UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da
acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**

Jonathan Resende de Almeida

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da
acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Física Biológica

Orientado(a): Jonathan Resende de Almeida

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

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

ALMEIDA, JONATHAN RESENDE

Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer. Ribeirão Preto, 2011.

144p.; il, 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Física Biológica.

Orientador: SILVA, CARLOS HENRIQUE TOMICH DE PAULA

1. Mal de Alzheimer.
2. Inibidores da acetilcolinesterase.
3. “screening” virtual.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jonathan Resende de Almeida

Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Física Biológica

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a toda
minha família, em especial ao
meu pai Mario, minha mãe Celia
e minha irmã Ellen por
demonstrarem durante estes anos
total apoio em todas as minhas
decisões e pela compreensão
também.*

*Dedico também àquelas pessoas
que mesmo de uma forma
indireta sempre torceram por
mim.*

Agradeço a Deus, por me mostrar que Seus sonhos para minha vida são muito maiores do que aquilo que pedi ou imaginei. Por me capacitar e me inspirar.

Ao meu orientador neste trabalho, Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva pelo apoio, dedicação e sinceridade nas palavras.

Aos meus colegas e amigos do grupo de pesquisa do LabCQF e técnicos pelos muitos momentos em que passamos juntos em constante aprendizagem e pela amizade que durante todos esses anos se solidificou.

A Prof^a. Dr^a. Carmem Lúcia Cardoso do departamento de química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto por sua colaboração.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e por ter me dado a oportunidade de desenvolvimento do mesmo. Agradeço ao crescimento intelectual.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho e que compartilharam comigo os seus conhecimentos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*
Albert Einstein

RESUMO

ALMEIDA, J. R. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. 2011. 144f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O Mal de Alzheimer é a causa mais importante de demência em idosos. A progressão dos sintomas da doença está associada com modificações estruturais nas sinapses colinérgicas em determinadas regiões cerebrais e, conseqüentemente, à diminuição do potencial de neurotransmissão colinérgica. Desta forma, o aumento da capacidade de neurotransmissão colinérgica constitui o mecanismo fundamental dos fármacos utilizados para o tratamento do Mal de Alzheimer. Atualmente, o único tratamento clínico eficaz para o Mal de Alzheimer (MA) é a utilização de inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Os anticolinesterásicos são os fármacos mais promissores desenvolvidos até hoje, pois é a única classe terapêutica que mostrou melhora nos sintomas cognitivos do MA. Para esse projeto, foram utilizadas diferentes técnicas de modelagem molecular como estratégia de planejamento racional de fármacos, tendo como base os inibidores de Acetilcolinesterase (AChE) descritos na literatura além dos que possuem estruturas depositadas no PDB, incluindo alguns que já vêm sendo utilizados no tratamento do Mal de Alzheimer. O objetivo foi planejar e testar novos potenciais inibidores desse alvo terapêutico, na tentativa de obter e futuramente otimizar novos protótipos como futuros candidatos a fármacos em Mal de Alzheimer. Os objetivos estendem-se a propostas de novos potenciais protótipos, selecionados de bases de dados de compostos comerciais contendo propriedades de fármacos. Os “screenings virtuais” foram tendenciados às estruturas dos inibidores já reportados da literatura bem como ao padrão farmacofórico comum a eles, a ser modelado.

Palavras-chave: Mal de Alzheimer; inibidores da acetilcolinesterase; “screening” virtual.

ABSTRACT

ALMEIDA, J. R. **Molecular modeling studies and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease.** 2011. 144f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Alzheimer's disease is the leading cause of dementia in the elderly. The progression of symptoms is associated with structural changes in cholinergic synapses in specific brain regions and consequently to decrease the potential of cholinergic neurotransmission. Thus, the increased capacity of cholinergic neurotransmission is the fundamental mechanism of the drugs used to treat Alzheimer's disease. Currently, the only effective clinical treatment for Alzheimer's (MA) is the use of inhibitors of acetylcholinesterase (AChE). Cholinesterase inhibitors are the most promising drugs developed so far, it is the only therapeutic class that showed improvement in cognitive symptoms of MA. For this project, we used different techniques of molecular modeling as a strategy for rational design of drugs based on inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) in the literature than those which have structures deposited in the PDB, including some that have already been used in the treatment Alzheimer's disease. The objective was to design and test new potential inhibitors of therapeutic target in attempts to obtain and optimize future new prototypes as future drug candidates in Alzheimer's disease. The goals extend to proposals from potential new prototypes, selected from databases of commercial compounds containing properties of drugs. The virtual screenings were trends to structures of the inhibitors already reported in the literature as well as the pharmacophoric pattern common to them, to be modeled.

Keywords: Alzheimer's disease; acetylcholinesterase inhibitors; virtual screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinapse entre as células nervosas. Em destaque a ação da enzima AChE na fenda sináptica. Sua função é catalisar a hidrólise do neurotransmissor ACh restante no espaço sináptico em colina e ácido acético. Acesso em: http://www.alz.org/brain/06.asp	2
Figura 2. 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.	8
Figura 3. Acetilcolina.....	9
Figura 4. Representação em <i>ribbons</i> da estrutura da acetilcolinesterase (AChE), com o detalhe do sítio ativo exibindo os resíduos Ser200, His440 e Glu327, os quais formam a tríade catalítica.	10
Figura 5. Estrutura da enzima acetilcolinesterase destacando os resíduos do sítio ativo, incluindo a tríade catalítica (verde), o sítio aniônico (amarelo) e o sítio aniônico periférico (azul).	11
Figura 6. Inibidores da AChE aprovados pela FDA para o tratamento do MA. (A) tacrina; (B) donepezil; (C) rivastigmina e (D) galantamina.	12
Figura 7. Interação tacrina/Trp84. Em destaque está representado a interação do tipo π -stacking entre o anel quinolínico da tacrina e o anel indólico do aminoácido Trp84.	13
Figura 8. Interação tacrina/His440. Em destaque a ligação de hidrogênio estabelecida diretamente entre o átomo de nitrogênio do anel quinolínico da tacrina com a carbonila da cadeia principal do aminoácido His440.	14
Figura 9. Interação tacrina/Phe330. Disposição em paralelo do anel quinolínico da tacrina com o grupo fenil do aminoácido Phe330.	14
Figura 10. No sítio ativo do complexo AChE-tacrina ocorre um afastamento do aminoácido Phe330 para que não haja impedimento estérico com a tacrina e estabeleça-se uma interação π -stacking . Destaca-se também que a tacrina está flanqueada pelo aminoácido Trp84.	15
Figura 11. Interação donepezil/Trp84. Interação do grupo benzílico da molécula de donepezil com o grupo indol do aminoácido Trp84.	16

Figura 12. Interação entre o átomo de nitrogênio piperidínico do donepezil, com os resíduos Phe330 e Tyr334.....	17
Figura 13. Interação donepezil/Trp279.....	18
Figura 14. Posição da parte NAP da molécula de rivastigmina no sítio ativo da AChE.	19
Figura 15. Mudança conformacional do resíduo de His440 que ocorre quando a enzima AChE está complexada com a rivastigmina.	20
Figura 16. (A) Interação galantamina/Trp84; (B) Interação galantamina/Glu199; (C) Interação galantamina/Ser200 e (D) Interação galantamina/His440.	21
Figura 17. Farmacóforo indica a região da molécula de um ligante que está intimamente ligada ao seu receptor e é responsável por sua atividade biológica. O conhecimento dessa região possibilita o planejamento de novos fármacos. Acesso em: http://accelrys.com/products/discovery-studio/pharmacophores/	26
Figura 18. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos, em duas diferentes vias (azul e vermelha).....	42
Figura 19. Método de imobilização em capilares de sílica fundida.....	46
Figura 20. Inibidores dos complexos com estruturas depositadas no banco de dados do PDB.....	49
Figura 21. Inibidores encontrados através da busca feita no BindingDB e que foram selecionados a partir dos valores de IC ₅₀ (nM), sem estruturas depositadas no PDB em complexo com a AChE.	52
Figura 22. Scaffold construído a partir da análise do padrão farmacofórico obtido, bem como dos inibidores selecionados do BindingDB.	60
Figura 23. Scaffold “farmacofórico” no sítio ativo da AChE. Destaca-se as principais interações feitas com alguns aminoácidos presentes no sítio, a saber, aqueles que fazem parte do sítio catalítico aniônico e do sítio periférico aniônico.	61

Figura 24. Sobreposição do inibidor 10 e do ligante original da estrutura cristalográfica 2CKM. Em laranja está representada a estrutura cristalográfica e em verde a do inibidor 10.....	63
Figura 25. (A) Sobreposição entre os resíduos do sítio ativo da acetilcolinesterase do complexo 1ACJ (átomos de carbon em amarelo) e 1QTI (átomos de carbono em verde). (B) Modo de ligação da galantamina (complex 1QTI). (C) Modo de ligação da tacrina (complex 1ACJ).....	64
Figura 26. Complexo galantamina-acetilcolinesterase (A) e complexo tacrina-acetilcolinesterase (B) em fase com os sítios virtuais de interação calculados dentro do sítio ativo.....	65
Figura 27. Os 4 Inibidores utilizados para a derivação do padrão farmacofórico.	66
Figura 28. Modelo farmacóforo obtido para os inibidores da AChE de alto peso molecular e alta atividade biológica.....	67
Figura 29. Sobreposição dos 24 compostos que foram obtidos através do screening virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica.	70
Figura 30. Sobreposição dos 20 compostos obtidos do screening virtual realizado com o “scaffold” como “constraint”.....	70
Figura 31. Sobreposição dos 12 compostos obtidos do screening virtual realizado com o “scaffold” como “constraint”.....	72
Figura 32. Sobreposição dos 19 compostos que foram obtidos através do screening virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica.	72
Figura 33. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 1 a 6.....	82
Figura 34. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 7 a 12.....	82
Figura 35. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 13 a 18.....	83

Figura 36. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 19 a 24.....	85
Figura 37. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 25 a 30.....	86
Figura 38. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 31 a 36.....	87
Figura 39. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 37 a 42.....	88
Figura 40. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 43 a 48.....	89
Figura 41. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 49 a 54.....	90
Figura 42. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 55 a 60.....	91
Figura 43. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 61 a 65.....	92
Figura 44. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 66 a 71.....	93
Figura 45. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 72 a 75.....	94
Figura 46. Compostos selecionados para aquisição comercial que se sobrepuseram a, pelo menos, dois grupos de provas dos quatro grupos testados.....	97
Figura 47. Campos de interação molecular calculados para o Composto 2 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom), contorno de energia a -3,0 kcal/mol e Flúor (em vermelho), contorno de energia a -4,0 kcal/mol.	98

Figura 48. Campos de interação molecular calculados para o Composto 5 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.	98
Figura 49. Campos de interação molecular calculados para o Composto 6 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.	100
Figura 50. Campos de interação molecular calculados para o Composto 10 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....	100
Figura 51. Campos de interação molecular calculados para o Composto 13 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....	100
Figura 52. Campos de interação molecular calculados para o Composto 16 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....	101
Figura 53. Campos de interação molecular calculados para o Composto 34 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....	101
Figura 54. Campos de interação molecular calculados para o Composto 40 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....	101
Figura 55. Campos de interação molecular calculados para o Composto 46 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....	102

- Figura 56. Campos de interação molecular calculados para o Composto 49 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....102
- Figura 57. Campos de interação molecular calculados para o Composto 50 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....102
- Figura 58. Campos de interação molecular calculados para o Composto 59 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; Cloro (em laranja), contorno -6.5 kcal/mol e DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.103
- Figura 59. Campos de interação molecular calculados para o Composto 61 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....103
- Figura 60. Campos de interação molecular calculados para o Composto 70 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....104
- Figura 61. Campos de interação molecular calculados para o Composto 72 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.....104
- Figura 62. Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado no monitoramento da atividade enzimática. Fase móvel: Tampão TRIS-HCl (0,1M, pH 8,0), reagente de Ellman (0,126mM). Vazão 50µL/min, $\lambda = 412\text{nm}$111
- Figura 63. Cromatograma representando a diminuição da banda de absorção na presença do inibidor Tacrina 200µM.111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibidores selecionados através de busca no banco de dados BindingDB, contendo estruturas depositadas no PDB, em complexo com AChE, e parâmetros da Regra dos Cinco.	48
Tabela 2. Inibidores selecionados (48) a partir dos menores valores de IC ₅₀ que não possuem complexos depositados no PDB. Parâmetros físico-químicos bem como da Regra dos Cinco são também aqui apresentados.	50
Tabela 3. Inibidores selecionados do banco de dados BindingDB apresentados com seus respectivos valores de pIC ₅₀	58
Tabela 4. Valores de RMSD e GoldScore obtidos para 10 orientações de alto escore nas simulações de docking flexível com a estrutura do complexo 2CKM.	62
Tabela 5. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 20 compostos melhores ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ZINC, por “scaffold”.	74
Tabela 6. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 24 compostos melhor ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ZINC, por farmacóforo.	76
Tabela 7. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 19 compostos melhor ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ChemBridge, por farmacóforo.	78
Tabela 8. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 12 compostos melhor ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ChemBridge, por “scaffold”.	80
Tabela 9. Propriedades físico-químicas relacionadas à Regra dos Cinco para os compostos selecionados por “screening” virtual.	106
Tabela 10. Porcentagem de inibição dos compostos testados no biorreator IMER-AChE na concentração de 200µM.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MA	Mal de Alzheimer
ACh	Acetilcolina
APP	proteína precursora de β -amilóide
ApoE	apolipoproteína E
ApoE- ϵ 4	apolipoproteína E- ϵ 4
A β	β -amilóide
AChE	acetilcolinesterase
CAT	colina acetiltransferase
SNC	sistema nervoso central
BChE	butirilcolinesterase
Tc	<i>Torpedo californica</i>
FDA	Food and Drug Administration
MIF	molecular interaction fields
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
ICM	Internal Coordinate Mechanics
GA	Genetic Algorithm
ADMET	absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
PASS	Prediction of Activity Spectra for Substances
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
IMER	Immobilized Enzyme Reactors

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mal de Alzheimer.....	1
1.2. Causas do Mal de Alzheimer	3
1.3. A hipótese amilóide	4
1.4. A hipótese colinérgica.....	6
1.5. Enzima Acetilcolinesterase (AChE)	8
1.6. Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE).....	12
1.7. Métodos envolvidos no planejamento racional <i>in silico</i> de fármacos.....	22
1.8. Screening virtual	24
1.9. Farmacóforo	25
2. OBJETIVOS.....	27
3. MÉTODOS	29
3.1. BindingDB	29
3.2. Determinação de Sítios de Ligação na Proteína.....	29
3.2.1. Q-SiteFinder.....	30
3.3. Derivação do padrão farmacofórico.....	30
3.4. Determinação do “Scaffold”	31
3.5. Docking.....	31
3.5.1. Simulações de “screening” virtual	34
3.5.2. Rescore.....	36
3.6. Preparação da base de dados	36
3.7. Campos de Interação Molecular	37
3.8. Predições ADMET	39

3.8.1. DEREK	40
3.9. Predições de Atividade – PASS	40
3.10. Seleção dos compostos.....	42
3.11. Procedimento experimental.....	44
3.12. Imobilização da enzima acetilcolinesterase	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Análise das estruturas.....	47
4.1.1. Scaffold	59
4.1.2. Validação.....	61
4.2. Determinação dos sítios virtuais de interação no sítio ativo da AChE.	63
4.3. Padrão farmacofórico	66
4.4. Seleção dos compostos.....	68
4.4.1. Modos de ligação dos compostos selecionados sugeridos pelos resultados do “screening” virtual	81
4.5. Campos de Interação Molecular	95
4.6. Propriedades físico-químicas	105
4.7. Predição de toxicidade – DEREK	107
4.8. Ensaios de atividade enzimática da AChE com potenciais inibidores.....	107
4.8.1. Imobilização da enzima acetilcolinesterase	109
4.8.2. Avaliação da produção de tiocolina pelo IMER-AChE	109
5. CONCLUSÕES	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mal de Alzheimer

O primeiro caso de demência com alterações neuropatológicas típicas como os emaranhados neurofibrilares e as placas senis foi descrita por Alois Alzheimer no ano de 1906 em uma paciente de 55 anos de idade, sendo o termo Mal de Alzheimer introduzido por Emil Kraepelin (MARTOCCHIA, A. & FALASCHI, P., 2008).

O Mal de Alzheimer (MA) é o tipo mais comum de demência, sendo responsável por 60-80% dos casos. Os sintomas clínicos precoces incluem dificuldades de se lembrar de nomes e acontecimentos recentes, assim como apatia e depressão. Os sintomas tardios são caracterizados por problemas de julgamento, desorientação, confusão, mudanças de comportamento, dificuldade para falar, engolir e andar (2010 Alzheimer's Disease Facts and Figures).

Estima-se atualmente que 35,6 milhões de pessoas possuem o Mal de Alzheimer e outros tipos de demência ao redor do mundo (World Alzheimer Report 2010). O impacto econômico causado pela doença também é muito notável, um estudo recente mostrou que as estimativas dos custos globais passaram de US\$315 bilhões em 2005 para US\$422 bilhões em 2009 (WIMO, A. et al., 2010).

Esta doença é uma desordem neurológica devastadora e fatal, mas a compreensão exata de sua causa, assim como sua cura ainda não é conhecida. O MA afeta principalmente idosos, sendo conhecido como uma doença senil e o aumento da expectativa de vida tem elevado gradualmente o número de pessoas que estão desenvolvendo a doença (RAUK, A., 2009).

Uma característica distintiva das anormalidades é caracterizada, microscopicamente, pela presença de placas amilóides (depósito de fragmentos de proteína beta-amiloide) e

emaranhados neurofibrilares (“fios torcidos” da proteína Tau), associados à perda gradual da capacidade cognitiva e deterioração progressiva da memória e do aprendizado, resultantes de um déficit colinérgico (SHINTANI, E.Y. & UCHIDA, K.M.,1997 & Alzheimer’s Disease Facts and Figures, 2009).

As 100 bilhões de células nervosas ou neurônios se conectam entre si por conexões chamadas sinapses (Figura 1). Nessas ligações os fluxos de informação, em forma de pequenos pulsos químicos, são liberados de um neurônio e retomados por uma célula receptora, e é através desses circuitos no cérebro que se cria a base celular de lembranças, pensamentos e habilidades. No Mal de Alzheimer, um grande número de células nervosas se deteriora, ocasionando falhas na transferência de informação nas sinapses, diminuição do número destas e, em estágios avançados, os neurônios morrem (Alzheimer’s Disease Facts and Figures, 2009).

Figura 1. Sinapse entre as células nervosas. Em destaque a ação da enzima AChE na fenda sináptica. Sua função é catalisar a hidrólise do neurotransmissor ACh restante no espaço sináptico em colina e ácido acético. Acesso em: <http://www.alz.org/brain/06.asp>.

