, onde se utilizou no docking a molécula de referência, donepezil, como uma restrição de similaridade. Em destaque, as principais interações que os ligantes realizam dentro do sítio de ligação da enzima AChE humana com selecionados resíduos de aminoácido do sítio ativo. Destaca-se a interação de ligação de hidrogênio que o composto 05109 realiza com o resíduo de Tyr337 e as interações de empilhamento- π realizadas pelos demais compostos, além de interações de ligação de hidrogênio com os resíduos de Phe295, Tyr124 e Glu202.

O resíduo de aminoácido Tyr337 tem sido descrito como um “portão ocilante”, pois ele se move para fora da cavidade do sítio ativo mediante a ligação do donepezil. A interação com a Tyr337 é crítica para a inibição da enzima humana (CHEUNG, J. et al., 2012).

Os grupos aromáticos das extremidades do donepezil estão na mesma posição dentro do sítio ativo da AChE, se comparado aos respectivos grupos dos compostos selecionados das bases de dados, sugerindo interações similares: o anel benzeno faz uma interação do tipo empilhamento- π com o Trp86 no sítio ativo, enquanto que o anel da indanona faz um empilhamento- π com o Trp286 no PAS.

Ainda podemos destacar que todos os compostos que foram selecionados fazem, tal como o donepezil, uma interação de ligação de hidrogênio com a Phe295 via carbonila do composto (Figura 39 e Figura 40).

Figura 40. Compostos selecionados da etapa de screening virtual baseada na similaridade de forma e eletrostática que, assim como o donepezil, fazem uma interação de ligação de hidrogênio com a Phe295 via carbonila, além de interações do tipo empilhamento- π com os resíduos de Trp286 e Trp86.

Alguns compostos como o 28649, 28874, 302187, 30218 fazem uma interação de ligação de hidrogênio com a Tyr124 via NH do composto (Figura 39). O resíduo de Glu202, o qual é adjacente ao resíduo de Ser203 da cavidade do sítio ativo, é um dos três resíduos ácidos na parte inferior do sítio que fazem parte da tríade catalítica da enzima. A interação com esse resíduo assume-se que desempenha um importante papel na reatividade da AChE (KRYGER, G. et al., 2000). Este resíduo está principalmente envolvido na etapa de acilação, ao invés de participar da etapa de tráfego e alojamento do ligante. Os compostos selecionados 28874, 28649, 302187 e 30218, todos resultantes da seleção feita da etapa realizada utilizando a molécula de referência, donepezil, como uma restrição de similaridade, fazem uma interação de ligação de hidrogênio com o Glu202 (Figura 39).

Ao final, foram identificados 12 inibidores promissores, com potencial de se ligarem em ambos os sítios da AChE, e com todas as propriedades de fármacos

advindas da base de dados CNS ZINC. O docking molecular e as análises ADME/Tox atuaram como um filtro adicional pós-screening virtual.

Já é conhecido que o PAS da enzima AChE está envolvido no aumento da taxa de agregação do peptídeo A β ; portanto, uma forte ligação com o PAS (representado principalmente pelo resíduo de Trp286) irá interromper a agregação e proporcionar o efeito de modificação da doença juntamente com um benefício sintomático (GUPTA, S.; MOHAN, C. G., 2014). Assim, pode-se destacar que os ligantes da AChE selecionados neste trabalho atuariam tanto no sítio catalítico aniônico (CAS) como no sítio aniônico periférico (PAS), sendo promissores candidatos a inibidores tanto da enzima AChE quanto da produção e agregação do peptídeo β -amiloide promovido pela AChE.

Na Figura 41 a seguir, todas as etapas realizadas neste trabalho estão apresentadas de maneira resumida, apresentando cada passo, desde a escolha da base de dados de compostos utilizada até a seleção final dos compostos que foram comercialmente adquiridos.

Figura 41. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos da parte 2 deste estudo.

4.12. Predição de toxicidade para os compostos selecionados nesta etapa do estudo – DEREK

Um total de 12 compostos desta etapa do estudo foi submetido ao programa DEREK. Nenhum composto foi excluído nesta fase de análises.

O DEREK não forneceu uma avaliação quantitativa da probabilidade de toxicidade de um composto em particular que fosse importante para ser relatado, mas ele forneceu uma série de alertas estruturais.

Não foi relatado nenhum alerta estrutural para os seguintes compostos selecionados: 28874, 30218, 30657, 32065, 32398, 32399, 32911 e 32912. As predições

feitas pelo DEREK para os compostos em que foi relatado algum alerta estrutural serão dadas nas seções seguintes.

4.12.1. Hidrazina ou precursor hidrazínio

O programa DEREK alertou para o composto 05109 a presença de hidrazina ou precursor hidrazínio em sua estrutura indicando o potencial de causar hipersensibilidade da pele.

Se a molécula será ou não um agente sensibilizador da pele também dependerá da sua absorção percutânea. Geralmente, pequenas moléculas lipofílicas são mais facilmente absorvidas pela pele e, portanto, são mais propensas a causar a hipersensibilização (NAISBITT, D. J. et al., 2001).