Essa perda de neurônios, assim como a perda de funções sinápticas cerebrais, inicia-se no hipocampo, uma área do córtex cerebral que atua na importante função de formação de novas memórias (RAUK, A., 2009).

Foi definido que no Mal de Alzheimer, o peptídeo β -amilóide, as placas neuríticas e os emaranhados neurofibrilares afetam principalmente as vias do septo-hipocampal e do prosencéfalo basal-neocortical da transmissão colinérgica, assim, o metabolismo da acetilcolina (ACh) é diminuído. Estas observações deram origem a hipótese colinérgica (INESTROSA, N.C. et al., 2005).

As pesquisas sobre a enzima acetilcolinesterase têm aumentado devido às novas descobertas apoiando o envolvimento da enzima na formação do peptídeo β -amilóide durante a patogênese do MA (GUPTA, S., GOPI MOHAN, C., 2010).

1.2. Causas do Mal de Alzheimer

Exames microscópicos revelaram características críticas da doença, um córtex cerebral com muitos emaranhados neurofibrilares e placas senis. Sendo assim, o MA pode ser caracterizado como uma demência que possui tais características histopatológicas anormais, além da perda drástica de neurônios.

Alguns casos podem ser definidos como sendo de natureza genética, equivalente a apenas 5% do total, e são chamados MA familiar. Este tipo é causado por uma rara mutação em um gene. Estas mutações foram identificadas no gene da proteína precursora de β -amilóide (APP) que está localizado no cromossomo 21 (SELKOE, D.J. & PODLISNY, M.B., 2002).

Várias mutações pontuais no gene que codifica a proteína precursora de β -amilóide no cromossomo 21 são suficientes para a causa de início precoce do MA familiar autossômico (MUNOZ, D. G. & FELDMAN. H., 2000).

Um polimorfismo genético comum que afeta o gene da apolipoproteína E (ApoE) está firmemente estabelecido como sendo o principal fator de risco (além da idade) para o

desenvolvimento do Mal de Alzheimer. Esta lipoproteína está envolvida na reparação sináptica, especialmente em resposta ao dano tecidual. Assim sendo, ela tem um importante papel na manutenção da estrutura e da função neuronal colinérgica (POIRIER, J. et al., 1995).

Apenas um gene de risco foi identificado, o da apolipoproteína E- ϵ 4 (ApoE- ϵ 4). Este gene foi mapeado do cromossomo 19. ApoE- ϵ 4 é uma das três formas do gene ApoE que fornece o modelo para uma proteína que transporta o colesterol no sangue. Aquelas pessoas que herdam um gene ApoE- ϵ 4 têm maior risco de desenvolver o MA. Entretanto, herdar uma ou duas cópias do gene não é garantia de que o indivíduo desenvolverá a doença (SOININEN, H., 1995).

Todas as mutações genéticas e fatores de risco estão associados com a produção anormal do peptídeo β -amilóide (A β), que é o principal constituinte das placas senis que são diagnosticadas no Mal de Alzheimer (RAUK, A., 2009). O gene A β é o agente causador do MA, primeiro enunciado como a “Hipótese Amilóide” (GLENNER, G.G. & WONG, C.W., 1984).

1.3. A hipótese amilóide

As placas senis consistem de um depósito de material amilóide (agregados de peptídeos chamados beta-amilóide 40 e 42) e estão associadas a inchaços e processos neurais distorcidos chamados neurites distróficas. A especificidade do amilóide cerebral deve-se ao seu principal componente peptídeo, β -amilóide, que é um pequeno fragmento de aminoácido da proteína transmembrana, a precursora de proteína β -amilóide (MUNOZ, D.G. & FELDMAN, H., 2000).

Essas placas começam como um depósito não agregado, supostamente uma β -amilóide não tóxica (placas difusas). No entanto, em alguns indivíduos elas passam por uma transformação sequencial e tornam-se placas neuríticas senis maduras que estão associadas com o desenvolvimento do MA (MACKENZIE, I.R., 1994). É pensado que a enzima

butirilcolinesterase (BChE) pode desempenhar um papel essencial neste processo de maturação. Embora o número de placas senis aumente com a idade, o número permanece baixo na maioria dos indivíduos cognitivamente intactos (GUILLOZET A.L. et al., 1997).

Existem dois caminhos para a produção de fragmentos não neurotóxicos ou supostamente neurotóxicos durante a clivagem da enzima precursora de amilóide. A toxicidade resultante dos fragmentos depende do tipo de enzima envolvida no processo.

Pela via da α -secretase, a clivagem ocorre entre os resíduos 16 e 17 da Proteína Precursora de Amilóide (PPA) produzindo segmentos solúveis e não neurotóxicos. Pela via da β -secretase, é produzida a β -amilóide (fragmento 1 – 40/42 da enzima precursora), a qual é neurotóxica (MUNOZ, D.G. & FELDMAN. H., 2000).

Outra anormalidade histopatológica é a formação de emaranhados neurofibrilares. Esses emaranhados consistem nos aberrantes agregados fibrilares de proteínas de microtúbulos fosforiladas dentro do citoplasma neural. Os emaranhados destroem o sistema de transporte das células que é formado por estas proteínas.

Nas regiões saudáveis, o sistema de transporte é organizado em filamentos paralelos ordenados. As moléculas de nutrientes, partes de células e outros materiais essenciais são transportados por estes filamentos. Uma proteína chamada Tau ajuda os filamentos a permanecerem retos.

Em regiões com formação de emaranhados, a Tau se converte nos filamentos torcidos que compõem os emaranhados. Os filamentos não conseguem mais se manter retos, eles se rompem e se desintegram. Nutrientes e outros suprimentos essenciais não conseguem mais se movimentar através das células, as quais acabam morrendo (Alzheimer's association – Alz.org).

A presença de emaranhados neurofibrilares significa o fracasso do neurônio em manter adequadamente o seu citoesqueleto que é necessário para apoiar a forma de ramificação complexa de seus numerosos processos (MUNOZ, D.G. & FELDMAN. H., 2000).

Um pequeno número de emaranhados neurofibrilares é uma consequência universal do envelhecimento. No entanto, é o aumento do número e da distribuição dos emaranhados que promove a patologia e define os estágios da doença (BRAAK H. & BRAAK E., 1991). O desenvolvimento dos emaranhados neurofibrilares é um dos principais mecanismos de morte dos neurônios no MA (GOMEZ-ISLA T. et al., 1997).

Alguns grupos de neurônios são preferencialmente afetados pelos emaranhados no MA. Eles frequentemente ocorrem em áreas do hipocampo que estão envolvidas no processamento de experiências anteriores para armazenar como memória permanente. Os neurônios do prosencéfalo que fornecem a maioria da inervação colinérgica são proeminentemente afetados. O déficit resultante dos neurotransmissores colinérgicos é frequentemente tratado com inibidores colinérgicos (MUNOZ, D.G. & FELDMAN. H., 2000).

A progressão dos sintomas da doença está associada com modificações estruturais nas sinapses colinérgicas em determinadas regiões cerebrais e, conseqüentemente, à diminuição do potencial de neurotransmissão colinérgica. Desta forma, o aumento da capacidade de neurotransmissão colinérgica constitui o mecanismo fundamental dos fármacos utilizados hoje para o tratamento do Mal de Alzheimer. Isto é possível através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual atua nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e o periférico, sendo responsável pela interrupção da transmissão do impulso nervoso colinérgico através da hidrólise da acetilcolina. (DVIR, H. et al., 2002).

1.4. A hipótese colinérgica

Atualmente, a perda da função colinérgica é a única evidência encontrada como sendo responsável pelo declínio cognitivo no MA. Sendo assim, o desenvolvimento terapêutico tem se concentrado sobre essa teoria (SUGIMOTO, H., 2008). Uma das mais consistentes e

profundas mudanças associadas com o Mal de Alzheimer é o déficit na neurotransmissão colinérgica, embora a alteração de outros sistemas neurotransmissores também seja observada.

Nos últimos anos, o defeito da neurotransmissão (hipótese colinérgica) tem sido extensivamente investigado em MA, e os distúrbios de terminais pré-sinápticos colinérgicos decorrentes dos núcleos do prosencéfalo basal foi demonstrado no hipocampo e neocórtex. Investigações concentradas no cérebro de pessoas no estágio inicial da doença estão se tornando cada vez mais importantes como métodos de diagnósticos. Tais investigações podem auxiliar no desenvolvimento e identificação de estratégias de neuroproteção, assim como métodos de abordagem mais específicos para o MA. (TERRY, A.V. & BUCCAFUSCO, J.J., 2003)

O *nucleus basalis* de Meynert é o responsável e a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT), e é pela sua atrofia que há uma deficiência da acetilcolina (ACh) no Mal de Alzheimer. A enzima CAT é transferida para estruturas-alvo no sistema nervoso central (SNC), e nessas regiões ela catalisa a reação de síntese da ACh a partir da colina e da acetilcoenzima A. Depois de formada, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde será acoplada a dois tipos de receptores, o muscarínico e o nicotínico. A ACh restante é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), na fenda sináptica, em acetato e colina (MARTOCCHIA, A. & FALASCHI, P., 2008).

No MA, existe uma atrofia do *nucleus basalis*, e o resultado desta atrofia é uma diminuição da síntese da CAT levando também a um déficit da ACh. Uma estratégia, portanto é desenvolver fármacos que possam aprimorar a função colinérgica. Níveis sinápticos de ACh podem ser aumentados pela inibição da enzima AChE.

Os anticolinesterásicos são os fármacos mais promissores desenvolvidos até hoje, pois é a única classe terapêutica que mostrou melhora nos sintomas cognitivos do MA. Estes

fármacos atuam na fenda sináptica, inibindo a enzima acetilcolinesterase. Os agentes anticolinesterásicos, portanto, representam fármacos de escolha para o tratamento atual do Mal de Alzheimer (GIACOBINI, E., 1998).

1.5. Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

Com a resolução da estrutura tridimensional da acetilcolinesterase de *Torpedo californica* em 1991 por Sussman e seus colaboradores (SUSSMAN, J.L. et al., 1991) (Figura 2), novos horizontes em pesquisa com esta enzima foram abertos e desde então a AChE tem sido alvo de intensas investigações.

Figura 2. 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.

Existem atualmente 97 estruturas cristalográficas de AChE derivadas de 5 espécies:

- Humana;
- *Drosophila*;
- Enguia elétrica;
- *Torpedo californica*;
- Rato.

Dessas 97 estruturas, 55 são originadas da AChE de *Torpedo californica*, a maioria dos fármacos que foram aprovados para o tratamento ou administração do Mal de Alzheimer e que estão relacionados à AChE utilizaram a enzima de *Torpedo californica* (KAMAU, E. & MUSTATA, G., 2007).

A função da enzima acetilcolinesterase é catalisar rápida e eficientemente a hidrólise da acetilcolina (Figura 3). 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. Como resultado, a despolarização produzida por ligação da acetilcolina ao receptor é finalizada com o objetivo de restabelecer a estabilidade da membrana pós-sináptica e a sua permeabilidade por mecanismos de repolarização.

Figura 3. Acetilcolina

A acetilcolinesterase, pesando cerca de 320.000 Daltons, contém dois tipos de cadeias polipeptídicas, cada uma das quais presentes em duplicata ($\alpha 2\beta 2$). A AChE é de fato uma

enzima éster hidrolase geral, sendo altamente efetiva para acetilcolina. Deste modo, é mais específica do que outras esterases, tais como a butirilcolinesterase (BChE) (GRINGAUZ, A., 1997).

O sítio ativo da AChE é composto por dois subsítios, sendo um esterásico e outro de ligação de colina, que se ligam, respectivamente, ao grupo carbonílico e amônio quaternário da ACh (acetilcolina). Existe ainda um segundo sítio de ligação de colina, chamado de periférico, assim considerado por estar distante do sítio ativo. Inibidores biquaternários de AChE possuem um maior poder inibitório relativo a inibidores monoquaternários devido à capacidade de se ligarem aos dois sítios de ligação de colina, distantes 14 Å. A estrutura tridimensional da AChE de *Torpedo californica* (Tc) revela que o sítio ativo está localizado na porção inferior de uma cavidade estreita e profunda, denominada “cavidade aromática”, composta de mais de 50% do seu volume por anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos. No sítio ativo da enzima AChE, os aminoácidos Ser200, His440 e Glu327 são considerados essenciais para a atividade catalítica enzimática, sendo conhecidos como a “triáde catalítica” de AChE (Figura 4) (HAREL, M. et al., 1993).

Figura 4. Representação em *ribbons* da estrutura da acetilcolinesterase (AChE), com o detalhe do sítio ativo exibindo os resíduos Ser200, His440 e Glu327, os quais formam a triáde catalítica.

A AChE é uma hidrolase extremamente eficiente quando comparada com outras serino-hidrolases que fazem uso da mesma tríade catalítica. Ela pertence à família da α/β hidrolases.

O sítio ativo desta enzima está “enterrado” próximo de uma profunda e estreita cavidade, o que era imprevisível dado à alta velocidade de reação da mesma. Esta cavidade é cercada por 14 resíduos aromáticos conservados, onde os anéis de cada um deles compõem, aproximadamente, 70% da superfície da cavidade, com Trp84 e Phe330 contribuindo para o chamado sítio catalítico aniônico e Tyr70, Tyr121 e Trp279 contribuindo para o sítio periférico aniônico (Figura 5).

Figura 5. Estrutura da enzima acetilcolinesterase destacando os resíduos do sítio ativo, incluindo a tríade catalítica (verde), o sítio aniônico (amarelo) e o sítio aniônico periférico (azul).

Existe uma razão para o sítio ativo de muitas enzimas estar enterrado, e tomando a AChE como exemplo, a justificativa está no fato de que com o sítio da AChE enterrado, o substrato, acetilcolina, estará rodeado pela proteína, permitindo múltiplas interações

substrato/enzima que, por sua vez, cria um estado de transição mais eficaz (SILMAN, I. & SUSSMAN, J., 2008).

1.6. Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE)

O desenvolvimento de tratamentos eficazes para o Mal de Alzheimer tem sido muito estudado e prosseguido com determinação ao longo das últimas décadas. A maioria dos recentes estudos está concentrada nos fármacos que inibem a acetilcolinesterase e, assim, aumentam a disponibilidade de acetilcolina no cérebro. Isto poderia reverter os prejuízos na memória e danos causados referentes à doença.

Vários inibidores da AChE estão sendo investigados para o tratamento do MA. No entanto apenas a tacrina (Cognex[®]), donepezil (Aricept[®]), rivastigmina (Exelon[®]) e galantamina (Nivalin[®]) foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos para uso terapêutico (Figura 6).

Figura 6. Inibidores da AChE aprovados pela FDA para o tratamento do MA. (A) tacrina; (B) donepezil; (C) rivastigmina e (D) galantamina.

1. Tacrina (Cognex[®])

O protótipo para os inibidores de ação central na AChE foi a tacrina, primeiro fármaco a ser aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de Alzheimer (Figura 6A). No entanto, seus efeitos colaterais graves como hepatotoxicidade e distúrbio gastrointestinal, representam uma desvantagem significativa (CAMPS, P. et al., 2000).

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 (Figura 7).

Figura 7. Interação tacrina/Trp84. Em destaque está representado a interação do tipo π -stacking 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 (Figura 8), componente da tríade catalítica, e ainda, o anel quinolínico dispõe-se paralelamente e em contato com o grupo fenil do aminoácido Phe330 (Figura 9).

Figura 8. Interação tacrina/His440. Em destaque a ligação de hidrogênio estabelecida diretamente entre o átomo de nitrogênio do anel quinolínico da tacrina com a carbonila da cadeia principal do aminoácido His440.

Figura 9. Interação tacrina/Phe330. Disposição em paralelo do anel quinolínico da tacrina com o grupo fenil do aminoácido Phe330.

Quando os complexos AChE-tacrina e AChE-donepezil são comparados por superposição estrutural, observa-se para o primeiro uma mudança conformacional da Phe330, de forma a evitar um impedimento estérico entre a sua cadeia lateral e a tacrina e, simultaneamente, favorecer uma interação de empilhamento- π de seu anel aromático com o grupo fenil do sistema quinolínico da tacrina. Desta forma, a tacrina encontra-se "flanqueada" pelo aminoácido Trp84, com o qual estabelece potente interação de empilhamento- π e pelo aminoácido Phe330, capaz de também estabelecer forte interação π - π com o anel quinolínico (Figura 10) (HAREL, M. et al, 1993).

Figura 10. No sítio ativo do complexo AChE-tacrina ocorre um afastamento do aminoácido Phe330 para que não haja impedimento estérico com a tacrina e estabeleça-se uma interação π -stacking. Destaca-se também que a tacrina está flanqueada pelo aminoácido Trp84.

Os resultados dos estudos com a tacrina estimularam o desenvolvimento de outros inibidores da AChE de ação central reversível.

2. Donepezil (Aricept[®])

O donepezil (Figura 6B) foi desenvolvido com o objetivo de superar as desvantagens da tacrina, e foi posteriormente aprovado pela FDA para o tratamento do Mal de Alzheimer. É altamente seletivo para a acetilcolinesterase, com uma afinidade significativamente inferior para a butirilcolinesterase (BChE) (RACCHI, M. et al., 2004).

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) dimetóxiindanona. Este fármaco estabelece interações principalmente por π -stacking 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 (Figura 11).

Figura 11. Interação donepezil/Trp84. Interação do grupo benzílico da molécula de donepezil com o grupo indol do aminoácido Trp84.

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” (Figura 12).

Figura 12. Interação entre o átomo de nitrogênio piperidínico do donepezil, com os resíduos Phe330 e Tyr334.

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 π - π paralela (“face-a-face”) (Figura 13).

Figura 13. Interação donepezil/Trp279.

O fato da ligação de donepezil com a enzima AChE ser extremamente dependente da interação com os resíduos Trp279 e Phe330, ausentes na enzima butirilcolinesterase (BChE), explica a alta seletividade de donepezil para a AChE e não para a BChE (KRYGER, G. et al, 1998).

3. Rivastigmina (Exelon[®])

A rivastigmina (Figura 6C) é um composto do tipo carbamato que inibe seletivamente a enzima acetilcolinesterase, melhorando a neurotransmissão colinérgica. O efeito da

rivastigmina sobre a enzima poderia diminuir a formação da proteína precursora do β -amilóide e, assim, diminuiria a formação das placas amilóides características da doença.

Estudos de cinética realizados com AChE de eritrócitos humanos tratados com a rivastigmina revelaram que este composto é um inibidor de ligação lenta e reversível. Ambas as partes da molécula, o grupo carbamil e o NAP são retidos na cavidade do sítio ativo, mas independente uma da outra. Pelo estudo feito por Bar-On, P. e seus colaboradores (BAR-ON, P. et al., 2002), a maior densidade de picos positivos foi observada na parte inferior da cavidade do sítio ativo. Esses picos devem-se a interação feita pelos resíduos de aminoácidos numa posição próxima a Ser200 e outra na proximidade dos aminoácidos Trp84 e Phe330 (Figura 14).

Figura 14. Posição da parte NAP da molécula de rivastigmina no sítio ativo da AChE.

Comparações com a estrutura da AChE nativa com o complexo AChE-rivastigmina revelaram uma mudança substancial na posição do anel imidazol do resíduo de histidina na tríade catalítica, His440. Este significativo movimento da histidina no sítio ativo para longe do Glu327, seu parceiro de ligação de hidrogênio, resulta numa interrupção da ação da tríade catalítica podendo fornecer uma explicação para a lenta e incomum cinética de reativação (Figura 15) (BAR-ON, P. et al., 2002).

Figura 15. Mudança conformacional do resíduo de His440 que ocorre quando a enzima AChE está complexada com a rivastigmina.

4. Galantamina (Nivalin[®])

A galantamina (Figura 6D) é um alcalóide natural da família dos lírios, em particular na espécie *Galanthus nivalis*. Desde sua descoberta, ela tem sido testada em várias aplicações neurológicas. Ela atua como um ativador nicotínico de receptores gangliônicos e musculares e em receptores nicotínicos no cérebro. De fato, as evidências indicam que o efeito sobre o receptor também desempenha um papel na melhora cognitiva (GREENBLATT, H. M. et al., 2003).

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 (Figura 16) (GREENBLATT, H.M. et al., 1999; BARTOLUCCI, C. et al., 2001).

Figura 16. (A) Interação galantamina/Trp84; (B) Interação galantamina/Glu199; (C) Interação galantamina/Ser200 e (D) Interação galantamina/His440.

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 (GREENBLATT, H.M. et al., 2001).

Em um esforço para aumentar a afinidade da galantamina para AChE, uma série de derivados desta molécula foi sintetizada, visando a criação de compostos “bisacting”, ou seja, compostos que interagem com dois locais de ligação na molécula AChE (MARY, A. et al, 1998).

1.7. Métodos envolvidos no planejamento racional *in silico* de fármacos

Atualmente, o planejamento racional baseado em estrutura é a metodologia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como “compostos de partida” ou “*lead compounds*”), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e efeitos colaterais), até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos (Oprea, 2005). Esta metodologia é baseada na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (DNA ou RNA) associados a diferentes doenças. A informação estrutural do bioreceptor (e ligantes) permite a descoberta e direciona a síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem vir a se tornar potentes fármacos. Essa abordagem, em sua essência, caracteriza o planejamento racional de fármacos baseado em estrutura. O que torna ainda mais atrativo tal *approach*, quando utilizado com proteínas, é o conhecimento de que 78% dos fármacos atuais têm como alvo receptor esse tipo de biomolécula (OPREA, 2005).

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

DNA, caracterizando o “*docking* macromolecular”. Entre os *softwares* mais utilizados para esse fim, destaca-se o recente **ZDOCKPro** (INSIGHT II user guide, 2005). Os métodos de *docking*, em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de pontes de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, a qual gera modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de escores de energia. O “Problema do *docking*” é assim centrado na geração e avaliação (quase sempre por intervenção do usuário) de plausíveis estruturas de complexos intermoleculares (CODDING, 1998). As mais recentes versões dos dois *softwares* de maior sucesso em *docking*, **FlexE** (SYBYL user guide, 2005), **GOLD** (NISSINK et al., 2002) e **GLIDE**, consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor. Os mais recentes e promissores métodos de *docking* utilizam informação farmacofórica do sítio receptor para guiar as simulações, tais como o **FlexX-Pharm** (SYBYL user guide, 2005). A partir dessa metodologia é possível seleccionar, por *screening* virtual, compostos de bases de dados de milhares de estruturas, eliminando compostos não promissores antes que eles sejam sintetizados, em tempo consideravelmente menor do que o usualmente gasto com um *screening* por subestrutura.

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). Baseado no algoritmo de **Delphi** (GILSON et al., 1987) e posteriormente implementado no *software* **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 provas 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). Os *softwares* de uso mais frequente que empregam metodologia similar são o pioneiro **GRID** (GOODFORD, 1985), **CMIP** (BARRIL et al., 2001& FRADERA et al., 2002) e, mais recentemente, **VolSurf** (SYBYL user guide, 2005) e **Almond** (SYBYL user guide, 2005). O *software* **Almond**, adicionalmente, transforma os campos moleculares de seus grupos de prova em descritores (parâmetros), os quais estão associados com as principais forças de interação entre ligante e receptor, correlacionando-os espacialmente à atividade biológica.

1.8. Screening virtual

O “screening” virtual é uma metodologia rápida e cada vez mais eficaz para análise computacional de dados no planejamento de novos fármacos. Um objetivo primário do “screening” virtual é a redução do espaço virtual químico de uma base de dados de compostos, na qual se faz uma varredura direcionada a uma proteína-alvo específica (VYAS, V. et al, 2008).

Esta metodologia tem sido amplamente utilizada para análise computacional de um grande número de compostos a fim de selecionar aqueles que deverão ser adquiridos e ensaiados.

Buscas feitas através de “screening” por docking ou farmacóforo são alguns dos métodos usados para encontrar protótipos, ligantes de uma dada proteína-alvo. O “screening”

virtual por docking requer um conhecimento da estrutura 3D da enzima para priorizar compostos por sua probabilidade de se ligar à proteína com maior afinidade (LENGAUER, T. et al, 2004).

Por outro lado, a triagem virtual baseada no farmacóforo é um processo de combinar átomos ou grupos funcionais e relações geométricas entre eles com o farmacóforo de consulta (VYAS, V. et al, 2008).

Metodologias de “screening” virtual cresceram junto com o aumento do conhecimento sobre um dado fármaco e seu alvo e do farmacóforo. Novos desenvolvimentos indicam que o progresso pode ser feito através da combinação de filtragem do farmacóforo com métodos de docking, bem como, utilizando várias funções de escore em paralelo (SCHNEIDER, G. et al, 2002).

A essência do “screening” virtual baseado em estrutura é simular eventos de reconhecimento molecular, sendo muito mais do que apenas um exercício de “docking”. É também uma atividade dependente do cuidado na preparação do “input” e da análise do “output”.

1.9. Farmacóforo

Um farmacóforo pode ser definido como o arranjo espacial das características estruturais essenciais comuns a um conjunto de ligantes ativos. Os farmacóforos são usados para definir características essenciais de uma ou mais moléculas ativas com respeito a um mesmo alvo biológico. Características típicas de um farmacóforo são grupos hidrofóbicos, aromáticos, aceptores de ligação de hidrogênio, doadores de ligação de hidrogênio, cátions, ânions. Essas características (“features”) precisam combinar diferentes grupos químicos com propriedades similares, contribuindo para identificar novos ligantes. Na Figura 17 é apresentado um farmacóforo genérico e algumas de suas características.

Figura 17. Farmacóforo indica a região da molécula de um ligante que está intimamente ligada ao seu receptor e é responsável por sua atividade biológica. O conhecimento dessa região possibilita o planejamento de novos fármacos. Acesso em: <http://accelrys.com/products/discovery-studio/pharmacophores/>

O farmacóforo determina as características fundamentais necessárias para a atividade biológica de um composto (ou série de compostos). A modelagem por farmacóforo tem sido usada extensivamente na busca por novos compostos ativos, tanto em ambientes acadêmicos como em indústrias farmacêuticas (BUREAU, R. et al, 2002).

Compostos virtuais com diferentes estruturas e conformações podem ser mapeados com respeito a um farmacóforo de compostos bioativos relatados, com ou sem estruturas de complexos proteína-ligante conhecidos. O sucesso dessa metodologia de “screening” virtual baseado em farmacóforo (ou ligantes) vai depender da precisão e da especificidade do farmacóforo obtido (BUREAU, R. et al, 2002).

2. OBJETIVOS

Para esse projeto, foram inicialmente utilizadas diferentes técnicas de modelagem molecular como estratégia de planejamento racional de fármacos, tendo como base os inibidores de Acetilcolinesterase (AChE) descritos na literatura além dos que possuem estruturas depositadas no PDB, incluindo alguns que já vêm sendo utilizados no tratamento do Mal de Alzheimer. O objetivo é planejar e testar novos potenciais inibidores desse alvo terapêutico, na tentativa de obter e futuramente otimizar novos protótipos como futuros candidatos a fármacos para a doença. Os objetivos estendem-se a propostas de novos potenciais protótipos, selecionados de bases de dados de compostos comerciais contendo propriedades de fármacos. Os “screenings” virtuais serão tendenciados às estruturas dos inibidores já reportados da literatura bem como ao padrão farmacofórico comum a eles, a ser modelado.

Os objetivos específicos deste projeto são:

- ✓ Levantamento bibliográfico de informações gerais sobre o Mal de Alzheimer;
- ✓ Levantamento bibliográfico de informações da estrutura tridimensional da Acetilcolinesterase, assim como sobre suas funções;
- ✓ Estudo e aplicação de técnicas de modelagem molecular e quimioinformática;
- ✓ Mapeamento do sítio ativo da AChE;
- ✓ Realizar simulações de “screening” em bases de dados de estruturas virtuais;
- ✓ Verificar a presença de grupamentos toxicofóricos na estrutura dos potenciais ligantes selecionados;

- ✓ Investigar os ligantes em campos de interação molecular (MIFs);
- ✓ Selecionar compostos para aquisição comercial e posteriormente realizar ensaios de atividade com a AChE.

Identificar uma macromolécula biológica que tem um importante papel no processo de uma doença e procurar por um composto de baixo peso molecular que inativa esse alvo macromolecular por ligação com uma alta afinidade, tem se tornado um dos principais passos iniciais na descoberta de novos fármacos.

Para um projeto direcionado à descoberta de novos ligantes é importante o desenvolvimento de grandes bases de dados de compostos.

Os passos para as aplicações potenciais de um banco de dados de compostos incluem:

- Análises de ligantes para um alvo específico a fim de descobrir características químicas e farmacóforo que se relacionem com a afinidade.
- Parametrização e validação de métodos amplamente aplicáveis ao planejamento de ligantes.
- Identificação de compostos candidatos a fármacos por busca de ligantes conhecidos para uma proteína-alvo.
- Identificação de candidatos a fármacos com um alto risco de apresentar efeitos colaterais.

3. MÉTODOS

3.1. BindingDB

O BindingDB (<http://www.bindingdb.org>) é um banco de dados acessível ao público e contém cerca de 20.000 afinidades de ligação experimentalmente determinadas de complexos proteína-ligante, sendo 110 proteínas-alvo incluindo isoformas e variantes de mutação e 11.000 pequenas moléculas ligantes. 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 (LIU et. al., 2007).

Os resultados gerados pela consulta no BindingDB podem ser obtidos por download 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 apenas aqueles ligantes que tinham um valor de IC_{50} menor que 50 μM , sendo este o limiar pré-estabelecido para a seleção dos ligantes da AChE.

3.2. Determinação de Sítios de Ligação na Proteína

Identificar a localização de um sítio de ligação numa proteína é de fundamental importância durante o planejamento de novos fármacos e, em particular, para a realização de “docking” molecular. Com esta finalidade, foi utilizado o web-servidor, **Q-SiteFinder** (LAURIE, 2005).

3.2.1. Q-SiteFinder

O **Q-SiteFinder** (LAURIE, 2005) é um método que prediz sítios de ligação favoráveis utilizando um critério puramente de energia. Esse método calcula as interações de energia de van der Waals de um grupo de prova metila com a proteína. As provas com energias de interação favoráveis são retidas e os mapas destas provas são classificadas de acordo com suas energias totais de interação. O web-servidor encontra-se disponível em <http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitesfinder/>.

3.3. Derivação do padrão farmacofórico

A técnica utilizada para a derivação do padrão farmacofórico foi através do programa **Discovery Studio 2.5** 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).

Para esta análise e determinação do padrão farmacofórico, utilizamos as estruturas dos inibidores da AChE que possuem dados de atividade relatados na literatura e que possuem estrutura cristalográfica. As estruturas cristalográficas aqui utilizadas vieram do banco de dados de compostos que foram selecionadas do BindingDB.

3.4. Determinação do “Scaffold”

Com o farmacóforo assim derivado, foi elaborado um “scaffold” para auxiliar no processo de “screening” virtual e busca de compostos similares nos bancos de dados de compostos.

O “scaffold” é uma subestrutura, um fragmento ativo, que pode ser sistematicamente explorado para a busca em bibliotecas de compostos, tipicamente com propriedades “drug-like”. Utilizando o “scaffold”, a busca de novos compostos é dita ser baseada na estrutura do ligante por similaridade, onde moléculas similares são suscetíveis a ter propriedades físico-químicas similares e, portanto, podem apresentar atividades biológicas similares (WALTERS et al, 1998).

3.5. Docking

Em modelagem molecular, “docking” é o método que define a orientação preferencial de uma molécula com respeito a outra na formação de complexos estáveis, por exemplo enzima-inibidor ou proteína-ligante. O conhecimento da orientação preferencial, por sua vez, pode ser utilizado para prever a afinidade de ligação entre duas moléculas, usando, para isso, funções de “score” apropriadamente desenvolvidos para esse fim (LENGAUER, T. & RAREY, M., 1996).

O docking é frequentemente usado para prever o modo de ligação de compostos a proteína-alvo, validando suas afinidades relativas. O docking desempenha um papel importante no planejamento racional de fármacos baseado em estrutura (KITCHEN, D. B. et al., 2004).

O principal foco do docking molecular é simular computacionalmente o processo de reconhecimento molecular. O objetivo do docking é atingir uma orientação e uma

conformação otimizada tanto para o ligante e a proteína tal que a energia do complexo seja a mínima.

Uma das características mais valiosas dos métodos de docking é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como uma forma de validação dos mesmos. Para realizar um teste desse nível, um ligante é extraído de seu complexo cristalográfico e submetido a simulações com o sítio ligante da proteína. Dessa forma, os modos de ligação obtidos nas simulações são comparados com os respectivos modos de ligação obtidos experimentalmente. Outra possibilidade inerente ao método é a capacidade de sua função de escore de ordenar ligantes de acordo com valores experimentais de atividade. Essa correlação é feita através dos valores de escore obtidos nas simulações e os valores experimentais de atividade (VERDONK, M.L. et al., 2003).

O docking pode ser basicamente descrito como a combinação de um algoritmo de busca que se propõe a sugerir eventuais modos de ligação, com função de escore, tendo como objetivo ranquear os possíveis modos de ligação sugeridos pelo algoritmo de busca com o intuito de identificar o modo real de ligação.

Existem hoje mais de 30 diferentes programas de docking. Alguns dos mais utilizados são:

- AutoDock
- Glide
- MOE
- Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD)
- FlexX/FlexE
- DOCK
- Internal Coordinate Mechanics (ICM)

Os “softwares” de docking diferem-se na maneira de lidar com a flexibilidade da proteína e do ligante, seu algoritmo de amostragem além de sua função de escore (ZOETE, V. et al., 2009).

A partir das estruturas otimizadas dos inibidores relatados na literatura, simulações de screening virtual e docking flexível foram realizadas entre esses ligantes e a AChE, utilizando o software **GOLD v.4.1**. Os inibidores foram selecionados através de uma seleção prévia em bancos de dados que continham inibidores específicos à enzima AChE. Esta etapa de seleção foi muito importante e essencial para as análises e estudos posteriores.

O programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) (JONES et al., 1997) utiliza um algoritmo genético (GA, do inglês Genetic Algorithm) (DAVIS, 1991; HOLLAND, 1992; GOLDBERG, 1989) que se baseia numa estratégia para explorar a completa gama de flexibilidade conformacional do ligante e a flexibilidade rotacional de aceptores de hidrogênio (JONES et al., 1995, 1997; NISSINK et al., 2002; VERDONK et al., 2003). O mecanismo para encaixar o ligante no sítio ativo é baseado em ‘pontos de interação’. O programa adiciona pontos de interação a grupos que interagem através de ligações de hidrogênio na proteína e no ligante, e mapeia pontos de acceptor no ligante e pontos de doador na proteína, e vice-versa. Adicionalmente, GOLD gera pontos de interação hidrofóbicos na cavidade da proteína. O algoritmo genético otimiza ângulos diedros flexíveis do ligante, geometrias de anel do ligante, grupos hidroxilas e aminas das cadeias laterais da proteína e o mapeamento dos pontos de interação.

As orientações e conformações do “docking” (poses) são classificadas (ranqueadas) de acordo com funções de escore empíricas, baseadas em funções da mecânica molecular. Na versão 4.1 do programa GOLD existem duas funções de escore implementadas: GoldScore e ChemScore.

A base metodológica do “software” GOLD é a execução de simulações de “docking” flexível utilizando um algoritmo genético. Os parâmetros utilizados nesse algoritmo foram originalmente otimizados em relação a um grupo de 305 estruturas de complexos com coordenadas depositadas no PDB (VERDONK et al., 2003). Dentre os parâmetros disponíveis no “software”, foi utilizada uma população equivalente a 100 conformeros, 10.000 operações, 100 mutações e 100 “crossovers”. Os cálculos de “docking” foram realizados dentro de uma esfera de raio de 11 Å, tendo como centro a hidroxila da cadeia lateral do resíduo de Tyr121. A orientação de melhor escore para cada composto foi selecionada através de uma função matemática, implementada no “software” GOLD, denominada GoldScore. Com base nessa função, o “software” classifica as orientações das moléculas do banco de dados de acordo com um padrão de afinidade (escore), do ponto de vista de estabilidade energética, em relação ao sítio ligante da proteína.

A função GoldScore possui quatro componentes: energia das ligações de hidrogênio do complexo proteína-ligante, energia de van der Waals do complexo proteína-ligante, energia de van der Waals interna do ligante e energia de deformação torcional do ligante.

A função ChemScore é baseada no trabalho de Eldridge e colaboradores (ELDRIDGE et al., 1997) e estima o valor da energia livre total que ocorre na ligação proteína-ligante, como a soma de várias contribuições físicas: ligação de hidrogênio, interações metal-ligante, termos lipofílicos, termos de congelamento de ligações rotacionáveis.

3.5.1. Simulações de “screening” virtual

Uma das aplicações dos programas de “docking” ocorre em “screening” virtual de compostos de bases de dados. Neste procedimento, amplas coleções virtuais de compostos são submetidas às simulações de “docking” em um sítio ligante protéico, e os respectivos compostos são ordenados/ranqueados de acordo com suas afinidades teóricas pelo alvo

macromolecular, assim avaliado por uma determinada função de escore (SCHNEIDER et al., 2002).

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 et al., 2009). A abordagem de “screening” virtual contribui bastante no processo de desenvolvimento de fármacos, pois compostos com potencial de interação com o sítio ligante estudado podem ser futuramente investigados com maior precisão, reduzindo drasticamente o tempo de identificação de protótipos, quando comparado com as estratégias convencionais. Existem, basicamente, duas abordagens para a realização do “screening”: a baseada no ligante e baseada na estrutura do alvo molecular.