4.12.2. Aril sulfonamida

Diversas aril sulfonamidas têm mostrado causar fototoxicidade e fotossensibilização em vários sistemas de animais e em testes in vitro. Certo número de fármacos que contêm sulfonamidas também tem sido relatado causar fotossensibilização em humanos (BARRATT, M. D. et al., 2004).

Os alertas gerados apenas indicam a presença de uma subestrutura com histórico de causar um determinado efeito tóxico, e não necessariamente que os compostos possam causar tal efeito tóxico.

Este alerta que descreve as propriedades fototóxicas das aril sulfonamidas foi gerado para o composto 26231.

A força da resposta da fototoxicidade pode ser dependente do modo de administração, com a aplicação tópica se destacando a causar respostas mais fracas do que a injeção intradérmica.

4.12.3. Fenol ou precursor fenólico

Os compostos formados por fenóis e seus precursores apresentam grande potencial de causar hipersensibilidade cutânea. A presença de um alerta estrutural de sensibilização da pele indica que a molécula tem o potencial para causar a

hipersensibilidade. Se a molécula será ou não um sensibilizante da pele também dependerá de sua absorção percutânea. Geralmente, pequenas moléculas lipofílicas são mais facilmente absorvidas pela pele e, portanto, são mais propensas a causar sensibilização (BASKETTER, D. A. et al., 1999).

Dos compostos selecionados nas etapas realizadas, apenas foi observado o alerta para o composto 28649.

Normalmente, essas subestruturas são capazes de reagir com proteínas cutâneas, mas apenas a presença desses grupamentos em uma molécula não a credencia a induzir tal efeito.

4.12.4. Ácido carboxílico substituído na posição β por um oxigênio ou enxofre ou precursores

O alerta gerado para o composto 302187 diz respeito à presença de um átomo de oxigênio ou de enxofre substituindo o átomo de carbono do ácido carboxílico na posição β (ASHBY, J. et al., 1994).

Estes alertas abrangem a proliferação de peroxissomos que produzem carcinomas hepáticos considerados ser diretamente relacionados com a proliferação de peroxissomos em camundongos e ratos, mas não no homem.

4.13. QikProp – Predições de propriedades ADME

Para estimar o potencial desses novos compostos atuarem como eventuais fármacos, alguns indicadores de seus perfis farmacocinéticos foram preditos utilizando o programa QikProp.

O QikProp avalia eficientemente as propriedades farmacologicamente relevantes dos compostos selecionados. Propriedades tais como logP, capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica (logBB), capacidade de ser absorvido através do trato intestinal para o sangue (Caco-2 cell permeability model), entre outras, pode dar uma ideia da semelhança desses compostos a fármacos já conhecidos, com o objetivo de virem a ser usados por via oral como agentes anti-DA.

Para cada molécula processada com sucesso, o QikProp produziu os descritores e propriedades que foram selecionados para cada composto, os quais são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Propriedades físico-químicas calculadas pelo programa QikProp para os compostos selecionados de todas as etapas executadas na Parte 2 deste estudo.

Composto selecionado	Predições do QikProp	Composto selecionado	Predições do QikProp
32399	Peso molecular = 360,45	30218	Peso molecular = 358,44
	PSA = 58,94		PSA = 55,52
	LogP = 3,85		LogP = 4,43
	LogBB = -0,16		LogBB = -0,65
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +/-
28874	Peso molecular = 370,45	05109	Peso molecular = 394,49
	PSA = 55,99		PSA = 74,28
	LogP = 4,75		LogP = 4,22
	LogBB = -0,63		LogBB = -0,56
	Predicted CNS activity +/-		Predicted CNS activity +/-
32911	Peso molecular = 354,44	32065	Peso molecular = 395,47
	PSA = 57,21		PSA = 53,63
	LogP = 3,9		LogP = 3,44
	LogBB = 0,18		LogBB = 0,61
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity ++
26231	Peso molecular = 382,42	32912	Peso molecular = 319,40
	PSA = 60,59		PSA = 66,40
	LogP = 2,35		LogP = 3,01
	LogBB = -0,08		LogBB = -0,50
	Predicted CNS activity +		Predicted CNS activity +
302187	Peso molecular = 333,38	28649	Peso molecular = 335,40
	PSA = 60,01		PSA = 61,5
	LogP = 3,39		LogP = 3,55
	LogBB = -0,48		LogBB = -0,63
	Predicted CNS activity +/-		Predicted CNS activity +/-
30657	Peso molecular = 363,39	32398	Peso molecular = 352,43
	PSA = 60,72		PSA = 60,8
	LogP = 4,66		LogP = 3,44
	LogBB = -0,53		LogBB = 0,09
	Predicted CNS activity +/-		Predicted CNS activity +

Das análises realizadas com o fármaco para a doença de Alzheimer, Donepezil, usado nesta etapa do trabalho como inibidor de referência, tem-se que:

- Peso molecular = 379,49
- PSA = 47,61
- logP = 4,29
- logBB = 0,07

Mais uma vez foi levada em consideração a propriedade “Predicted CNS Activity” para análise tanto dos compostos selecionados quanto do donepezil. O programa pontua esta propriedade em uma faixa que vai de “- -” (negativo, negativo, correspondente a 0% de atividade no SNC) a “+ +” (positivo, positivo, correspondente a 100% de atividade no SNC). Por essa escala, o donepezil possui uma boa atividade no sistema nervoso central e foi classificado com “+” (ou 75% de atividade no SNC).