“Screening” baseado em ligante: utiliza-se esta estratégia quando a estrutura do alvo é desconhecida, e os compostos que possuem atividade contra este alvo podem ser usados para construir um modelo farmacóforico, fornecendo informações como grupos aceptores ou doadores de ligação de hidrogênio, grupos hidrofóbicos, ionizados, etc, podem se relacionar geometricamente no espaço. Esse modelo pode também ser usado para selecionar os candidatos mais promissores a partir de um banco de dados de compostos. Tal estratégia também pode ser usada como um filtro antes de aplicar um “screening” virtual baseado em estrutura, de modo que apenas 1-10% da base de dados inicial será utilizado no processo de “docking” (ZOETE et al., 2009).

“Screening” baseado em estrutura: esta estratégia consiste em utilizar um programa de “docking” molecular para determinar o modo de ligação de um composto no alvo protéico a partir um banco de dados de compostos do qual ele é selecionado. As conformações obtidas são usadas para aproximar a energia livre de ligação ou relacionadas com a afinidade do

composto. Neste trabalho foram utilizadas duas bases de dados: a ChemBridge e a ZINC. Essas bases contêm os compostos em formato sdf, os quais já foram reescritos em formato mais apropriado, mol2, contendo cargas atômicas, tipos de átomos, ordens de ligação e estruturas tridimensionais bem definidas e mais adequadas para as simulações de “screening” e propósitos gerais de modelagem molecular. Após essa preparação das bases de dados, os “screenings” virtuais baseados na estrutura da enzima foram realizados com o software **GOLD v.4.1**.

3.5.2. Rescore

Após seleção de 50 compostos mais bem ranqueados de cada base de dados, as estruturas dos compostos foram submetidas a simulações de docking flexível com o software GOLD pelo procedimento denominado “rescore”. Os parâmetros utilizados no docking de cada uma dessas moléculas com o sítio receptor do complexo 2CKM e relativos ao algoritmo genético foram diferentes dos utilizados nas simulações de “screening” virtual. Também foi diferente o número de orientações geradas com o algoritmo genético empregado. Foram selecionadas 10 orientações de maior “score” para cada composto investigado, onde cada uma delas foi analisada minuciosamente no sítio ligante do complexo 2CKM, na busca de um consenso entre orientações de uma mesma molécula, além do “score”.

3.6. Preparação da base de dados

Aos átomos das milhares de moléculas existentes na base CNS (sistema nervoso central) subcoleção da base ChemBridge foram adicionadas cargas com o auxílio do software Tsar, obtendo-se assim uma base com maior confiabilidade para cálculos de docking (e simulações em geral) do que a original. Vale ressaltar que a escolha do método empírico para

atribuição de cargas não é crítica para a qualidade do “screening” virtual, mas o uso de estruturas sem carga e não otimizadas pode levar ao insucesso na obtenção de um protótipo.

Esta biblioteca CNS é uma coleção de 56.000 compostos “drug-like” contendo propriedades de fármacos. Filtros “drug-like” aumentam a probabilidade de se planejar compostos com boa disponibilidade oral e penetração na barreira hematoencefálica (BHE).

Outra base de dados utilizada foi o ZINC (IRWIN, J. J. & SHOICHET, B. K., 2005). A ZINC contém mais de 13 milhões de compostos em formato sdf e mol2, das quais 9 milhões são de compostos disponíveis comercialmente. Essa base de dados dispõe compostos para serem utilizados no “screening” virtual por estrutura.

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. Ela é composta por 344.596 compostos.

3.7. Campos de Interação Molecular

Muitos processos biológicos são determinados por interações não-covalentes entre estruturas moleculares, como a interação de um substrato com a enzima, por exemplo. Como uma regra geral, a ligação entre fármaco e receptor somente ocorre se a energia de interação gerada superar as forças repulsivas de van der Waals. Um método para investigar as condições energéticas da aproximação entre moléculas é o da geração dos campos de interação molecular (MIF, do inglês, “molecular interaction fields”) (HÖLTJE et al., 2003b).

Estes campos descrevem a variação da energia de interação entre um alvo molecular e uma prova química gerada em uma caixa/grade (“grid”) tridimensional, a qual deve ser estabelecida em torno do alvo. As provas refletem as características químicas de um componente que poderá interagir com o alvo molecular. Através de gráficos computacionais, os MIF podem ser exibidos como contornos isoenergéticos tridimensionais. Contornos de

grande energia positiva indicam regiões nas quais a prova pode ser repelida, enquanto que grande energia negativa corresponde a regiões energeticamente favoráveis.

O cálculo dos MIF pode ser realizado utilizando-se uma variedade de programas como o **GRID** (GOODFORD, 1985), **COMFA** (CRAMER, PATTERSON, BUNCE, 1988), **HINT** (KELLOG, SEMUS, ABRAHAM, 1991) ou **ISOSTAR/SUPERSTAR** (BRUNO, COLE, LOMMERSE, 1997; VERDONK, COLE, TAYLOR, 1999; BOER et. al., 2001).

Neste trabalho foi utilizado o programa **GRID v.22** (Molecular Discovery Ltd) (GOODFORD, 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 biomacromoléculas, como as enzimas. A lista de provas é bem variada e a energia de interação é calculada em uma grade regular de pontos ao redor da molécula alvo.

As provas 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 provas simulam as características químicas de, por exemplo, um potencial sítio receptor de proteína.

No **GRID** (GOODFORD, 1985), a prova é movida sistematicamente através de arranjo regular tridimensional dos pontos da grade em torno da estrutura alvo. A cada ponto a energia de interação entre a prova e o alvo é calculada usando o somatória das energias de van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática (Equação 1):

$$E_T = E_{LJ} + E_{EL} + E_{HB} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde **E_T** representa a energia total de interação, **E_{LJ}** representa a energia de interações de van der Waals descrita pela função de Lennard-Jones, **E_{EL}** representa a energia de interação eletrostática e **E_{HB}** representa a energia de interação pela formação de ligações de hidrogênio.

Esse método permite 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 é possível sugerir importantes pontos de interação entre um receptor e um ligante.

3.8. Predições ADMET

Um fator importante a ser investigado na seleção de compostos candidatos a fármacos, além de sua potência e seletividade, é a predição das propriedades farmacocinéticas e tóxicas. O uso de ferramentas computacionais para o cálculo de propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) tem sido amplamente reconhecido, pois a determinação destas características fornecerá uma segurança adicional no desenvolvimento clínico de um novo fármaco (MUSTER et al., 2008).

A tendência atual é, portanto, estar ciente de potenciais problemas de toxicidade que possam estar presentes nestes novos candidatos a fármacos propostos, realizando uma triagem onde podemos priorizar ou descartar uma série química com base nos resultados destas predições, pois quando um destes estudos revela uma toxicidade significativa, podemos interromper o processo de otimização deste candidato, poupando, desta forma, tempo e dinheiro. Assim, ao oferecer melhores candidatos, espera-se que os projetos de descoberta de futuros fármacos terão uma maior probabilidade de sucesso na fase de desenvolvimento clínico (MERLOT, 2009).

As predições de toxicidade de compostos *in silico*, em sua maioria, são baseadas na avaliação da relação entre estrutura química e atividade biológica e podem identificar riscos potenciais à saúde humana associados aos compostos desenvolvidos. Os métodos preditivos podem ser divididos em qualitativos e quantitativos. Os sistemas qualitativos realizam previsões que podem confirmar ou descartar o tipo de risco avaliado. De forma mais

complexa, os métodos quantitativos se utilizam da aplicação de modelos matemáticos e tentam encontrar uma correlação entre estrutura química (gerada por descritores derivados de certas propriedades moleculares) e o nível de efeito biológico exercido (RIDINGS et al., 1996; SIMIN-HETTICH; ROTHFUSS; STEGER-HARTMANN, 2006).

3.8.1. DEREK

O “software” **DEREK 10.0.2** (SANDERSON, D.M. & EARNSHAW, C.G., 1991) foi utilizado na predição de toxicidade dos compostos sugeridos como potenciais ligantes da enzima AChE. O “software” dispõe de um sistema que realiza predições do ponto de vista qualitativo e, dessa forma, alertas são gerados acerca da possível ação tóxica dos compostos químicos 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 “software”. As regras “knowledge-based” presentes no “software” DEREK operam em duas linguagens diferentes. A primeira é mais simples e faz uso do número de átomos e ligações para definir o grupo toxicofórico. A segunda linguagem é mais complexa e consegue responder questões a respeito da estrutura do grupo químico analisado (RIDINGS, J.E. et al., 1996).

3.9. Predições de Atividade – PASS

O web servidor PASS foi utilizado para predizer a atividade de inibidor de proteínas quinases e atividade antineoplásica nos compostos sugeridos como potenciais ligantes da AChE.

O PASS (do inglês “Prediction of Activity Spectra for Substances”) prevê simultaneamente vários tipos de atividade biológica de substâncias “drug-like” de diferentes classes químicas, com base em suas fórmulas estruturais. Ele estima probabilidades não

apenas para o efeito farmacológico desejável, mas também para os mecanismos de ação moleculares e diferentes efeitos colaterais indesejados (FILIMONOV; POROIKOV, 1996).

A abordagem utilizada no PASS é baseada na sugestão que a atividade do composto analisado está intimamente relacionada à estrutura (*Atividade = f(estrutura)*). Assim, por comparar a estrutura de um novo composto com as estruturas bem conhecidas de substâncias biologicamente ativas, é possível estimar se este novo composto terá um efeito em particular. O espectro de atividade biológica é um conceito crucial para o PASS e que fornece os fundamentos para prever vários tipos de atividade biológica de diferentes compostos.

Dentro deste conceito, a atividade biológica é considerada uma propriedade intrínseca do composto, dependendo apenas da sua estrutura. Qualquer “componente” deste espectro de atividade biológica de um determinado composto é assumido como sendo detectável sob condições experimentais (POROIKOV et al., 2003).

As análises do PASS são organizadas considerando a similaridade e a dissimilaridade do composto analisado, fazendo comparações com outras substâncias biologicamente ativas conhecidas. As similaridades e dissimilaridades são avaliadas e utilizadas como triagem para determinar a estimativa da atividade destes compostos. São calculadas, para cada atividade avaliada, um valor de P_a (probabilidade do composto ser ativo) e um de P_i (probabilidade do composto ser inativo), os valores de P_a e P_i variam de 0,000 a 1,000, em geral $P_a + P_i < 1$, uma vez que estas probabilidades são calculadas de forma independente (POROIKOV et al., 2003). Todos os parâmetros selecionados para o “output” foram marcados: “Make result interpretation with PharmaExpert”, “Check non predicted activities” e “Calculation”, além de selecionar $P_a > 50\%$ como “Prediction Threshold”.

Todos os ligantes que foram selecionados nas simulações de “screening” virtual, após o procedimento de “rescore”, foram submetidos a esta avaliação de atividade. O web servidor está disponível através do endereço: <http://195.178.207.233/PASS/>

3.10. Seleção dos compostos

A Figura 18 sintetiza todas as etapas realizadas desde a seleção inicial dos compostos até a etapa final da seleção.

Figura 18. Etapas realizadas durante a seleção dos compostos, em duas diferentes vias (azul e vermelha).

A partir da seleção dos compostos da base de dados realizou-se um “screening” virtual utilizando o programa GOLD v.4.1 a fim de selecionar aqueles compostos que obtivessem os maiores valores de GoldScore. Foram selecionados 2000 compostos nessa etapa. A partir daí dois caminhos foram seguidos, (1) Foram selecionados 1000 compostos dos 2000 obtidos na etapa seguinte, por “screening” virtual com constraint farmacofórica, utilizando o programa Discovery Studio; esses 1000 compostos foram subsequentemente submetidos a mais um “screening” virtual no GOLD v.4.1, agora com parâmetros mais rígidos (“screening” de alta eficiência), dos quais foram selecionados 50 compostos para posteriores filtragem e rescore (vide Figura 18); (2) Os 2000 compostos que foram obtidos através da análise do GoldScore foram, por outra via, paralelamente submetidos a mais um “screening” virtual no GOLD v.4.1 (baseado em estrutura, utilizando “constraint” de “scaffold”) e foram selecionados 50 compostos por alta eficiência do GOLD (na qual são obtidas 10 orientações para cada molécula selecionada). Realizou-se, a seguir, o rescore desses 50 compostos (vide Figura 18).

Os 50 compostos de cada via selecionados para o rescore foram analisados a partir de sua sobreposição com o farmacóforo e com o “scaffold”. A partir dessa sobreposição pôde-se perceber ainda a formação de famílias de orientações consensuais.

Dos compostos que faziam parte do grupo mais sobreposto ao farmacóforo, o selecionado foi aquele que obteve o maior GoldScore. Através dessas análises, alguns compostos foram selecionados para as análises (filtragens) que serão realizadas na próxima etapa.

O passo seguinte, após a seleção final, foi a aquisição comercial dos compostos e ensaios com a acetilcolinesterase.

3.11. Procedimento experimental

Imobilização é uma palavra genérica que tem sido utilizada para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema de análise. Embora diversas tecnologias disponíveis em diferentes áreas da ciência, como a microbiologia, engenharia de proteínas e química de proteínas, possam ser utilizadas para melhorar as propriedades das enzimas, a imobilização é uma técnica conhecida há muito tempo e, recentemente, revela-se uma ferramenta poderosa para a melhoria de algumas propriedades da enzima, como por exemplo, a estabilidade, a atividade catalítica, e a seletividade (MATEO, C., 2007).

A enzima imobilizada tem mostrado diversas vantagens nos estudos enzimáticos “on line” sobre ensaios enzimáticos em solução. Estudos realizados com enzimas livres em solução geralmente têm baixa estabilidade, são inibidas por altas concentrações de substratos e produtos, e demonstra baixa atividade e seletividade para substratos não naturais em condições não-convencionais, sem mencionar que sua purificação envolve um processo difícil e caro, ao passo que estudos com enzimas imobilizadas utilizam pequenos volumes de amostras preservam a estabilidade da enzima, aumento do tempo de vida, além de sua reutilização (CARDOSO, C. L., 2009).

Um método rápido e eficiente para realizar a triagem de compostos consiste em passar as substâncias de interesse através de uma superfície na qual uma biomolécula (proteína, receptor ou enzima) esteja imobilizada. De modo geral, as substâncias que possuem maior afinidade pela biomolécula permanecem mais tempo retidas, eluindo mais tardiamente, sendo, portanto, os melhores inibidores. Esse processo cromatográfico pode ser chamado de cromatografia de afinidade analítica ou cromatografia de afinidade quantitativa ou biocromatografia (HAGE, D. S., 1997; WAINER, I. M., 1993).

Inicialmente, a cromatografia por afinidade foi utilizada no isolamento e purificação de misturas biológicas complexas, mas, ultimamente, tem se revelado uma poderosa

ferramenta para monitorar as interações ligante-proteína, substrato-proteína, inibidor-proteína e ligante-receptor (WAINER, I. W., 1993; MOADDEL, R., 2002), e tem demonstrado grandes vantagens como uma das técnicas de triagem de alta eficiência (BARTOLINI, M. C., 2007; BERTUCCHI, C., 2003; GIRELLI, A. M., 2005). Como a atividade e o metabolismo dos fármacos são mediados por diferentes tipos de interações com os alvos biológicos, a avaliação dessas interações pode elucidar o mecanismo de ação de um fármaco. A utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase estacionária biorreatores ou IMERs (do inglês: Immobilized Enzyme Reactors), permite a junção de características de ambos como: seletividade, rapidez, reprodutibilidade e ensaios não destrutivos com a especificidade e sensibilidade de uma reação enzimática. Com isso, há um grande aumento da sensibilidade em sistemas de detecção o que favorece a determinação de componentes em traços em matrizes complexas.

3.12. Imobilização da enzima acetilcolinesterase

O procedimento de imobilização e a escolha do suporte de imobilização foram baseados em trabalhos anteriormente desenvolvidos pelo grupo da Professora Doutora Carmem Lúcia Cardoso da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto/SP (CARDOSO, C. L., 2006; 2008).

A enzima foi imobilizada nas paredes internas de capilares de sílica fundida com dimensões de 30 cm x 0,1 mm D.I., utilizada como coluna acoplada ao HPLC. O monitoramento do produto da reação enzimática é feito utilizando a metodologia de Ellman (ELLMAN, G. L. et al. 1961.)

Pré-tratamento corrosivo: utilizando-se uma sering-pump, 2 mL de uma solução de HCl (2,0 mol/L) é eluída através do capilar. Em seguida passa-se 1,0 mL de água deionizada e o capilar é colocado em estufa à 95 °C durante 1 hora. O capilar sofre em seguida um

tratamento químico, a silanização. Nesse processo 1,0 mL de uma solução de 3-aminopropiltietoxissilano (APTS) (10% em água) é eluída através do capilar e este é novamente colocado em estufa a 95°C durante meia hora.

Imobilização: uma solução 1,5 mL glutaraldeído 1% em KH₂PO₄ (50 mmol/L, pH 7,4) é eluída através do capilar, em seguida 0,5 mL de solução KH₂PO₄ (50 mmol/L, pH 7,4) e 0,5 mL de solução tampão Fosfato (50 mmol/L, pH 7,4) a temperatura ambiente. A seguir 0,5 mL de solução enzimática (1.0 mg/mL) é eluída através do capilar por duas vezes e em seguida 0,5 mL de tampão de trabalho. O IMER permanece com suas extremidades imersas no tampão de trabalho a 4 °C quando não está em uso. O biorreator obtido foi denominado IMER-AChE. (Figura 19)

Figura 19. Método de imobilização em capilares de sílica fundida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise das estruturas

Através das buscas realizadas no banco de dados BindingDB foram encontrados 996 inibidores. A partir daí, a tabela com os inibidores apresentada pelo web-servidor foi ordenada pelos valores de IC_{50} (nM), de modo que os inibidores mais potentes pudessem ser conhecidos e selecionados.

Desses inibidores, 62 foram selecionados, onde o “threshold” (limiar) para a seleção foi o IC_{50} menor do que 50 μ M. Desse total, 14 possuem complexos depositados no banco de dados do PDB. O inibidor do complexo de código PDB 2CKM é um dímero bis-tacrina, sendo um dos inibidores que possuem um dos melhores valores de IC_{50} . O IC_{50} representa a concentração do composto necessária para 50% de inibição da enzima. Assim, quanto maior o pIC_{50} mais potente o composto ou o inibidor ($pIC_{50} = -\log(IC_{50})$). Na Tabela 1 abaixo estão apresentados os inibidores selecionados, os quais possuem estrutura em complexo com AChE depositada no banco de dados do PDB. Parâmetros estruturais relevantes foram selecionados para a análise teórica dos perfis de biodisponibilidade oral.