Além desta propriedade, outras propriedades também foram adicionadas na análise, as quais serviram para comparar o donepezil e com os compostos selecionados. Uma dessas propriedades foi a “Apparent Caco-2 permeability”. Essa propriedade diz respeito à permeabilidade à barreira intestinal usando as células de Caco-2 como modelo. Valores medidos em nm/seg abaixo de 25 indicam fraca permeabilidade, enquanto que valores acima de 500 nm/seg indicam uma ótima permeabilidade. Por essa escala, o donepezil tem uma ótima permeabilidade à barreira, com 810 nm/seg.

Outra propriedade relacionada à absorção, a “% Human Oral Absorption in GI”, prediz a porcentagem de absorção oral humana gastrointestinal em uma escala de 0 a 100%, sendo que os valores abaixo de 25% tem baixa qualidade para o modelo de absorção oral, enquanto valores acima de 80% possuem uma ótima absorção oral. O donepezil tem 100% de absorção oral humana gastrointestinal, isto é, possui uma ótima permeabilidade, segundo esse modelo de predição.

Como observado na Tabela 18 e de acordo com o que é relatado na literatura (JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S., 2010) sobre as propriedades físico-químicas de interesse para que um fármaco atravesse a barreira hematoencefálica (BHE), todos os compostos selecionados apresentam o peso molecular menor do que 450 Daltons; todos possuem os valores de PSA menor do que 90 Å; os compostos 32399, 26231 e 302187

apresentaram o logBB menor do que -0,5; todos apresentaram o valor de logP acima do valor médio, que é de aproximadamente 2,5 (esses compostos são lipofílicos).

Outras características dos compostos selecionados, em comparação com as calculadas com QikProp para o donepezil, e que são importantes para se destacar, referem-se, primeiramente, à permeabilidade à barreira intestinal usando as células de Caco-2 como modelo. Para essa característica, se evidencia que os compostos 30218, 28874, 05109, 32911, 302187 e 28649 apresentaram valores ainda maiores (e portanto melhores) do que o valor de referência do donepezil, que é de 810 nm/sec. Os compostos citados apresentaram o valor de permeabilidade aparente em Caco-2 de 1106 nm/sec, 1055 nm/sec, 860 nm/sec, 1026 nm/sec, 1193 nm/sec e 1109 nm/sec, respectivamente.

Além disso, outras comparações podem ser feitas a respeito da qualidade do modelo para a absorção oral humana e da porcentagem de absorção oral humana gastrointestinal. Assim como o donepezil, todos os compostos selecionados nesta etapa possuem uma alta qualidade do modelo para a absorção oral humana, segundo o qual os compostos 32398, 32911, 32398, 302187, 28649, 30657, 32399, 30218, 28874 e 05109 apresentaram 100% de absorção oral humana gastrointestinal.

4.14. Predições do SEA (Similarity Ensemble Approach)

A abordagem do SEA considera as proteínas a partir de um ponto quimiocêntrico, relacionando-as através da semelhança química de seus ligantes. A ideia principal é que as moléculas similares têm perfis biológicos similares e, portanto, alvos de ligação similares. Esta técnica une centenas de conjuntos de ligantes e, correspondentemente, suas proteínas-alvo em árvores de dispersão onde as proteínas biologicamente relacionadas se agrupam como uma propriedade emergente. As similaridades entre os conjuntos de ligantes podem revelar as relações farmacológicas dos alvos cujas ações eles modulam (KEISER, M. J.; HERT, J., 2009).

A pontuação da similaridade é expressa entre os ligantes como um “E-value”, sendo que pequenos E-values refletem fortes relações entre os ligantes. Um E-value de 1 ou maior do que 1 não é estatisticamente significativo. A similaridade entre os dois ligantes torna-se significativa quando é, pelo menos, maior do que uma ordem de magnitude, isto é, 10^{-1} .

Os ligantes que são altamente similares possuem E-values menores do que 10^{-50} , embora não exista um único ponto de corte para a significância do E-value. Na Tabela 20, a seguir, é mostrado o resultado para as predições feitas no SEA dos compostos selecionados nesta etapa do trabalho e que o programa detectou similaridade com os inibidores da AChE, a partir do seu banco de dados.

Tabela 20. Predições realizadas com o web-servidor SEA para os compostos selecionados na Parte 2 deste estudo.

Composto selecionado	Semelhança aos inibidores da AChE	E-value	Discriminação do modelo estatístico	Max Tc
32399	AChE de rato	$2,57 \times 10^{-10}$	Similaridade significativa	0,35
32065	AChE de rato	$2,24 \times 10^{-46}$	Similaridade significativa	0,44
	AChE humana	$9,77 \times 10^{-17}$	Similaridade significativa	0,38
32911	AChE de rato	$3,43 \times 10^{-108}$	Similaridade significativa	0,58
	AChE humana	$2,11 \times 10^{-41}$	Similaridade significativa	0,51
	AChE bovina	$5,01 \times 10^{-4}$	Similaridade significativa	0,43
	AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	$2,56 \times 10^{-3}$	Similaridade significativa	0,43
	AChE de <i>Torpedo californica</i>	$2,85 \times 10^{-1}$	Similaridade significativa	0,42
26231	AChE de rato	$5,65 \times 10^{-21}$	Similaridade significativa	0,32
32398	AChE de rato	$4,63 \times 10^{-8}$	Similaridade significativa	0,40
32912	AChE de rato	$2,58 \times 10^{-69}$	Similaridade	0,43

	AChE humana	$1,57 \times 10^{-23}$	significante	
	AChE bovina	$1,20 \times 10^{-1}$	Similaridade significante	0,42
			Similaridade significante	0,40

4.15. PASS – predição do espectro de atividade biológica

O conceito do espectro de atividade biológica foi introduzido para descrever as propriedades dos compostos em serem biologicamente ativos. O PASS prediz 900 efeitos farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade específica e pode ser usado para a predição de diferentes tipos de atividades farmacológicas. Ele foi eficientemente usado para encontrar os mecanismos dos compostos selecionados nesta etapa do estudo.

A predição de cada composto foi realizada e o resultado das predições mostrado na forma de uma tabela contendo a lista dos nomes das atividades biológicas com os apropriados valores de probabilidade, isto é, os valores que definem a probabilidade da presença (Pa) e ausência (Pi) para cada atividade particular. Os valores variam de 0.000 a 1.000. Os tipos de atividade são considerados possíveis quando $P_a > P_i$. Apenas as atividades com valores de $P_a > P_i$ foram consideradas nos espectros de atividade preditas.

Os compostos selecionados 32399, 32911 apresentaram atividade farmacológica predita para “Neurodegenerative diseases treatment” (tratamento de doenças neurodegenerativas). Para os compostos 32398, 32912, além de atividade farmacológica predita para “Neurodegenerative diseases treatment” também foi relatada “Dementia treatment” (tratamento da demência). Finalmente, o composto 05109 apresentou tanto atividade farmacológica predita para “Neurodegenerative diseases treatment” como para “Alzheimer’s disease treatment” (tratamento da doença de Alzheimer).

Essas atividades farmacológicas preditas/estimadas para esses compostos indicam que, como inibidores, eles se mostram promissores. Essas predições serão confirmadas nos experimentos de atividade biológica.

4.16. Ensaios de atividade enzimática com os compostos selecionados e adquiridos comercialmente

Experimentos de inibição da enzima AChE da espécie *Electrophorus electricus* (AChE-ee) foram realizados com os compostos selecionados, e posteriormente adquiridos comercialmente, da Parte 2 deste estudo, além de dois compostos selecionados em etapas anteriores a estas, para os quais o ensaio foi refeito, agora de acordo com o protocolo experimental da nova colaboração, a qual não utiliza enzima mobilizada. A concentração inicial dos compostos foi de 2000 μ M, e os resultados são apresentados na Tabela 21, a seguir.

Tabela 21. Resultados dos ensaios de inibição da enzima AChE-ee, realizados com as amostras em microplaca, a uma concentração inicial de 2000 μ M.

Composto	Peso Molecular	% de inibição da AChE
32911	354,4	69%
32398	352,4	70%
30657	363,4	71%
32065	450	77,14%
ZINC01462359	366,45	72%
ZINC30019441	378,46	68%
26231	364,434	72%

302187	333,383	74%
--------	---------	-----

Os resultados dos ensaios de inibição da AChE (% de inibição e IC₅₀), em diferentes concentrações dos compostos, foram compilados na Tabela 22, a seguir.

Tabela 22. Resultados dos ensaios de inibição com a enzima AChE-ee, realizados com as amostras em microplaca, em diferentes concentrações.