Os estudos de propriedades físico-químicas relacionadas aos parâmetros da Regra dos Cinco (RO5) de Lipinski et al. (1997) foram realizados utilizando o programa **Tsar 3.3** da Oxford Molecular, as propriedades foram calculadas para todos os inibidores selecionados, e são mostradas na tabela a seguir.

Tabela 1. Inibidores selecionados através de busca no banco de dados BindingDB, contendo estruturas depositadas no PDB, em complexo com AChE, e parâmetros da Regra dos Cinco.

Inibidor do complexo	Peso Molecular (Daltons)	Aceptores de ligação de hidrogênio	Doadores de ligação de hidrogênio	logP	Violações RO5	IC₅₀(nM)
2CKM	492,77	2	2	7,60	1	0,2
1H22	466,74	4	4	1,08	0	2,4
1W4L	530,72	5	1	2,07	1	4,0
1ACJ	198,29	1	1	2,83	0	8,2
1ODC	464,82	2	4	3,95	0	8,8
1H23	494,80	4	4	1,87	0	16
1EVE	379,54	4	0	3,69	0	19
2CMF	464,71	2	2	6,81	1	28
1GPK	242,35	2	2	-0,51	0	46,7
1UT6	325,55	2	2	4,34	0	89,4
1W6R	288,40	4	1	-0,24	0	360
2BAG	149,21	1	1	2,04	0	5120
1HBJ	410,46	2	2	4,61	0	11000
1GPN	256,38	2	2	-0,23	0	19300

Dos inibidores dos complexos na tabela acima relatados, nenhum apresentou mais de uma violação à regra. Portanto, esses inibidores cumprem as propriedades desejadas para a absorção oral, pelo menos segundo a Regra de Lipinski.

Este tipo de análise computacional tem se tornado importante na descoberta de novos protótipos em meio há um grande número de compostos, e funciona também como um filtro que direciona o estudo da relação de estrutura-atividade em direção a compostos com grande probabilidade de serem oralmente ativos. A partir dessas constatações, aplicações potenciais para esses ligantes como possíveis protótipos podem ser vislumbradas.

Na Figura 20 estão representados os 14 ligantes de cada complexo depositado no PDB. A característica mais comum da maioria desses inibidores é a capacidade de se ligarem em ambos os sítios da enzima acetilcolinesterase, sendo assim eles se tornam muito efetivos para o objetivo deste trabalho que é modelar um inibidor que tenha essa característica de atuar tanto no sítio

periférico aniônico como no sítio catalítico aniônico, pois como pudemos observar na literatura científica, os tratamentos de todos os estágios do Mal de Alzheimer se mostraram ineficazes devido à inibição apenas no sítio catalítico aniônico (KAMAU, E. 2007).

Figura 20. Inibidores dos complexos com estruturas depositadas no banco de dados do PDB.

Para os inibidores que não possuíam estrutura cristalográfica depositada no PDB, suas estruturas foram obtidas da base de dados livre do PubChem

(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), a qual contém estruturas de moléculas orgânicas pequenas e informações sobre suas atividades biológicas, estando disponibilizadas em formato 2D. Essas moléculas foram convertidas para o formato 3D utilizando-se o software CORINA, implementado no Tsar 3.3. O passo seguinte foi derivar um padrão farmacofórico comum aos inibidores encontrados.

Na Tabela 2 estão os demais inibidores encontrados através da busca feita no BindingDB e selecionados a partir dos valores de IC_{50} (nM), os quais não possuem estruturas depositadas no PDB em complexo com a AChE. Novamente as propriedades calculadas foram feitas utilizando o programa **Tsar 3.3** da Oxford Molecular.

Tabela 2. Inibidores selecionados (48) a partir dos menores valores de IC_{50} que não possuem complexos depositados no PDB. Parâmetros físico-químicos bem como da Regra dos Cinco são também aqui apresentados.

Molécula	Peso Molecular (Daltons)	Aceptores de ligação de hidrogênio	Doadores de ligação de hidrogênio	logP	Violações RO5	IC_{50} (nM)
1_1	537,58	2	3	6,42	2	0,008
1_2	567,61	3	3	6,17	2	0,04
1_3	517,17	2	3	6,30	2	0,06
1_4	561,65	2	2	8,63	2	0,07
1_5	503,14	2	3	5,90	2	0,1
1_7	503,14	2	3	5,90	2	0,2
1_8	503,14	2	3	5,90	2	0,2
1_9	478,16	2	2	4,60	0	0,25
1_10	628,75	3	2	7,47	2	0,28
1_11	504,74	4	0	5,13	2	0,3
1_12	503,14	2	3	5,90	2	0,3
1_13	575,68	2	2	9,03	2	0,3
1_14	446,54	6	1	3,67	0	0,3
1_15	594,31	3	2	6,95	2	0,32
1_16	502,66	6	1	5,31	2	0,32
1_17	593,32	2	2	8,96	2	0,33
1_18	613,73	2	2	9,08	2	0,33

Molécula	Peso Molecular (Daltons)	Aceptores de ligação de hidrogênio	Doadores de ligação de hidrogênio	logP	Violações RO5	IC₅₀(nM)
1_19	579,29	2	2	8,56	2	0,34
1_20	627,76	2	2	9,48	2	0,4
1_21	470,67	3	4	4,71	0	0,44
1_22	599,70	2	2	8,68	2	0,44
1_23	531,20	2	3	6,70	2	0,5
1_24	517,17	2	3	6,30	2	0,5
1_25	468,70	2	3	5,39	1	0,5
1_26	565,26	2	2	8,17	2	0,5
1_27	618,79	9	1	4,17	1	0,52
1_28	460,57	6	1	4,02	0	0,56
1_29	582,03	2	3	6,70	2	0,6
1_30	552,78	4	0	6,47	2	0,6
1_31	490,71	4	0	4,79	0	0,6
1_32	547,62	2	2	8,24	2	0,6
1_33	528,75	2	2	7,88	2	0,6
1_34	498,73	3	3	5,13	1	0,64
1_35	519,14	3	3	6,32	2	0,7
1_36	528,15	3	3	5,77	2	0,7
1_37	542,78	2	2	8,27	2	0,7
1_38	474,60	6	1	4,43	0	0,7
1_39	520,83	2	2	8,39	2	0,77
1_40	474,60	6	1	4,52	0	0,81
1_41	489,11	2	3	5,51	1	0,87
1_42	447,53	7	1	3,06	0	1,0
1_43	494,75	4	2	5,91	1	1,2
1_45	488,63	6	1	4,92	0	1,4
1_46	478,74	2	2	7,20	1	1,6
1_47	506,80	2	2	7,99	2	1,6
1_48	616,82	8	1	5,43	2	1,8
1_49	508,78	4	2	6,30	2	1,9

Na Figura 21, a seguir, estão representados os inibidores encontrados através da busca feita no BindingDB e que foram selecionados a partir dos menores valores de IC_{50} (nM), e sem estruturas depositadas no PDB em complexo com a AChE. São moléculas com peso molecular igual ou um pouco maior que o limite superior da Regra dos Cinco, mas que possuem a capacidade de se ligarem em ambos os sítios de ligação da enzima. Essas moléculas possuem alta atividade biológica, e a partir de uma análise minuciosa das estruturas foi possível construir um farmacóforo específico para esses ligantes encontrados.

Figura 21. Inibidores encontrados através da busca feita no BindingDB e que foram selecionados a partir dos valores de IC₅₀ (nM), sem estruturas depositadas no PDB em complexo com a AChE.

A tabela seguinte (Tabela 3) também diz respeito a esses inibidores selecionados do banco de dados BindingDB, mas agora contendo os valores ordenados por pIC_{50} (ou seja, $-\log IC_{50}$). A apresentação de dados em uma escala logarítmica pode ser útil quando estes cobrem uma grande gama de valores, pois o logaritmo reduz a representação a uma escala mais apropriada para análise, aproximando entre si os valores.

Tabela 3. Inibidores selecionados do banco de dados BindingDB apresentados com seus respectivos valores de pIC_{50} .

Molécula	pIC_{50}	Molécula	pIC_{50}	Molécula	pIC_{50}	Molécula	pIC_{50}	Molécula	pIC_{50}
1_1	5,09	1_15	3,49	1_29	3,22	1_43	2,89	1GPK	1,33
1_2	4,40	1_16	3,49	1_30	3,22	1_44	2,85	1UT6	1,05
1_3	4,22	1_17	3,48	1_31	3,22	1_45	2,85	1W6R	0,44
1_4	4,15	1_18	3,48	1_32	3,22	1_46	2,79	2BAG	-0,71
1_5	4,00	1_19	3,47	1_33	3,22	1_47	2,79	1HBJ	-1,04
2CKM	3,70	1_20	3,40	1_34	3,19	1_48	2,74	1GPN	-1,28
1_7	3,70	1_21	3,35	1_35	3,15	1_49	2,72		
1_8	3,70	1_22	3,35	1_36	3,15	1H22	2,62		
1_9	3,60	1_23	3,30	1_37	3,15	1W4L	2,39		
1_10	3,54	1_24	3,30	1_38	3,15	1ACJ	2,08		
1_11	3,52	1_25	3,30	1_39	3,11	1ODC	2,05		
1_12	3,52	1_26	3,30	1_40	3,09	1H23	1,79		
1_13	3,52	1_27	3,28	1_41	3,06	1EVE	1,72		
1_14	3,52	1_28	3,25	1_42	2,96	2CMF	1,55		

Através da análise dos valores de pIC_{50} dos compostos selecionados observa-se que o inibidor do complexo 2CKM é, entre os complexos com estrutura depositada no PDB, o inibidor mais potente. Quatro estruturas de complexos foram selecionadas para o cálculo do farmacóforo por critérios que incluem maior resolução cristalográfica, menores valores de RMSD de sobreposição dos inibidores e similaridade estrutural. Do inibidor do complexo

2CKM extraiu-se o “scaffold”, utilizado posteriormente como “constraint” em “screening” virtual.

4.1.1. Scaffold

Pelos resultados mostrados para o inibidor bis-tacrina apresentando maiores efeitos inibitórios, selecionou-se a subestrutura que advém do inibidor do complexo 2CKM.

O “scaffold” é uma subestrutura ou um fragmento ativo com características estruturais moleculares mínimas e eficientes para a interação com o sítio ligante que pode ser sistematicamente explorada para a busca em bibliotecas de compostos com propriedades “drug-like”. Utilizando o “scaffold”, a busca de novos compostos é dita ser baseada na estrutura do ligante por similaridade, onde moléculas similares são suscetíveis a ter propriedades físico-químicas similares e, portanto, podem possuir atividades biológicas similares (WALTERS, W. P. et al, 1998).

Os “screenings” virtuais realizados foram baseados na utilização de um “scaffold” como uma “constraint” (congelar/fixar). O uso dessa “constraint” foi uma estratégia de tendenciar as varreduras nas bases de dados a um padrão conhecido na sua conformação bioativa. O “scaffold” pode, por exemplo, ser um núcleo comum ou um fragmento, ou pode ser apenas uma estrutura conhecida a adotar uma determinada posição ligante.

Ao contrário do modelo de “constraint” de similaridade em que se adiciona um termo de energia para o escore com base na similaridade entre o ligante a ser docado e o modelo fornecido, essa “constraint” é imposta na fase de mapeamento no GOLD. As colocações dos ligantes são geradas usando um melhor ajuste dos mínimos quadrados com a posição dos átomos do “scaffold”, ou seja, essa “constraint” faz com que todos os átomos correspondentes dos diversos ligantes fiquem muito próximos, ou coincidentes com o “scaffold”. Na Figura 22 é apresentado o “scaffold” que foi construído com a informação

obtida a partir da geração do farmacóforo, bem como da observação dos demais inibidores relatados no BindingDB.

Figura 22. Scaffold construído a partir da análise do padrão farmacofórico obtido, bem como dos inibidores selecionados do BindingDB.

Analisando o “scaffold” pode-se concluir que os inibidores da AChE com alta atividade devem cumprir as mesmas características deste fragmento ou ter um modo de ligação similar.

Este “scaffold” foi usado como uma “constraint” para o “screening” virtual feito nas bases de dados ZINC e ChemBridge. Analisando o “scaffold” no sítio ativo da acetilcolinesterase (Figura 23) pode-se observar que este faz interações com os principais aminoácidos do sítio ativo desta enzima. Assim, acredita-se que os compostos que serão selecionados para uma próxima etapa da análise devem se orientar de modo similar ao do “scaffold” mantendo as principais interações observadas com os resíduos Trp84, Phe330, Tyr121, Tyr70 e Trp279.

Figura 23. Scaffold “farmacofórico” no sítio ativo da AChE. Destaca-se as principais interações feitas com alguns aminoácidos presentes no sítio, a saber, aqueles que fazem parte do sítio catalítico aniônico e do sítio periférico aniônico.

Estas interações observadas (e nesta posição) serviram para complementar as informações de como o potencial inibidor deve-se comportar no sítio ativo. Estas informações foram utilizadas como “constraints” nas simulações de “docking” que foram realizadas. Para finalmente poder realizar com confiabilidade o “screening” virtual baseado em estrutura, priorizamos que os compostos realizassem interações com os principais resíduos de aminoácidos de ambos os sítios da enzima, tal como está ilustrado na Figura 23.

4.1.2. Validação

Previamente às simulações de “screening” virtual, simulações de docking flexível foram realizadas para avaliar e validar o modo de ligação do inibidor no sítio ativo da acetilcolinesterase. Essa simulação é feita a fim de avaliar a precisão do encaixe e sua capacidade de prever afinidades de ligação.

Para tais simulações, utilizou-se a estrutura do complexo com estrutura depositada no PDB com o código 2CKM. O complexo de código 2CKM é de uma acetilcolinesterase de

Torpedo californica complexada com um dímero de bis-tacrina. Esse complexo foi o escolhido por demonstrar uma alta atividade biológica (IC_{50}) além de seu ligante preencher toda a região do sítio ativo do alvo e interagir com os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo da AChE de um modo comum (ou consensual) a outros diversos inibidores dessa enzima.

Inicialmente o inibidor foi extraído do complexo, e depois de adicionar hidrogênios à estrutura da enzima foi submetido à simulação. Obtidos os resultados foi possível observar que a orientação de mais alto escore obtido pelo docking flexível para este inibidor é muito similar à orientação cristalográfica.

Os resultados de um estudo de validação mostram que a maneira como o programa é executado e os resultados medidos podem afetar significativamente as conclusões. Para o “docking” da bis-tacrina, 10 soluções obtidas com o algoritmo genético foram investigadas, permitindo a cessação antecipada se o RMSD (root mean square deviation) entre as três soluções (orientações) fosse inferior a 1,5 Å.

Os valores do GoldScore obtidos com a simulação bem como os valores do RMSD são apresentados na Tabela 4 para as 10 orientações de maior escore.

Tabela 4. Valores de RMSD e GoldScore obtidos para 10 orientações de alto escore nas simulações de docking flexível com a estrutura do complexo 2CKM.

Orientações	RMSD	GoldScore
1	1,30	70,45
2	1,37	72,62
3	1,45	70,39
4	3,65	52,63
5	1,18	73,36
6	4,12	56,43
7	4,84	59,74
8	1,06	68,64
9	1,18	71,68
10	0,95	74,01

A Figura 24 mostra a orientação de maior escore sugerido pelo docking usando a função GoldScore, sobreposta à orientação cristalográfica do ligante original do complexo de código 2 CKM.

Figura 24. Sobreposição do inibidor 10 e do ligante original da estrutura cristalográfica 2CKM. Em laranja está representada a estrutura cristalográfica e em verde a do inibidor 10.

O método de docking foi assim capaz de reproduzir o modo de ligação experimental do inibidor do complexo de código 2CKM tendo sido assim validado para experimentos de “screening” virtual.

4.2. Determinação dos sítios virtuais de interação no sítio ativo da AChE.

Os sítios virtuais de interação foram calculados para a estrutura cristalográfica da proteína de dois complexos da acetilcolinesterase com dois dos mais conhecidos inibidores disponíveis no PDB, a tacrina (código PDB: 1ACJ) (HAREL, M. et al., 1993) e a galantamina (código PDB: 1QTI) (BARTOLUCCI, C. et al., 2001). Estes dois complexos foram escolhidos, apesar das

diferenças estruturais entre a tacrina e a galantamina (Figura 25), pois ambos os inibidores são capazes de interagir com o mesmo sítio ativo resultando em dois encaixes diferentes e também diferentes padrões de interação. A sobreposição entre o complexo 1ACJ e o complexo 1QTI revelou que a principal diferença observada está na conformação do resíduo de aminoácido Phe330 (Figura 25A). Esta diferença conformacional é suficiente para permitir a acomodação desses dois ligantes dissimilares (Figura 25B-25C). Em relação ao complexo 1ACJ, o resíduo Phe330 se estende para a região central do sítio ativo alinhando seu anel aromático em uma orientação paralela “face-a-face” com o resíduo de aminoácido Trp84. Estes dois resíduos flanqueiam o sistema acridina da tacrina estabilizando interações de empilhamento- π (Figura 25B). Diferentemente, no complexo 1QTI, podemos observar que o resíduo Phe330 não aponta em direção ao centro do sítio ativo, permitindo assim, o encaixe da galantamina que é mais volumosa que a tacrina (Figura 25C).

Figura 25. (A) Sobreposição entre os resíduos do sítio ativo da acetilcolinesterase do complexo 1ACJ (átomos de carbon em amarelo) e 1QTI (átomos de carbono em verde). (B) Modo de ligação da galantamina (complex 1QTI). (C) Modo de ligação da tacrina (complex 1ACJ).

Os sítios virtuais de interação foram calculados com o web-servidor Q-SiteFinder (LAURIE, A.T.R. & JACKSON, R.M., 2005) sem qualquer tipo de informação sobre a estrutura e os modos de ligação dos inibidores. A sobreposição entre os modos de ligação da tacrina e da galantamina com os campos de interação molecular calculados revelaram que estes dois inibidores exploram interações favoráveis apenas em uma região limitada do sítio de ligação, evidenciando, assim, o espaço químico que pode ser explorado para o desenvolvimento de novos potentes inibidores. As regiões de interações favoráveis, não ocupadas no espaço pelos modos de ligação da tacrina e da galantamina, podem ser exploradas para o desenvolvimento de inibidores com maior atividade, uma vez que novas interações intermoleculares (enzima-inibidor) possam ser otimizadas (Figura 26).

Figura 26. Complexo galantamina-acetilcolinesterase (A) e complexo tacrina-acetilcolinesterase (B) em fase com os sítios virtuais de interação calculados dentro do sítio ativo.

O sítio de interação adicional é predominantemente hidrofóbico e é influenciado principalmente pelos resíduos Phe331, Phe290, Tyr70, Tyr121 e Trp279. As hidroxilas dos resíduos Tyr70 e Tyr121 mostram a capacidade de interagir com grupos catiônicos e atuam também como grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio. Portanto, é concebível o

desenvolvimento de derivados e substituintes hidrofóbicos apresentando grupos catiônicos ou capazes de realizar ligações de hidrogênio com resíduos de tirosina.

4.3. Padrão farmacofórico

O sucesso da metodologia de “screening” virtual baseado em farmacóforo depende da precisão e da especificidade do farmacóforo obtido. Para isso, um farmacóforo foi construído com base em alguns compostos bioativos que eram mais similares entre si e que possuíam estruturas depositadas no PDB.

Entre os 14 complexos AChE-inibidor do PDB com a entrada da palavra-chave “acetylcholinesterase”, os inibidores dos complexos 1ODC, 2CEK, 2CKM e 1Q83 foram os selecionados para a obtenção do padrão farmacofórico. Na Figura 27 pode-se observar esses quatro inibidores e sua similaridade estrutural. As estruturas dos complexos acima relatados foram escolhidas para gerar o modelo farmacofórico baseado nas suas características químicas similares, alta resolução cristalográfica e por apresentarem um padrão estrutural que é relativamente similar aos demais inibidores da AChE de alto peso molecular (cerca de 800 Da).

Figura 27. Os 4 Inibidores utilizados para a derivação do padrão farmacofórico.

O programa utilizado para o cálculo e uso do farmacóforo foi o Discovery Studio 2.0. Este módulo inclui o novo algoritmo CAESAR para a geração rápida e de alta precisão da conformação, além dos algoritmos HipHop e HypoGen. As estruturas utilizadas pelo algoritmo HipHop são alinhadas por características químicas comuns. O algoritmo HypoGen deriva modelos com relação estrutura-atividade para um conjunto de moléculas para as quais o valor de atividade (IC_{50} ou K_i) em um determinado alvo biológico estão disponíveis. Esses algoritmos utilizam as conformações geradas para confirmar o alinhamento de grupos funcionais químicos que são comuns nas moléculas do conjunto estudado. Assim, o modelo farmacofórico foi gerado a partir das estruturas alinhadas, incorporando-se também dados de atividade biológica. O melhor modelo gerado apresentou as seguintes características químicas: um anel aromático, quatro grupos hidrofóbicos e um grupo aceptor de ligação de hidrogênio (Figura 28).

Figura 28. Modelo farmacóforo obtido para os inibidores da AChE de alto peso molecular e alta atividade biológica.

Por sobreposição desses elementos farmacofóricos aos compostos analisados, pôde-se identificar e explicar a atividade dos grupos farmacofóricos.

Em confirmação à utilização deste método de “screening” virtual baseado em farmacóforo para a busca de novos compostos em diferentes bases de dados e particularmente

citando as mesmas características químicas encontradas para as estruturas cristalográficas dos inibidores já relatados para a AChE, podemos citar o recente trabalho de Zhu Yong e colegas (Zhu Yong, et al., 2008). Em seu trabalho as estruturas cristalográficas de inibidores da AChE foram selecionadas por possuírem o mesmo mecanismo de ação. O modelo encontrado por Zhu Yong foi bastante similar ao nosso modelo farmacofórico e da mesma maneira, o modelo atua do sítio ativo duplo da enzima e foi capaz de ser usado para identificar compostos estruturalmente diversos que têm maior atividade para o tratamento do Mal de Alzheimer, baseado no método de “screening” virtual.

Esta tecnologia sofreu contínuas inovações e melhorias ao longo dos anos, e tem demonstrado um desempenho confiável na indústria farmacêutica, com mais de 100 publicações (PURUSHOTTAMACHAR, P. et al., 2007 & TAHA, M.O. et al., 2007 & AGRAFIOTIS, D.K. et al., 2007).

4.4. Seleção dos compostos

Na primeira simulação de “screening” virtual, foi selecionada apenas a orientação de maior escore para as 50 melhores estruturas filtradas pelo “software” para cada uma das coleções e/ou subcoleções de compostos. Dessa forma, os 50 melhores compostos de cada subcoleção foram submetidos a novas simulações, de maneira individual e de caráter mais refinado e criterioso, obtendo-se daí as 10 orientações de maior escore para cada estrutura em relação ao sítio ligante da enzima, do “scaffold” e do farmacóforo. Assim, houve a realização de um procedimento de “rescore”, onde algumas estruturas foram descartadas e outras apresentaram orientações com interações favoráveis. O objetivo do “rescore” foi propor um modo de ligação para os compostos selecionados.

Como resultado do “screening” virtual realizado na biblioteca de compostos do ZINC (subcoleção CNS), e após todas as etapas terem sido feitas com a seleção daqueles compostos que eram os mais bem ranqueados, obtivemos 44 compostos, sendo estes os candidatos mais

promissores. Das duas vias seguidas no “screening” virtual, desses 44 compostos, 20 foram obtidos do “screening” virtual realizado com o “scaffold” como “constraint” no programa GOLD (executado com alta eficiência), e 24 foram obtidos através do “screening” virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica.

Para as moléculas selecionadas no “screening” virtual que mostraram maior escore de interação com o sítio ligante da enzima AChE e que foram refinadas no procedimento de “rescore”, observou-se um consenso estrutural de ambos os grupos selecionados, ou seja: os 20 compostos obtidos do “screening” virtual feito com a utilização apenas do “scaffold” como “constraint” e os 24 compostos que foram obtidos através do “screening” virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica. Os 44 compostos totalizados até o presente momento mostraram orientações, nas simulações de “docking” flexível, dentro da fenda estreita considerada primordial no reconhecimento dos ligantes da enzima AChE.

O grupo dos 20 compostos selecionados após o “screening” virtual interage com os principais resíduos de aminoácidos de ambos os sítios da enzima. O grupo aceptor de ligação de hidrogênio interage com os aminoácidos que fazem parte do sítio periférico aniônico e o grupo que possui anel aromático interage com os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico aniônico. Essas mesmas condições se repetem para o grupo dos 24 compostos que foram obtidos através do “screening” virtual feito no programa Discovery Studio utilizando o modelo farmacofórico. Nas Figuras 29 e 30, pode-se observar cada grupo de compostos selecionados destacando a disposição de cada grupo nos sítios de ligação da enzima AChE (sítio catalítico aniônico e sítio periférico aniônico).

Figura 29. Sobreposição dos 24 compostos que foram obtidos através do screening virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica.

Figura 30. Sobreposição dos 20 compostos obtidos do screening virtual realizado com o “scaffold” como “constraint”.

Todos os 44 compostos orientam-se no sítio ativo da AChE de modo similar aos mais ativos relatados, assim sugerido pela análise da posição do “scaffold”, e condizem também com as características esperadas através do modelo farmacofórico construído. O objetivo de se obter compostos que interagissem em ambos os sítios da enzima, foi assim alcançado.

Como resultado do “screening” virtual realizado na biblioteca de compostos da ChemBridge (subcoleção CNS), e após todas as etapas terem sido feitas com a seleção daqueles compostos que eram os mais bem ranqueados, obtivemos 31 compostos, sendo estes os candidatos mais promissores. Das duas vias seguidas no “screening” virtual, desses 31 compostos, 12 foram obtidos do “screening” virtual realizado com o “scaffold” como “constraint” no programa GOLD (executado com alta eficiência), e 19 foram obtidos através do “screening” virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica.

O grupo dos 12 compostos selecionados após o “screening” virtual interage com os principais resíduos de aminoácidos de ambos os sítios da enzima. O grupo aceptor de ligação de hidrogênio interage com os aminoácidos que fazem parte do sítio periférico aniônico e o grupo que possui anel aromático interage com os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico aniônico. Essas mesmas condições se repetem para o grupo dos 19 compostos que foram obtidos através do screening virtual feito no programa Discovery Studio utilizando o modelo farmacofórico. Nas Figuras 31 e 32, pode-se observar cada grupo de compostos selecionados da base de compostos moleculares ChemBridge destacando a disposição de cada grupo nos sítios de ligação da enzima AChE (sítio catalítico aniônico e sítio periférico aniônico).

Figura 31. Sobreposição dos 12 compostos obtidos do screening virtual realizado com o “scaffold” como “constraint”.

Figura 32. Sobreposição dos 19 compostos que foram obtidos através do screening virtual realizado com o programa Discovery Studio e “constraint” farmacofórica.

A análise da potência inibitória em conjunto com estudos computacionais, salientou a escolha minuciosa desses compostos que interagem com ambos os sítios da enzima AChE, principalmente as ligações cátion- π e a hidrofobicidade dos ligantes do sítio ativo periférico que são importantes para alcançar uma alta afinidade de um inibidor de AChE. Pode-se destacar também que os inibidores da AChE selecionados neste trabalho atuam tanto no sítio catalítico aniônico como no sítio aniônico periférico. Estas características são estratégias farmacêuticas promissoras, pois além de estimular o sistema colinérgico também inibem a produção e agregação do peptídeo β -amilóide promovido pela AChE (MUNOZ-MURIEDAS, J. et al. 2004).

Estudos de campos de interação molecular (MIFs) foram feitos com a estrutura do complexo AChE-bis-(7)-tacrina (código PDB 2CKM) e todos os compostos selecionados de ambos os bancos de dados, ZINC e ChemBridge, usando o “software” GRID v2.2. Os potenciais eletrostáticos e de van der Waals foram calculados para energias de interação entre as provas químicas e os átomos de uma região selecionada da AChE. Por intermédio do programa DEREK realizou-se a etapa de predição de toxicidade para os compostos selecionados por “screening” virtual.

Desta maneira foi também demonstrado que “screenings” virtuais em bibliotecas de compostos podem ser eficientemente realizados através do uso combinado de buscas baseadas na estrutura do farmacóforo, “screenings” com a utilização de um “scaffold” como “constraint”, bem como análise dos melhores compostos para obter novas substâncias bioativas.

Nas próximas tabelas estão dispostos os valores de escore obtidos nas simulações de “docking” flexível (procedimento de “rescore”) e o nome IUPAC dos compostos selecionados. A comparação entre os valores de escore obtidos para os 75 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 75 compostos selecionados, os que apresentam maiores

valores de escore sejam os mais potentes. Pode-se observar, somente, que dentre os compostos selecionados os maiores valores de escore 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”.

Na Tabela 5 estão apresentados os 20 compostos selecionados por “screening” virtual no banco de dados ZINC utilizando o “scaffold” como “constraint”.

Tabela 5. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 20 compostos melhores ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ZINC, por “scaffold”.

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
1	N-(benzo[d]thiazol-2-ylmethyl)-2,5-dimethyl-1-(pyridin-3-yl)-1H-pyrrole-3-carboxamide	57,16
2	5-((3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methyl)-N-(4-fluorobenzyl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide	67,83
3	5-((3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methyl)-N-(4-methylbenzyl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide	72,58
4	2-(2-methylthiazol-4-yl)-N-(2-(5-(2-methylthiazol-4-yl)thiophen-2-yl)ethyl)acetamide	62,55
5	(R)-2-(2-benzylthiazol-4-yl)-N-(1-methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indazol-4-yl)acetamide	67,08
6	(R)-N-(6-chlorothiochroman-4-yl)-3-(2-phenylacetamido)propanamide	68,75
7	(S)-N-(4-(ethoxymethyl)benzyl)-1-(3-(methylthio)phenyl)-5-oxopyrrolidine-3-carboxamide	67,24
8	2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-N-(4-(morpholinomethyl)benzyl)acetamide	66,84
9	1-(3-((1,3-dimethyl-1H-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamido)methyl)benzyl)pyrrolidinium	61,26
10	2-(4-(2-(thiophen-2-yl)ethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)-N-(thiophen-2-ylmethyl)acetamide	66,82

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
11	(S)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)-2-(2-ethyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamide	68,68
12	(R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)propanamide	66,05
13	(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)propanamide	70,45
14	2-(4-allyl-5-cyclopropyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)-N-(2-(phenylthio)ethyl)acetamide	67,10
15	(R)-3-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-(2-(pyrrolidin-1-yl)-2-(thiophen-2-yl)ethyl)propanamide	70,68
16	N-(3-(benzyloxy)propyl)-2-(2,5-dimethyl-3-(2-methylthiazol-4-yl)-1H-pyrrol-1-yl)acetamide	77,00
17	(R)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)-2-(1H-indol-3-yl)acetamide	72,11
18	2-(2,5-dimethyl-3-(2-methylthiazol-4-yl)-1H-pyrrol-1-yl)-N-(isoquinolin-5-yl)acetamide	60,30
19	N-(4-methyl-5-(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)thiazol-2-yl)-2-(thiophen-2-ylthio)acetamide	60,26
20	1-(3-((3-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propanamido)methyl)benzyl)pyrrolidinium	73,53

Na Tabela 6 estão apresentados os 24 compostos selecionados por “screening” virtual no banco de dados ZINC, agora com a “constraint” farmacofórica.

Tabela 6. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 24 compostos melhor ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ZINC, por farmacóforo.

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
21	N-(benzo[d]thiazol-2-ylmethyl)-2,5-dimethyl-1-(pyridin-3-yl)-1H-pyrrole-3-carboxamide	57,30
22	5-((3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methyl)-N-(4-fluorobenzyl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide	66,49
23	2-(2-methylthiazol-4-yl)-N-(2-(5-(2-methylthiazol-4-yl)thiophen-2-yl)ethyl)acetamide	66,19
24	(R)-2-(2-benzylthiazol-4-yl)-N-(1-methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indazol-4-yl)acetamide	63,59
25	(R)-N-(6-chlorothiochroman-4-yl)-3-(2-phenylacetamido)propanamide	67,20
26	(S)-N-(4-(ethoxymethyl)benzyl)-1-(3-(methylthio)phenyl)-5-oxopyrrolidine-3-carboxamide	59,52
27	1-(3-((2-morpholinonicotinamido)methyl)benzyl)pyrrolidinium	52,46
28	2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-N-(4-(morpholinomethyl)benzyl)acetamide	63,22
29	1-(3-((1,3-dimethyl-1H-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamido)methyl)benzyl)pyrrolidinium	62,29
30	2-(5-fluoro-2-methyl-1H-indol-3-yl)-N-(4-(morpholinomethyl)benzyl)acetamide	70,69
31	1-(3-((2-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)methyl)benzyl)pyrrolidinium	70,93
32	(R)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)-2-(2-ethyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamide	62,68
33	(S)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)-2-(2-ethyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamide	64,08
34	(R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)propanamide	68,39

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
35	(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)propanamide	63,53
36	5-((6,7-dihydrothieno[3,2-c]pyridin-5(4H)-yl)methyl)-N-(4-methylbenzyl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide	62,59
37	2-(4-allyl-5-cyclopropyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)-N-(2-(phenylthio)ethyl)acetamide	74,56
38	(R)-3-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-(2-(pyrrolidin-1-yl)-2-(thiophen-2-yl)ethyl)propanamide	69,90
39	N-(3-(benzyloxy)propyl)-2-(2,5-dimethyl-3-(2-methylthiazol-4-yl)-1H-pyrrol-1-yl)acetamide	75,23
40	(R)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)-2-(1H-indol-3-yl)acetamide	73,13
41	(S)-N-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)-2-(1H-indol-3-yl)acetamide	65,87
42	N-(3-((1H-imidazol-1-yl)methyl)benzyl)-2-(4-methoxyphenylthio)acetamide	68,00
43	2-(2,5-dimethyl-3-(2-methylthiazol-4-yl)-1H-pyrrol-1-yl)-N-(isoquinolin-5-yl)acetamide	58,08
44	N-((5-(2-methylthiazol-4-yl)thiophen-2-yl)methyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)nicotinamide	55,84

Na Tabela 7 estão apresentados os 19 compostos selecionados por “screening” virtual no banco de dados da ChemBridge, por farmacóforo.

Tabela 7. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 19 compostos melhor ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ChemBridge, por farmacóforo.

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
45	N-(5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-9H-xanthene-9-carboxamide	61,82
46	2-(2-methoxyphenyl)-N-(4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl)acetamide	72,41
47	(S)-N-(furan-2-yl(8-hydroxyquinolin-7-yl)methyl)-2-phenylacetamide	66,88
48	1-(2,5-dimethoxybenzyl)-N-(4-methylbenzyl)piperidine-4-carboxamide	72,74
49	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methyl-5-m-tolyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetamide	77,74
50	2-((5-(benzofuran-2-yl)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)methyl)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole	72,86
51	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methyl-5-(pyridin-2-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetamide	68,47
52	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-2-(5-ethoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-ylthio)acetamide	75,51
53	N-(4-(oxazolo[4,5-b]pyridin-2-yl)benzyl)-2-phenylacetamide	68,96
54	2-phenyl-5-((5-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)methyl)-1,3,4-oxadiazole	71,43
55	(R)-2-methyl-7-((6-methylpyridin-2-ylamino)(pyridin-2-yl)methyl)quinolin-8-ol	69,25
56	2-(4-methoxyphenyl)-N-(4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl)acetamide	70,87
57	2-phenyl-5-((4-(quinoxalin-2-yl)phenoxy)methyl)-1,3,4-oxadiazole	67,48
58	2-(thiophen-2-yl)-N-(4-(5-p-tolyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl)acetamide	69,87

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
59	2-(4-chlorophenyl)-N-((3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)acetamide	77,05
60	N-(3-(4-chlorophenyl)-1,2,4-thiadiazol-5-yl)-2-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthio)acetamide	66,15
61	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(5-(4-methoxybenzyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide	75,40
62	N-(5-(4-chlorophenyl)-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-2-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthio)acetamide	69,18
63	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(5-(2-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)acetamide	71,55

Tabela 8 estão apresentados os 12 compostos selecionados por “screening” virtual no banco de dados da ChemBridge utilizando o “scaffold” como “constraint”.

Tabela 8. Nome IUPAC e valor de escore obtido pela função ChemScore nas simulações de “docking” flexível dos 12 compostos melhor ranqueados e assim selecionados nas simulações de “screening” virtual no banco de dados ChemBridge, por “scaffold”.

Compostos	Nome IUPAC	ChemScore
64	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(5-(2-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)acetamide	68,33
65	1-(indolin-1-yl)-2-(5-(4-methoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)ethanone	70,60
66	2-[[5-(2-furanyl)-1,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-pyrano[4",3":4',5']]pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-8-yl]amino]-	73,57
67	2-(thiophen-2-yl)-N-(3-(5-m-tolyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl)acetamide	71,24
68	(R)-1-(naphthalen-2-ylsulfonyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)pyrrolidine-2-carboxamide	71,29
69	N-((3-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)-2-(naphthalen-1-yl)acetamide	64,63
70	2-phenyl-5-((5-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)methyl)-1,3,4-oxadiazole	66,86
71	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methyl-5-(pyridin-2-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetamide	71,12
72	2-[(1,4,5,6,7,8-hexahydro-4-oxo[1]benzothieno[2,3-d]pyrimidin-2-yl)thio]-N-(phenylmethyl)-	70,75
73	2-(4-chlorophenyl)-N-((3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)acetamide	71,58
74	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methyl-5-m-tolyl-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetamide	74,22
75	N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(5-p-tolyl-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)acetamide	72,06

Os resultados das simulações de “docking” confirmaram a relevância do papel dos principais resíduos de aminoácidos que estão presentes no sítio catalítico aniônico e sua capacidade de interação com o sítio catalítico periférico, mostrando uma alta seletividade destes inibidores para a AChE.