Composto	Peso Molecular	IC₅₀(μM)
32911	354,4	2,318 $\pm$ 0,2205
32398	352,4	2,391 $\pm$ 0,2326
30657	363,4	2,633 $\pm$ 0,2252
32065	450	3,188 $\pm$ 0,2537
ZINC01462359	366,45	2,349 $\pm$ 0,2537
ZINC30019441	378,46	1,881 $\pm$ 0,2218
26231	364,434	2,151 $\pm$ 0,2652
302187	333,383	2,510 $\pm$ 0,2806

Pode ser observado, pelos valores de IC₅₀ dos compostos testados, que todos eles mostraram uma considerável inibição da AChE, com valores variando na faixa de baixo

micromolar. Entre estes compostos, o ZINC30019441 ($IC_{50} = 1,88 \mu M$) exibiu a maior afinidade de ligação com a AChE. Tal como indicado pelos resultados de docking, este composto deve fazer interações do tipo empilhamento- π com resíduos aromáticos de dois aminoácidos no sítio catalítico aniônico no fundo da cavidade, e esse mesmo tipo de interação ocorre no sítio aniônico periférico, próximo à superfície da cavidade.

Além do composto ZINC30019441 interagir com os principais resíduos de aminoácidos do PAS e do CAS, ele também deve adicionalmente interagir *via* ligação de hidrogênio entre seu oxigênio da carbonila e o átomo de oxigênio da Tyr334, como pode ser observado na Figura 42, a seguir.

Figura 42. Em destaque, representado pela linha preta tracejada, está a interação *via* ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da Tyr334 da de Torpedo californica (vide os resultados de *docking* nas seções anteriores) e o oxigênio da carbonila do composto ZINC30019441. Essa ligação de hidrogênio ocorre no sítio PAS da enzima, sendo uma das mais fortes que a AChE faz com donepezil e compostos a ele similares.

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de fármacos inibidores da AChE (iAChE) segue a descoberta de que as vias colinérgicas no cérebro são comprometidas na doença de Alzheimer. Assim, o tratamento com iAChE é uma forma de impedir a progressão da

doença. Atualmente, a modelagem molecular, incluindo variados experimentos de *screening* ou triagem virtual, está se tornando uma importante ferramenta aplicada ao planejamento e desenvolvimento de fármacos para diversas doenças.

Os compostos selecionados nesta fase deste trabalho apresentaram ótimos resultados preliminares no que diz respeito à inibição da AChE e, possivelmente, ao ajuste em ambos os sítios da enzima. Além disso, eles ainda possuem desejáveis propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, com grande potencial de atravessar a barreira hematoencefálica e atuarem no Sistema Nervoso Central. Pelos resultados de *docking*, os quais começam a serem validados e corroborados com os ensaios de atividade enzimática, todos os compostos selecionados devem ligar-se ao fundo da cavidade do sítio ativo, estendendo-se até o PAS. Eles ocupariam a cavidade de ligação de colina e interagiriam com os resíduos destes sítios.

Pode-se concluir que o uso combinado de triagens virtuais por forma e eletrostática com métodos de *docking* pode ser bastante eficaz como metodologia/protocolo de seleção de compostos protótipos oriundos de uma grande coleção de compostos. Esta metodologia aqui combinada permitiu, ainda, a análise dos principais requisitos estruturais para a inibição da AChE, além de um aumento na afinidade de ligação e potência funcional. Todos os ligantes selecionados devem formar suas principais interações com o sítio ativo da enzima em três principais subestruturas ou grupamentos, assim como acontece com o donepezil.

Os compostos testados exibiram boas atividades nos ensaios de inibição da AChE e seus valores de IC_{50} estão situados na faixa de baixo micromolar, entre 1,88 a 3,18 μM . Estes resultados, além das modificações químicas ora propostas *in silico* para estes inibidores protótipos, apontam para o desenvolvimento de uma nova e promissora série de potentes anticolinesterásicos, contendo propriedades de fármacos, as quais são ainda apropriadas para atuarem no Sistema Nervoso Central e interagirem com o peptídeo beta-amiloide, com vistas ao tratamento quimioterápico da doença de Alzheimer.

6. PERSPECTIVAS DESTE TRABALHO

Como perspectiva imediata deste trabalho, o objetivo é estender o planejamento computacional iniciado com a estrutura da AChE humana, bem como iniciar os ensaios de agregação do peptídeo beta-amiloide com os oito compostos já testados com a AChE. Adicionalmente, o planejamento de novos agentes anti-Alzheimer incluirá,

então, uma etapa de busca por novos inibidores de agregação do peptídeo β -amiloide, por similaridade com as estruturas e provável conformação em comum (pelo “Princípio do Análogo Ativo”) dos mais potentes inibidores de agregação do peptídeo já descritos na literatura. Além de buscar em bases de dados por compostos com essa habilidade de inibir a agregação do peptídeo, os resultados em paralelo do planejamento de novos inibidores da AChE, nas diversas vias/etapas de simulação, também deverão ser filtrados para essa habilidade específica no momento de decisão da compra dos compostos que serão testados nesses dois tipos de ensaios.

Também para essa classe de compostos, em especial, é objetivo construir modelos de QSAR-3D utilizando descritores tridimensionais de última geração, de modo a se explicar quimicamente a relação estrutura-atividade dos inibidores de agregação. Por fim, os compostos planejados deverão ser comprados, testados e posteriormente otimizados *in silico* com respeito às suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas para fins posteriores de modificação sintética, patenteamento, principalmente.