Uma série de avaliações comparativas de programas de “docking”, realizados ao longo dos últimos anos, indicou que os programas, assim como o método de “docking”, são capazes de gerar formas de ligação que são similares aos já experimentalmente determinados e que já foram publicados na literatura (Zaheer-ul-Haq. et al. 2010).

4.4.1. Modos de ligação dos compostos selecionados sugeridos pelos resultados do “screening” virtual

Em vermelho está a representação em *cartoon* da enzima AChE. Os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico aniônico (Trp84 e Phe330) estão representados nas Figuras 33 a 45 em amarelo e os resíduos de aminoácidos do sítio aniônico periférico (Tyr70, Ty121 e Trp279) estão representados em azul nas Figuras 33 a 45. Os compostos selecionados nas bases de dados de compostos usados neste trabalho estão representados em formato *stick* entre os aminoácidos destacados da enzima.

Figura 33. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 1 a 6.

Figura 34. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 7 a 12.

Figura 35. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 13 a 18.

Figura 36. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 19 a 24.

Figura 37. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 25 a 30.

Figura 38. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 31 a 36.

Figura 39. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 37 a 42.

Figura 40. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 43 a 48.

Figura 41. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 49 a 54.

Figura 42. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 55 a 60.

Figura 43. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 61 a 65.

Figura 44. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 66 a 71.

Figura 45. Modos de ligação propostos por simulações de “docking” flexível para os compostos 72 a 75.

De forma geral, as análises destes 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 das bases selecionadas fazem interações do tipo “sanduíche” com resíduos aromáticos de dois aminoácidos no sítio catalítico aniônico no fundo da cavidade (Trp84 e Phe330). Quando essas interações acontecem pode ser que o ligante que esteja ali no sítio catalítico aniônico seja mais estabilizado pela interação cátion- π com o anel fenil da Phe330 (COLLETIER, Jacques-Philippe. et al. 2006). E o mesmo tipo de interação ocorre no sítio aniônico periférico, próximo à superfície da cavidade (Tyr70 e Trp279).

A presença destes modos de ligação observados para tais compostos do sítio ativo da AChE aumenta grandemente a seletividade destes inibidores para AChE sobre a BChE porque esta última enzima não possui um sítio ativo periférico.

Pôde ser observado que os compostos estendem-se do subsítio aniônico do sítio ativo, no fundo da cavidade, até o sítio aniônico periférico, no topo da cavidade via interação do tipo empilhamento com resíduos aromáticos ácidos. Estes compostos não interagem diretamente com os resíduos de aminoácidos da tríade catalítica (Ser200, His440 e Glu327), e assim sugere-se que esta interação ocorra de maneira indireta por moléculas solventes (KRYGER, G. et al. 1998).

Próximo ao fundo da cavidade, aqueles compostos que possuem um anel benzeno têm uma das faces do anel demonstrando um clássico empilhamento paralelo π - π com os seis membros do anel de Trp84, ocupando, assim, o sítio de ligação para ligantes quaternários, como ocorre com o substrato natural da enzima, a acetilcolina. Outra interação que ocorre entre os compostos e a enzima é a interação com a Phe330. Sugere-se que esta interação deva servir como uma ligação quaternária adicional no sítio de ligação quaternário (KRYGER, G. et al., 1998). Este tipo de interação se assemelha à interação feita com um fármaco já comercializado para o Mal de Alzheimer, o Aricept[®].

4.5. Campos de Interação Molecular

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

Os campos de interação molecular foram gerados utilizando-se o programa **GRID**, a estrutura da AChE e grupos químicos específicos (as provas). Com a aplicação deste programa foram inspecionadas as possibilidades de interação na cavidade de ligação. Os cálculos foram realizados dentro de uma região selecionada (o sítio ativo), o qual foi posicionado dentro de uma caixa (o grid). Os mapas calculados no GRID, obtidos com uma variedade de grupos de prova, foram vistos sobrepostos na estrutura cristalográfica da AChE. Utilizou-se a estrutura da AChE (código PDB: 2CKM) e quatro grupos químicos de prova

diferentes: Carbono aromático, Hidrofóbico (DRY), Oxigênio de carbonila e grupos Halogênios (F e Cl). 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. São as seguintes características gerais:

- Como todos os compostos selecionados apresentam anéis aromáticos em sua estrutura, um dos grupos de prova analisado foi o Carbono aromático, que é um grupo de prova hidrofóbico mais específico que 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.
- O grupo de prova Oxigênio de carbonila representa regiões favoráveis à presença de fragmentos de ligantes que apresentam átomos de oxigênio capazes de agir como aceptores de ligação de hidrogênio.
- Um grupo de prova foi testado para cada um dos halogênios identificados nos compostos selecionados: F e Cl. Este tipo de prova investiga as regiões mais favoráveis ao posicionamento de halogênios no sítio receptor da proteína.

Assim sendo, campos de interação molecular foram calculados para todos os compostos selecionados. Esta foi uma etapa crucial para a seleção daqueles compostos que posteriormente foram comprados para realização dos ensaios de atividade biológica.

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.

As possibilidades de interação hidrofóbica dos inibidores foram analisadas calculando os campos de interação molecular obtidos com o grupo de prova DRY. Existem duas regiões principais no sítio de ligação onde o programa GRID detectou interações hidrofóbicas favoráveis, ambas as regiões podem ser ocupadas por fragmentos alifáticos ou aromáticos.

As estruturas lineares dos compostos com melhor escore e que se sobrepunham aos campos de interação molecular estão presentes na Figura 46.

Composto 2

Composto 5

Composto 6

Composto 10

Composto 13

Composto 16

Composto 34

Composto 40

Composto 46

Composto 49

Composto 50

Composto 59

Composto 61

Composto 70

Composto 72

Figura 46. Compostos selecionados para aquisição comercial que se sobrepuseram a, pelo menos, dois grupos de provas dos quatro grupos testados.

Nas Figuras 47 a 61, abaixo, estão apresentadas somente as regiões que apresentaram interação, porém todos os grupos de prova foram adequadamente testados.

Figura 47. Campos de interação molecular calculados para o Composto 2 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom), contorno de energia a -3,0 kcal/mol e Flúor (em vermelho), contorno de energia a -4,0 kcal/mol.

Figura 48. Campos de interação molecular calculados para o Composto 5 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 49. Campos de interação molecular calculados para o Composto 6 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a $-3,8$ kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a $-3,0$ kcal/mol.

Figura 50. Campos de interação molecular calculados para o Composto 10 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a $-3,8$ kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a $-3,0$ kcal/mol.

Figura 51. Campos de interação molecular calculados para o Composto 13 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a $-3,8$ kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a $-3,0$ kcal/mol.

Figura 52. Campos de interação molecular calculados para o Composto 16 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 53. Campos de interação molecular calculados para o Composto 34 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 54. Campos de interação molecular calculados para o Composto 40 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 55. Campos de interação molecular calculados para o Composto 46 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 56. Campos de interação molecular calculados para o Composto 49 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 57. Campos de interação molecular calculados para o Composto 50 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 58. Campos de interação molecular calculados para o Composto 59 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; Cloro (em laranja), contorno -6.5 kcal/mol e DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 59. Campos de interação molecular calculados para o Composto 61 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a -3,8 kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a -3,0 kcal/mol.

Figura 60. Campos de interação molecular calculados para o Composto 70 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a $-3,8$ kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a $-3,0$ kcal/mol.

Figura 61. Campos de interação molecular calculados para o Composto 72 são visualizados com os seguintes grupos de provas: Carbono aromático (em amarelo), contorno de energia a $-3,8$ kcal/mol; DRY (hidrofóbico, em marrom) contorno de energia a $-3,0$ kcal/mol.

O programa GRID foi utilizado como uma abordagem para prever ligações não-covalentes entre a enzima e um pequeno grupo de prova que representa as características químicas de um ligante (SIPPL, W. et al., 2001). Os compostos selecionados nesta etapa mostraram ter potenciais características de interação com a estrutura da enzima baseado no estudo dos campos gerados pelo programa, mostrando as possibilidades de interação na cavidade de ligação.

4.6. Propriedades físico-químicas

Estudos de propriedades físico-químicas relacionadas aos parâmetros da Regra dos Cinco (RO5) de Lipinski et al. (1997) foram realizados utilizando o programa **Tsar 3.3** da Oxford Molecular, foram calculadas para todos os 15 compostos selecionados, e são mostradas na Tabela 15.

Segundo a Regra dos Cinco (RO5), a maioria dos fármacos que apresentam biodisponibilidade por via oral deve satisfazer ao menos três dos seguintes parâmetros:

- Peso molecular menor do que 500 daltons;
- LogP menor do que 5 (parâmetro ligado à lipofilicidade);
- Máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio;
- Máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio.

A regra preconiza que baixa absorção ou permeação é mais provável se houver violação por dois ou mais parâmetros, com exceção para antibióticos, antifúngicos e substratos de transportadores (que apresentam peso molecular > 500, log P > 5, aceptores de ligação de hidrogênio > 10).

Os dados para avaliação da Regra dos Cinco (RO5), de todas as moléculas selecionadas, podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Propriedades físico-químicas relacionadas à Regra dos Cinco para os compostos selecionados por “screening” virtual.

Compostos	Peso molecular	Nº receptores de lig. de H	Nº doadores de lig. de H	LogP	Violações
2	382,49	4	1	3,49	0
5	366,52	3	1	2,74	0
6	388,94	2	2	2,49	0
10	364,53	3	1	1,67	0
13	378,52	4	1	1,75	0
16	397,58	3	1	2,68	0
34	378,52	4	1	1,75	0
40	363,50	3	2	2,31	0
46	385,45	5	1	4,32	0
49	395,53	4	1	4,12	0
50	389,46	6	0	4,39	0
59	387,85	6	1	3,11	0
61	399,50	6	1	2,92	0
70	335,41	5	1	4,43	0
72	385,53	3	2	2,91	0

A análise detalhada dos quinze compostos selecionados mostrou que todos satisfazem a “Regra dos Cinco” de Lipinski.

Os filtros ADMET são muito usados para análise de novos compostos terapêuticos, pois fracas propriedades farmacocinéticas são uma das principais razões para a rescisão do desenvolvimento dos candidatos a fármacos. As propriedades físico-químicas computadorizadas associadas com compostos que tenham boa biodisponibilidade, pouca ou

nenhuma toxicidade, como será discutido posteriormente, e que possuam a capacidade de penetrar na barreira hematoencefálica são filtros decisivos para a descoberta de potenciais fármacos (GUPTA, S. & GOPI MOHAN, C. 2010).

4.7. Predição de toxicidade – DEREK

Predição *in silico* de toxicidade foi realizado no desenvolvimento do fármaco para evitar o estudo experimental de substâncias potencialmente nocivas. O sistema especialista DEREK aqui utilizado é capaz de prever carcinogenicidade, mutagenicidade e sensibilização da pele, e indica a probabilidade de um composto que possui efeitos tóxicos, como a classificação em uma das seis categorias, a saber, certo, provável, plausível, implausível, improvável ou impossível (DEARDEN, J.C., et al., 1997).

Somente as categorias "certo" e "provável" preditas para um composto em particular são considerados como uma razão para interromper o estudo mais aprofundado. Por intermédio do programa **DEREK** realizou-se a etapa de predição de efeito tóxico para os 15 compostos selecionados por “screening” virtual. Com base nos resultados da previsão, nenhum efeito tóxico foi indicado para os 15 compostos selecionados.

4.8. Ensaios de atividade enzimática da AChE com potenciais inibidores

Os ensaios biológicos dos protótipos selecionados e otimizados no presente estudo foram realizados objetivando a avaliação e a quantificação da atividade dos compostos considerados promissores e planejados *in silico*. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais do departamento de Química FFCLRP/USP, sob supervisão da Profa. Dra. Carmem Lúcia Cardoso.

A utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tendo como fase estacionária biorreatores ou IMER (Immobilized enzyme reactors) pode ser

chamado de cromatografia de afinidade analítica ou cromatografia de afinidade quantitativa ou biocromatografia. Esse processo cromatográfico fornece seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima, além da reprodutibilidade obtida através da combinação da especificidade e da sensibilidade de uma reação enzimática. Assim, com a sensibilidade de detecção sensivelmente aumentada o IMER pode ser usado para isolar e/ou identificar compostos biologicamente ativos em misturas complexas. A enzima AChE será imobilizada em capilares de sílica fundida com imensões de 50 cm x 0,1 mm D.I. pelo método de imobilização pelo agente homobifuncional amino-reativo, o glutaraldeído. A atividade enzimática da AChE foi avaliada pelo método colorimétrico modificado de Ellman. Este método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da (AChE), a acetiltiocolina. A tiocolina reage com o chamado Reagente de Ellman (Esquema 1) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo (II) com intensa absorção em 412 nm.

Esquema 1. Reações envolvidas no método empregado para monitorar a atividade da AChE imobilizada.

O processo de imobilização de enzimas é de grande interesse na descoberta de novos fármacos. Considerando os altos custos e as dificuldades relativas à purificação de enzimas, esta técnica representa um caminho útil para preservar a atividade da enzima para um grande número de ensaios de atividade. Este método é um importante avanço para o “screening” de produtos sintéticos e naturais na busca por novas substâncias bioativas (CARDOSO, C. L. et al. 2008).

4.8.1. Imobilização da enzima acetilcolinesterase

A imobilização foi realizada via ligação covalente usando como agente espaçador o glutaraldeído, um agente homobifuncional amino-reativo. Em uma primeira etapa o capilar sofre um pré-tratamento corrosivo. Utilizando-se de uma bomba seringa, 2 mL de uma solução de HCl (2,0 mol/L) foi eluída através do capilar. Em seguida passou-se 1,0 mL de água deionizada e o capilar foi colocado em estufa à 95 °C durante 1 hora. A corrosão das paredes internas do capilar aumenta a área superficial o que poderá acontecer próximo a um fator de 1000, removendo impurezas das paredes internas e assim aumentando a reprodutibilidade (CIFUENTES, A., 1998).

O capilar sofreu em seguida um tratamento químico, a silanização. Através de uma reação de substituição nucleofílica com os grupos silanóis da parede do capilar os grupos aminopropil se ligam à superfície do capilar. O agente espaçador glutaraldeído foi utilizado a fim de reagir com o grupo amino do APTS no interior do capilar, e permitir a ligação da enzima através dos grupos NH_2 dos resíduos de Lisina e o resíduo aldeído. Esse espaçador é necessário para preservar certa mobilidade à enzima imobilizada mantendo certa distância entre a biomolécula e as paredes do capilar. Para evitar a polimerização do glutaraldeído, passou-se imediatamente após 1,0 mL de solução de tampão fosfato. Por último a solução enzimática foi eluída através do capilar utilizando-se uma a bomba seringa.

4.8.2. Avaliação da produção de tiocolina pelo IMER-AChE

Os ensaios de atividade foram feitos de acordo com o método previamente descrito e modificado de Ellman (ELLMAN, G. L., 1961). Tal método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetilcolina (Esquema 2). A tiocolina gerada reage com o chamado Reagente de

Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico] (DTNB)(I) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo(II) com intensa absorção em 412nm.

Esquema 2. Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

O IMER-AChE recém preparado foi utilizado como coluna cromatográfica e acoplado diretamente ao sistema de detecção de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A atividade enzimática foi avaliada pela observação de uma banda cromatográfica formada quando alíquotas de 10µL contendo o substrato acetiltiocolina (ACh) preparada na concentração 1mM foram injetadas em fluxo, que corresponde ao ânion amarelo formado a 412 nm. Conforme observado (Figura 62) a atividade enzimática foi mantida após a imobilização mostrando a eficiência do método de imobilização utilizado na preparação dos biorreatores.

Figura 62. Cromatograma correspondente ao ânion amarelo formado no monitoramento da atividade enzimática. Fase móvel: Tampão TRIS-HCl (0,1M, pH 8,0), reagente de Ellman (0,126mM). Vazão 50 μ L/min, λ = 412nm.

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a equação: (% de inibição = $1 - [V_i - V_0] \times 100$). O cromatograma abaixo (Figura 63) representa a diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença do inibidor padrão, a tacrina.

Figura 63. Cromatograma representando a diminuição da banda de absorção na presença do inibidor Tacrina 200 μ M.

Dos 15 compostos selecionados de ambas as bases de dados, sete foram adquiridos comercialmente e os ensaios dos três primeiros compostos (2, 5 e 40) já foram realizados.

Os ensaios comparativos foram realizados a fim de confirmar os resultados obtidos no biorreator e nesses ensaios as amostras dos compostos 2, 5 e 40 não apresentaram atividade biológica.

Na Tabela 10 a seguir é apresentada a inibição dos compostos testados no biorreator IMER-AChE na concentração de 200 μ M.

Tabela 10. Porcentagem de inibição dos compostos testados no biorreator IMER-AChE na concentração de 200 μ M.

<i>Compostos (200 μM)</i>	<i>IMER AChE - % de inibição</i>
Tacrina (inibidor padrão)	93,1
Galantamina (inibidor padrão)	75,1
2	0
5	0
40	0

* Os compostos que apresentam inibição maior ou igual que 50% são selecionados para determinar IC₅₀.

5. CONCLUSÕES

As pesquisas recentes têm demonstrado grande interesse em relação à enzima AChE, não só devido a sua alta eficiência catalítica, mas também devido a sua ampla implicação de inibição que está relacionada na saúde humana. A busca por novos inibidores em bancos de compostos diversos tem se concentrado naqueles ligantes que se liguem simultaneamente nos dois sítios de ligação da AChE, busca-se também inibidores que sejam reversíveis mais potentes e inibidores mais seletivos favoráveis a AChE do que para a BChE. Com o progresso e a rapidez na descoberta de novos alvos moleculares terapêuticos, faz-se de importância primordial a proposição destes novos candidatos a fármacos, sempre visando maior especificidade e eficácia.

A pesquisa de elaboração de um novo fármaco abrange diversas disciplinas unidas por um objetivo comum, ou seja, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Hoje, o emprego da abordagem de planejamento racional de fármacos pode significar a maximização da atividade desejada do fármaco dentro de determinados limites estruturais. Neste contexto, o uso de metodologias computacionais tem se tornado cada vez mais importante e difundido. Algumas dessas metodologias computacionais foram amplamente exploradas neste trabalho, com sucesso.

A aplicação da química computacional tem oferecido um excelente suporte para o desenvolvimento de novos fármacos. Com o poder computacional e a tecnologia disponível atualmente, pode ser realizado um direcionamento nos estudos, facilitado pela capacidade de predição virtual de interações e propriedades. As técnicas de química computacional, aliadas à bioinformática, permitem uma análise criteriosa do alvo terapêutico a ser estudado.

Realizou-se uma extensa análise envolvendo as estruturas da acetilcolinesterase depositadas no PDB bem como a de seus inibidores relatados na literatura e nos bancos de

dados como o BindingDB. Este extenso levantamento bibliográfico foi realizado na primeira fase deste trabalho, com o intuito de identificar aspectos estruturais e funcionais relevantes da enzima AChE, procurando-se um paralelo que pudesse contribuir para um melhor entendimento dessa proteína e, a partir daí, planejar novos inibidores. O BindingDB mostrou ser um repositório seguro e eficiente de estruturas e atividades biológicas e um banco de dados de inibidores fácil de se explorar. Após a conclusão do levantamento bibliográfico, que continua a ser atualizado constantemente, iniciamos a utilização das técnicas de bioinformática, que foram de extrema importância em uma segunda fase desse estudo. Através da análise das interações feitas entre os inibidores da AChE, foi possível fazer uma análise mais restrita dos compostos selecionados.

Após obtermos um número considerável de inibidores já relatados na literatura científica e de outros encontrados através de buscas em bancos de dados de proteínas, uma abordagem baseada nestes ligantes foi empregada. Foi realizada a geração de um farmacóforo que envolveu a análise de características estruturais dos ligantes conhecidos para a derivação de um padrão farmacofórico comum a uma série de compostos ativos. Desta forma, a determinação do padrão farmacofórico de inibidores da AChE foi avaliada com sucesso, e os métodos empregados foram adequados.

Pode-se destacar também a identificação de possíveis subestruturas ativas, capazes de realizar interações com o sítio ligante da proteína, onde estas subestruturas são conhecidas como “scaffold”. O “scaffold” foi utilizado no processo de “screening” virtual para buscas em bases de dados de compostos contendo propriedades de fármacos. O “scaffold” gerado contemplou em sua estrutura as mesmas características funcionais propostas pelo padrão farmacofórico.

Os métodos de “docking” e “screening” virtual foram integrados para melhorar o processo de seleção de possíveis inibidores, e resultou em 75 compostos. As simulações de

“screening” virtual foram realizadas com as seguintes bases de dados: ChemBridge e ZINC. Todas essas bases de dados apresentam compostos ativos, fármacos, produtos naturais e moléculas com propriedades “drug-like” validadas *in silico*. O número de compostos presentes nas bases de dados e utilizados nas simulações é de aproximadamente um milhão. Com os resultados dos estudos de “docking” foi realizada uma avaliação dos modos de ligação dos 75 compostos selecionados e obteve-se uma visão mais detalhada para a possível interação fármaco-receptor.

A geometria da cavidade do sítio ativo da AChE, com específicos sítios em suas duas extremidades, faz esse complexo ser, particularmente, um alvo adequado para aplicação dessas abordagens. Por causa da presença de resíduos aromáticos e por serem eles os principais elementos no sítio aniônico periférico da enzima e que estão em falta na BChE, pudemos direcionar nossas buscas naqueles ligantes que tinham características bivalentes demonstrando, assim, uma alta seletividade para a AChE.

O sucesso na busca de novos compostos para a AChE como alvo deve-se também a alta afinidade resultante da interação destes compostos com os resíduos aromáticos envolvidos no reconhecimento da acetilcolina no fundo da cavidade, o Trp84; com um segundo resíduo aromático no meio da cavidade, a Phe330 e com um terceiro resíduo, o Trp279 que é parte do sítio aniônico periférico no topo da cavidade. A Phe330 e o Trp279 estão ausentes na BChE, isso mostra a seletividade por ligantes que interajam com esses dois resíduos.

Dos 75 compostos selecionados, 15 apresentaram átomos ou grupamentos nas posições sugeridas pelos cálculos dos campos de interação molecular (MIF) em relação à pelo menos dois dos quatro grupos químicos de prova analisados. Assim, em relação aos MIFs, os compostos apresentados se mostraram como sendo potenciais, do ponto de vista energético, de realizar interações com os resíduos da proteína AChE.

A análise apresentada em relação à toxicidade, realizada através do programa DEREK e com base nos resultados da previsão, nenhum efeito tóxico foi indicado para os 15 compostos selecionados e nenhum composto foi assim excluído para a execução da próxima etapa.

Os sete primeiros compostos foram adquiridos comercialmente dos 15 compostos selecionados através do “screening” virtual e desses já obtivemos o resultado para três deles. Os ensaios biológicos dos protótipos selecionados e otimizados no presente estudo foram realizados objetivando a avaliação e a quantificação da atividade dos compostos considerados promissores e planejados *in silico*. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais do departamento de Química FFCLRP/USP, sob supervisão da Profa. Dra. Carmem Lúcia Cardoso.

A perspectiva imediata deste trabalho é continuar os ensaios biológicos com os próximos compostos selecionados e sugerir modificações estruturais nos compostos, para isso serão utilizados os softwares GRID, LUDI e SHOP. Paralelamente, outro tipo de “docking”, agora tendenciado ao padrão farmacofórico comum aos inibidores da AChE, será também realizado com o software Discovery Studio.

Finalmente em metodologias de “screening” virtual, uma diferente via de varredura e seleção de novos potenciais protótipos será complementada pela geração de uma biblioteca de confôrmeros das bases de dados que serão utilizadas. Utilizando o software OMEGA, obtido por licença junto ao grupo do Prof. Tudor Oprea, da University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, New Mexico, USA, com os parâmetros otimizados em vista à reprodução de conformações bioativas, até 100 confôrmeros serão geradas por molécula de cada uma das bases de dados utilizadas. A essa nova base de dados de confôrmeros serão computados diferentes descritores 2D e 3D baseados nos inibidores cristalográficos, de modo a selecionar os compostos mais similares, em potenciais

conformações bioativas. Em complemento, os softwares ROCS e EON serão utilizados para “screening” por similaridade de forma e eletrostática, respectivamente, além de ajudar na otimização de compostos selecionados nas diferentes vias de “screening”, por “lead-hopping”.

Após ensaios com a enzima AChE, modificações sintéticas poderão então ser propostas para serem realizadas em futuros trabalhos, tendo como base as estruturas sugeridas por modelagem molecular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAFIOTIS, D.K., et al., Conformational Sampling of Bioactive Molecules: A Comparative Study, *J. Chem. Inf. Model.* (2007), 47(3), 1067-86.

Alzheimer's association – (http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_figures.asp)

Alzheimer's Association, 2010 Alzheimer's Disease Facts and Figures, Alzheimer's & Dementia, Volume 6.

Alzheimer's Association, 2009 Alzheimer's Disease Facts and Figures, to be published in Alzheimer's & Dementia, Volume 5, Issue 3.

BAR-ON, P.; MILLARD, C. B.; HAREL, M.; DVIR, H.; ENZ, A.; SUSSMAN, J. L.; SILMAN, I. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry* (2002), 41(11), 3555-3564.

BARRIL, X.; GELPI, J. L.; LÓPEZ, J. M.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. How accurate can molecular dynamics/linear response and Poisson-Boltzmann/solvent accessible surface calculations be for predicting relative binding affinities? Acetylcholinesterase huprine inhibitors as a test case. *Theoretical Chemistry Accounts.* (2001), 106, 2-9.

BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V. Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor. *Journal Chromatography A.* 1144(1):102, 2007.

BARTOLUCCI, C.; PEROLA, E.; PILGER, C.; FELS, G.; LAMBA, D. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* (2001), 42(2), 182-191.

BERTUCCI, C.; BARTOLINI, M.; GOTTI, R. & ANDRISANO, V. Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal Chromatography B.* 797: 111, 1999.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* (1991), 82(4), 239-59.

BUREAU, R.; DAVEU, C.; LEMAITRE, S.; DAUPHIN, F.; LANDELLE, H.; LANCELOT, JEAN-CHARLES; RAULT, S. Molecular Design Based on 3D-Pharmacophore. Application

to 5-HT₄ Receptor. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* (2002), 42(4), 962-967.

CAMPS, P.; EL ACHAB, R.; MORRAL, J.; MUNOZ-TORRERO, D.; BADIA, A.; BANOS, J. E.; VIVAS, N. M.; BARRIL, X.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), 43(24), 4657-4666.

CARDOSO, C. L.; LIMA, V.V.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; WAINER, I.W.; MOADDEL, R.; CASS, Q. B. Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *Journal Chromatography A* 1120(1-2): 151, 2006.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, 32(1): 175, 2009.

CIFUENTES, A.; CANALEJAS, P.; ORTEGA, A. & DIEZ-MAS, J. C. Treatments of fused-silica capillaries and their influence on the electrophoretic characteristics of these columns before and after coating. *Journal Chromatography A*, 823: 561, 1998.

CODDING, P. W. Structure-Based Drug Design: Experimental and Computational Approaches. [In: NATO ASI Ser., Ser. E, 1998; 352]. (1998), 289 pp.

COLLETIER, Jacques-Philippe; FOURNIER, D.; GREENBLATT, H. M.; STOJAN, J.; SUSSMAN, J. L.; ZACCAI, G.; SILMAN, I.; WEIK, M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO Journal* (2006), 25(12), 2746-2756.

DAVIS, L.D. *Handbook of Genetic Algorithms*, Van Nostrand Reinhold, New York 1991.

DEARDEN, J. C.; BARRATT, M. D.; BENIGNI, R.; BRISTOL, D. W.; COMBES, R. D.; CRONIN, M. T. D.; JUDSON, P. N.; PAYNE, M. P.; RICHARD, A. M.; TICHY, M.; WORTH, A. P.; YOURICK, J. J. The development and validation of expert systems for predicting toxicity. *ATLA* (1997), 25, 223-252.

DVIR, H.; JIANG, H. L.; WONG, D. M.; HAREL, M.; CHETRIT, M.; HE, X. C.; JIN, G. Y.; YU, G. L.; TANG, X. C.; SILMAN, I.; BAI, D. L.; SUSSMAN, J. L. X-ray Structures of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Complexed with (+)-Huperzine A and (-)-Huperzine B: Structural Evidence for an Active Site Rearrangement. *Biochemistry* (2002), 41(35), 10810-10818.

ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, R. R.; PAOLINI, G. V.; MEE, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comp.-Aided Molec. Des.*, v. 11, p. 425-445, 1997.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE, R. M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88, 1961.

FILIMONOV, D. A.; POROIKOV, V. V. PASS: computerized prediction of biological activity spectra for chemical substances. *Bioactive Compound Design* (1996), 47-56.

FRADERA, X.; De LA CRUZ, X.; SILVA, C. H. T. P.; GELPI, J. L.; LUQUE, F. J.; OROZCO, M. Ligand-induced changes in the binding sites of proteins. *Bioinformatics*. (2002), 18, 939-948.

GIACOBINI, E. Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy. *Journal of Physiology (Paris)* (1998), 92(3-4), 283-287.

GILSON, M.; SHARP, K.; HONIG, B. J. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: method and error assessment. *Journal of Computational Chemistry*. (1988), 9(4), 327-335.

GIRELLI, A. M.; & MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*. 819(1): 3, 2005.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1984), 120(3), 885-90.

GOLDBERG, D.E. *Genetic Algorithms in Search Optimization and Machine Learning*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1989.

GOMEZ-ISLA, T.; HOLLISTER, R.; WEST, H.; MUI, S.; GROWDON, J. H.; PETERSEN, R. C.; PARISI, J. E.; HYMAN, B. T. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* (1997), 41(1), 17-24.

GOODFORD, P. J. A Computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*. (1985), 28(7), 849-857.

GREENBLATT, H. M.; DVIR, H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase. A multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* (2003), 20(3), 369-383.

GREENBLATT, H. M.; KRYGER, G.; LEWIS, T.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters* (1999), 463(3), 321-326.

GRINGAUZ, A. *Introduction to Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, New York, 1997.

GUILLOZET, A. L.; SMILEY, J. F.; MASH, D. C.; MESULAM, M. M. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of neurology* (1997), 42(6), 909-18.

GUPTA, S.; Gopi Mohan, C. 3D - pharmacophore model based virtual screening to identify dual - binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research* (2010).

GUPTA, S.; GOPI MOHAN, C. 3D-Pharmacophore Model based Virtual Screening to Identify Dual-Binding Site and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, (2010), (In press).

HAGE, D. S.; TWEED, S. A. Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions. *Journal Chromatography B*. 699: 499, 1997.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1993), 90(19), 9031-5.

HOLLAND, J.H. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, MIT Press, Cambridge, MA, 1992.

HÖLTJE, H. -D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. In: *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003a, p. 87-143.

INESTROSA, N. C.; ALVAREZ, A.; DINAMARCA, M. C.; PEREZ-ACLE, T.; COLOMBRES, M. Acetylcholinesterase-amyloid- β -peptide interaction: Effect of congo red and the role of the Wnt pathway. *Current Alzheimer Research* (2005), 2(3), 301-306.

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

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* (2005), 45(1), 177-182.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.*, v. 267, p. 727-48, 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C. Molecular recognition of a receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology* (1995), 245(1), 43-53.

KAMAU, E.; MUSTATA, G. Pharmacophore model development for the identification of novel acetylcholinesterase inhibitors. *ccbb.pitt.edu* (2007).

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* (2004), 3(11), 935-949.

KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Journal of physiology, Paris* (1998), 92(3-4), 191-4.

LAURIE, A.T.; JACKSON, R.M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics* (2005), 21(9), 1908-1916.

LENGAUER, T.; LEMMEN, C.; RAREY, M.; ZIMMERMANN, M. Novel technologies for virtual screening. *Drug Discovery Today* (2004), 9(1), 27-34.

LENGAUER, T.; Rarey, M. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology* (1996), 6(3), 402-406.

LIU, T.; LIN, Y.; 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. 198-201, 2007.

MACKENZIE, I. R. Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging. *Acta neuropathologica* (1994), 87(5), 520-5.

MARTOCCHIA, A.; FALASCHI, P. Current strategies of therapy in Alzheimer's disease. *Open Neuropsychopharmacology Journal* (2008), 1 19-23

MARY, A.; RENKO, D. Z.; GUILLOU, C.; THAL, C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. *Bioorganic & medicinal chemistry* (1998), 6(10), 1835-50.

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J. M. AND FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6): 1451, 2007.

MERLOT, C. Computational toxicology—a tool for early safety evaluation. *Drug Discov. Today*, p. 1-7, 2009.

MOADDEL, R.; LU, L. L.; BAYMAN, M.; WAINER, I. W.; J. Immobilized receptor and transporter based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: a mini-review. *Journal of Chromatography B*. 768(1): 41, 2002.

MUNOZ D. G.; FELDMAN, H. Causes of Alzheimer's disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* (2000), 162(1), 65-72.

MUNOZ-MURIEDAS, J.; LOPEZ, J. M.; OROZCO, MODESTO; LUQUE, F. JAVIER Molecular modelling approaches to the design of acetylcholinesterase inhibitors: New challenges for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design* (2004), 10(25), 3131-3140.

MUSTER, W.; BREIDENBACH, A.; FISCHER, H.; KIRCHNER, S.; MÜLLER, L. e PÄHLER, A. Computational toxicology in drug development. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 7-8, p. 303-310, 2008.

NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* (2002), 49(4), 457-471.

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

POIRIER, J.; DELISLE, MARIE-CLAUDE; QUIRION, R.; AUBERT, I.; FARLOW, M.; LAHIRI, D.; HUI, S.; BERTRAND, P.; NALBANTOGLU, J. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1995), 92(26), 12260-4

POROIKOV, V. V.; FILIMONOV, D. A. How to acquire new biological activities in old compounds by computer prediction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (2003), Volume Date 2002, 16(11), 819-824.

PURUSHOTTAMACHAR P., et al., First pharmacophore-based identification of androgen receptor down-regulating agents: discovery of potent anti-prostate cancer agents, *Bioorg Med Chem.* (2007), 15, 3413-21.

RACCHI, M.; MAZZUCHELLI, M.; PORRELLO, E.; LANNI, C.; GOVONI, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research* (2004), 50(4), 441-451.

RAUK, A. The chemistry of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews* (2009), 38(9), 2698-2715.

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, p.267-279, 1996.

SANDERSON, D. M., EARNSHAW, C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: The DEREK system. *Human & Experimental Toxicology* (1991), 10, 261-273.

SCHNEIDER, G.; FECHNER, U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery* (2005), 4(8), 649-663.

SELKOE, D. J.; PODLISNY, M. B. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (2002), 67-99.

SHINTANI, E. Y.; UCHIDA, K. M. Donepezil: an anticholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy* (1997), 54(24), 2805-2810.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions* (2008), 175(1-3), 3-10.

SIPPL, W.; CONTRERAS, Jean-Marie; PARROT, I.; Rival, Y. M.; WERMUTH, C. G. Structure - based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (2001), 15(5), 395-410.

SOININEN, H.; KOSUNEN, O.; HELISALMI, S.; MANNERMAA, A.; PALJAERVI, L.; TALASNIEMI, S.; RYYNAENEN, M.; RIEKKINEN, P. A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neuroscience Letters* (1995), 187(2), 79-82.

SUGIMOTO, H. The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis. *Chemico-Biological Interactions* (2008), 175(1-3), 204-208.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* (New York, N.Y.) (1991), 253(5022), 872-9.

Sybyl User Guide, version 7.1, Tripos Inc., CA, USA, 2005.

TAHA MO, et al., Discovery of new potent human protein tyrosine phosphatase inhibitors via pharmacophore and QSAR analysis followed by in silico screening, *J Mol Graph Model*. (2007), 25, 870-84.

TERRY, A. V., Jr.; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2003), 306(3), 821-827.

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

VYAS, V.; JAIN, A.; JAIN, A.; GUPTA, A. Virtual screening: a fast tool for drug design. *Scientia Pharmaceutica* (2008), 76(3), 333-360.

WAINER, I. W.; KALISZAN, R.; NOCTOR, T. A. Biochromatography using immobilized biopolymers: a new approach to the determination of pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 45: 367, 1993.

WALTERS, W. P., STAHL, M. T., MURCKO, M. A. Virtual screening - an overview. *Drug Discovery Today*, v. 3, n. 4, p. 160-178, 1998.

WIMO, A.; WINBLAD, B.; JONSSON, L. The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* (2010), 6(2), 98-103.

ZAHEER-UL-HAQ; HALIM, S. A.; UDDIN, R.; MADURA, J. D. Benchmarking docking and scoring protocol for the identification of potential acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* (2010), 28(8), 870-882.

ZHU YONG; TONG XIN-YUE; ZHAO YUE; CHEN HUI; JIANG FENG-CHAO Construction of the pharmacophore model of acetylcholinesterase inhibitor. *Yao xue xue bao* = *Acta pharmaceutica Sinica* (2008), 43(3), 267-76.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (2009), 13(2), 238-248.