Os ensaios de inibição da acetilcolinesterase, assim como os ensaios de inibição da agregação do peptídeo β -amiloide, estão sendo e serão conduzidos em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Wanda Pereira Almeida, do departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química da UNICAMP, em Campinas. Estudos de permeação da barreira hematoencefálica e ensaios pré-clínicos deverão ser conduzidos em colaboração com a Prof.a. Dr.a. Ana Martinez Gil, pesquisadora do Consejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC, de Madrid, Espanha, a qual está vinculada a um projeto recém-aprovado no grupo, intitulado “Novel Potential Anti-Alzheimer Agents: from Design to Preclinical Studies” (Chamada CSIC-FAPESP 2013, Proc. FAPESP 2013/50788-3).

O presente trabalho está em progresso e os resultados serão publicados, mas apenas aguardam a conclusão de todos os experimentos. A projeção é o desenvolvimento de uma nova e promissora série de inibidores da AChE, com potencial de futuro tratamento quimioterápico da doença de Alzheimer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accelrys Discovery Studio 4.0, T.C., San Diego, CA 92121 USA.

AGO, Y.; KODA, K.; TAKUMA, K.; MATSUDA, T. Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine. **J Pharmacol Sci**, v. 116, n. 1, p. 6-17, 2011. Alzheimer's Disease International, 2009.

AMBURE, P.; KAR, S.; ROY, K. Pharmacophore mapping-based virtual screening followed by molecular docking studies in search of potential acetylcholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer's agents. **Biosystems**, v. 116, p. 10-20, 2014.

BACHOVCHIN, D. A.; CRAVATT, B. F. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 1, p. 52-68, 2012.

BALDI, P.; NASR, R. When is Chemical Similarity Significant? The Statistical Distribution of Chemical Similarity Scores and Its Extreme Values. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 7, p. 1205-1222, 2010.

BARTOLUCCI, C.; HALLER, L. A.; JORDIS, U.; FELS, G.; LAMBA, D. Probing Torpedo californica acetylcholinesterase catalytic gorge with two novel bis-functional galanthamine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 745-51, 2010.

Bazzini, P.; Wermuth, C. G. In The Practice of Medicinal Chemistry; Academic Press: San Diego, 2008.

BERG, L., ANDERSSON, C. D., ARTURSSON, E., HORNBERG, A., TUNEMALM, A. K., LINUSSON, A., EKSTROM, F. Targeting Acetylcholinesterase: Identification of Chemical Leads by High Throughput Screening, Structure Determination and Molecular Modeling. **Plos One**, v. 6, n. 11, 2011.

BOSTROM, J., GRANT, J. A., FJELLSTROM, O., THELIN, A., GUSTAFSSON, D. Potent Fibrinolysis Inhibitor Discovered by Shape and Electrostatic Complementarity to the Drug Tranexamic Acid. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 3273-3280, 2013.

BOURNE, Y., RADIC, Z., SULZENBACHER, G., KIM, E., TAYLOR, P., MARCHOT, P. Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 29256-29267, 2006.

BOURNE, Y., TAYLOR, P., RADIC, Z., MARCHOT, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. **Embo Journal**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2003.

BUREAU, R., DAVEU, C., LEMAITRE, S. P., DAUPHIN, F., LANDELLE, H., LANCELOT, J. C., RAULT, S. Molecular design based on 3D-pharmacophore. Application to 5-HT₄ receptor. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 4, p. 962-967, 2002.

CHEN, Y., FANG, L., PENG, S., LIAO, H., LEHMANN, J., ZHANG, Y. Discovery of a novel acetylcholinesterase inhibitor by structure-based virtual screening techniques. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n. 9, p. 3181-7, 2012.

CHENG, T.; LI, X.; LI, Y.; LIU, Z.; Wang, R. Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 4, p. 1079-93, 2009.

CHEUNG, J., RUDOLPH, M. J., BURSHTEYN, F., CASSIDY, M. S., GARY, E. N., LOVE, J., FRANKLIN, M. C., HEIGHT, J. J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282-10286, 2012.

CROSS, J. B.; THOMPSON, D. C.; RAI, B. K.; BABER, J. C.; FAN, K. Y.; HU, Y. B.; HUMBLET, C. Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 6, p. 1455-1474, 2009.

DANUELLO, A., ROMEIRO, N. C., GIESEL, G. M., PIVATTO, M., VIEGAS, C., VERLI, H., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., CASTRO, N. G., BOLZANI, V. S. Molecular Docking and Molecular Dynamic Studies of Semi-Synthetic Piperidine Alkaloids as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 163-U505, 2012.

DE FERRARI, G. V., CANALES, M. A., SHIN, I., WEINER, L. M., SILMAN, I., INESTROSA, N. C. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. **Biochemistry**, v. 40, n. 35, p. 10447-10457, 2001.

DOUCET-PERSONENEI, C., BENTLEY, P. D., FLETCHER, R. J., KINKAID, A., KRYGER, G., PIRARD, B., TAYLOR, A., TAYLOR, R., TAYLOR, J., VINER, R., SILMAN, I., SUSSMAN, J. L., GREENBLATT, H. M., LEWIS, T. A structure-based design approach to the development of novel, reversible AChE inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 20, p. 3203-3215, 2001.

DROR, O., SCHNEIDAN-DUHOVNY, D., INBAR, Y., NUSSINOV, R., WOLFSON, H. J. Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2333-2343, 2009.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 10-22, 2010.

EHRLICH, P. On the present state of chemotherapy. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 42, p. 17-47, 1909.

FELDER, C. E.; HAREL, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structure of a complex of the potent and specific inhibitor BW284C51 with Torpedo californica acetylcholinesterase. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 10 Pt 2, p. 1765-71, 2002.

FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739-49, 2004.

GARCIA-SOSA, A. T.; HETENYI, C.; MARAN, U. Drug Efficiency Indices for Improvement of Molecular Docking Scoring Functions. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 174-184, 2010.

GASTEIGER, J.; ENGEL, T.; *Chemoinformatics, a textbook*. 1a. ed., Wiley-VCH: Weinheim 2003.

GILSON, M. K.; HONIG, B. H. Calculation of Electrostatic Potentials in an Enzyme Active-Site. **Nature**, v. 330, n. 6143, p. 84-86, 1987.

GOODFORD, P. J. A Computational-Procedure for Determining Energetically Favorable Binding-Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849-857, 1985.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997.

GUPTA, S.; FALLARERO, A.; VAINIO, M. J.; SARAVANAN, P.; PURANEN, J. S.; JARVINEN, P.; JOHNSON, M. S.; VUORELA, P. M.; MOHAN, C. G. Molecular Docking Guided Comparative GFA, G/PLS, SVM and ANN Models of Structurally Diverse Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 8, p. 689-706, 2011.

GUPTA, S.; MOHAN, C. G. Dual binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors derived from integrated pharmacophore models and sequential virtual screening. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 291214, 2014.

HALGREN, T. A.; MURPHY, R. B.; FRIESNER, R. A.; BEARD, H. S.; FRYE, L. L.; POLLARD, W. T.; BANKS, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1750-9, 2004.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 19, p. 9031-5, 1993.

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74-82, 2007.

HENDRICKSON, J. B. Concepts and Applications of Molecular Similarity - Johnson, Ma, Maggiora, Gm. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1189-1189, 1991.

HOLLIDAY, J. D., KANOULAS, E., MALIM, N., WILLET, P. Multiple search methods for similarity-based virtual screening: analysis of search overlap and precision. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, 2011.

HOU, L. N., XU, J. R., ZHAO, Q. N., GAO, X. L., CUI, Y. Y., XU, J., WANG, H., CHEN, H. Z. A new motif in the N-terminal of acetylcholinesterase triggers amyloid-beta aggregation and deposition. **CNS Neurosci Ther**, v. 20, n. 1, p. 59-66, 2014.

IGNASIK, M., BAJDA, M., GUZIOR, N., PRINZ, M., HOLZGRABE, U., MALAWSKA, B. Design, synthesis and evaluation of novel 2-(aminoalkyl)-isoindoline-1,3-dione derivatives as dual-binding site acetylcholinesterase inhibitors. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 345, n. 7, p. 509-16, 2012.

JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S. Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 33-37, 2010.

KEISER, M. J., SETOLA, V., IRWIN, J. J., LAGGNER, C., ABBAS, A. I., HUFSEIN, S. J., JENSEN, N. H., KUIJER, M. B., MATOS, R. C., TRAN, T. B., WHALEY, R., GLENNON, R. A., HERT, J., THOMAS, K. L. H., EDWARDS, D. D., SHOICHET, B. K., ROTH, B. L. Predicting new molecular targets for known drugs. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 175-U48, 2009.

KEISER, M. J.; HERT, J. Off-target networks derived from ligand set similarity. **Methods Mol Biol**, v. 575, p. 195-205, 2009.

KRYGER, G., HAREL, M., GILES, K., TOKER, L., VELAN, B., LAZAR, A., KRONMAN, C., BARAK, D., ARIEL, N., SHAFFERMAN, A., SILMAN, I., SUSSMAN, J. L. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 56, p. 1385-1394, 2000.

KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept (R)): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure with Folding & Design**, v. 7, n. 3, p. 297-307, 1999.

KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. **Journal of Physiology-Paris**, v. 92, n. 3-4, p. 191-194, 1998.

KUBINYI, H. Chemical similarity and biological activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 717-726, 2002.

LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., McGETTIGAN, P. A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 737-748, 2012.

LIU, T. Q., LIN, Y. M., WEN, X., JORISSEN, R. N., GILSON, M. K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D198-D201, 2007.

MALLENDER, W. D.; SZEGLITES, T.; ROSENBERRY, T. L. Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. **Biochemistry**, v. 39, n. 26, p. 7753-7763, 2000.

MARQUES, L. A., GIERA, M., LINGEMAN, H., NIESSEN, W. M. A. Analysis of acetylcholinesterase inhibitors: bioanalysis, degradation and metabolism. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1-2, p. 278-299, 2011.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2012, p. 728983, 2012.

MISHRA, N.; BASU, A. Exploring Different Virtual Screening Strategies for Acetylcholinesterase Inhibitors. **Biomed Research International**, 2013.

MUNOZ-MURIEDAS, J., LOPEZ, J. M., OROZCO, M., LUQUE, F. J. Molecular modelling approaches to the design of acetylcholinesterase inhibitors: New challenges for the treatment of Alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 25, p. 3133-3140, 2004.

NAEEM, A.; FAZILI, N. A. Defective Protein Folding and Aggregation as the Basis of Neurodegenerative Diseases: The Darker Aspect of Proteins. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 2, p. 237-250, 2011.

PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. **NeuroRx**, v. 2, n. 4, p. 541-53, 2005.

PEROLA, E.; WALTERS, W. P.; CHARIFSON, P. S. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 56, n. 2, p. 235-49, 2004.

POHANKA, M.; HRABINOVA, M.; FUSEK, J.; HYNEK, D.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; KIZEK, R. Electrochemical Biosensor Based on Acetylcholinesterase and Indoxylacetate for Assay of Neurotoxic Compounds Represented by Paraoxon. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 7, p. 50-57, 2012.

PRINCE, M.; BRYCE, R.; FERRI, C. World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention. London, UK: Alzheimer's Disease International, 2011.

PRINCE, M.; JACKSON, J. World Alzheimer's Report 2009. London, UK: Alzheimer's Disease International, 2009.

PRINCE, M., GUERCHET, M., & PRINA, M. Policy brief for heads of government: The global impact of dementia 2013–2050. London, UK: Alzheimer's Disease International, 2013.

REMYA, C., DILEEP, K. V., TINTU, I., VARIYAR, E. J., SADASIVAN, C. In vitro inhibitory profile of NDGA against AChE and its in silico structural modifications based on ADME profile. **J Mol Model**, v. 19, n. 3, p. 1179-94, 2013.

RIDINGS, J. E., BARRATT, M. D., CARY, R., EARNSHAW, C. G., EGGINGTON, C. E., ELLIS, M. K., JUDSON, P. N., LANGOWSKI, J. J., MARCHANT, C. A., PAYNE, M. P., WATSON, W. P., YIH, T. D. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: An update on the DEREK system. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 267-279, 1996.

ROY, K. K.; DIXIT, A.; SAXENA, A. K. An investigation of structurally diverse carbamates for acetylcholinesterase (AChE) inhibition using 3D-QSAR analysis. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 27, n. 2, p. 197-208, 2008.

RUSH, T. S., GRANT, J. A., MOSYAK, L., NICHOLLS, A. A shape-based 3-D scaffold hopping method and its application to a bacterial protein-protein interaction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1489-1495, 2005.

SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G. Computer-Prediction of Possible Toxic Action from Chemical-Structure - the Derek System. **Human & Experimental Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 261-273, 1991.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SVENSSON, F.; KARLEN, A.; SKOLD, C. Virtual Screening Data Fusion Using Both Structure- and Ligand-Based Methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 1, p. 225-232, 2012.

TESTA, B.; BALMAT, A. L.; LONG, A.; JUDSON, P. Predicting drug metabolism - An evaluation of the expert system METEOR. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 7, p. 872-885, 2005.

THATHIAH, A.; DE STROOPER, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73-87, 2011.

TIKHONOVA, O. V.; SKVORTSOV, V. S.; RAEVSKII, O. A. Molecular modeling of acetylcholinesterase interaction with irreversible and reversible organophosphorous inhibitors. **Biomed Khim**, v. 57, n. 1, p. 61-76, 2011.

WIESNER, J.; KRIZ, Z.; KUCA, K.; JUN, D.; KOCA, J. Acetylcholinesterases - the structural similarities and differences. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 417-424, 2007.

WIGGERS, H. J., ROCHA, J. R., CHELESKI, J., MONTANARI, C. A. Integration of Ligand- and Target-Based Virtual Screening for the Discovery of Cruzain Inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 6-7, p. 565-578, 2011.

WILLETT, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 23-24, p. 1046-1053, 2006.

WIMO, A.; PRINCE, M. World Alzheimer's Report 2010: the global economic impact of dementia. London, UK: Alzheimer's Disease International, 2010.

XU, Y.; COLLETIER, J. P.; WEIK, M.; QIN, G.; JIANG, H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Long route or shortcut? A molecular dynamics study of traffic of thiocholine within the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Biophys J**, v. 99, n. 12, p. 4003-11, 2010.

YANG, S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11-12, p. 444-450, Jun 2010.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 2, p. 238-48, 2009.