UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Talita Perez Cantuaria Chierrito

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 09/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

RESUMO

CHIERRITO, T.P.C. **Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer**. 2016. 191f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, representando cerca de 80% dos casos. A DA é caracterizada por um processo de declínio progressivo e irreversível das funções cognitivas e da memória, que se estende para a desorganização do comportamento. Atualmente, 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com demência. Embora vários fatores tenham sido implicados na DA, sua etiologia ainda não é completamente conhecida. Do ponto de vista neuropatológico, é observado no cérebro de indivíduos com DA atrofia cortical difusa, presença de grande número de placas senis, emaranhados neurofibrilares, processo inflamatório e perda neuronal. A progressão dos sintomas está associada a mudanças estruturais nas sinapses colinérgicas em certas regiões do cérebro, que consequentemente, apresentam neurotransmissão colinérgica reduzida. Os vários eventos patológicos interligados contribuem para o avanço da doença e direcionam diversas pesquisas na busca por tratamentos multialvos com base no processo multifatorial de DA. Assim o presente trabalho descreve a síntese de derivados híbridos *dual binding site* de donepezila-tacrina (fármacos inibidores de acetilcolinesterase), com potencial para agir em dois alvos terapêuticos pela (i) inibição da acetilcolinesterase em ambos os sítios ativo e periférico, como demonstrado pelos estudos de modelagem molecular, e (ii) na agregação do peptídeo Aβ neurotóxico induzido pela acetilcolinesterase, na tentativa de interromper a progressão da doença. A estratégia sintética envolveu a condensação da 5,6-dimetóxi-indanona com a unidade 4-piperidinil carbaldeído, a qual forneceu o intermediário 5,6-dimetóxindan-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-cloroquinolin-2-il)metil], seguido de redução da dupla ligação, gerada na reação de condensação anterior, e substituição do átomo de cloro-quinolina por amino para obtenção do produto final, ou manutenção da função olefina, seguido de substituição do átomo de cloro-quinolina por azido ou amino, gerando cinco híbridos estruturalmente correlacionados. Os híbridos foram testados em ensaio de inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase pelo método de Ellman, e o híbrido insaturado, contendo a função amino-quinolina foi o mais ativo da série com IC_{50} na faixa de nanomolar (0,014 μM). Futuramente, os intermediários da reação e produto final serão submetidos ao ensaio de inibição da agregação do peptídeo Aβ neurotóxico pelo método da tioflavina T. Neste trabalho, também são descritos os testes de predição *in vitro* para permeação pela barreira hematoencefálica, bem como sua absorção intestinal, pelo método PAMPA.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, inibidor duplo, peptídeo beta-amiloide, Doença de Alzheimer.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Descrita primeiramente pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1906, como "Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"- **"**Uma doença peculiar dos neurônios do córtex cerebral", a doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, representando cerca de 80% dos casos. Caracterizada como um processo de declínio progressivo e irreversível das funções cognitivas que se estende para desorganização do comportamento e sintomas psicóticos. Em geral, a DA de acometimento tardio, de incidência ao redor dos 60 anos de idade, ocorre de forma esporádica, enquanto a DA de acometimento precoce, de incidência ao redor de 40 anos, mostra recorrência familiar. O quadro é insidioso e, frequentemente, antecipado por comprometimento cognitivo leve, uma condição considerada, por vários autores, como pré-demência (SMITH, 1999; COELHO et al., 2009; ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

Inicialmente, o paciente apresenta maior comprometimento da memória recente e, com a evolução do quadro clínico, ocorrem distúrbios de memória semântica, dificuldade de nomeação e de elaboração da linguagem, déficits de atenção, prejuízos nas habilidades visuoespaciais e nas funções executivas. Estes déficits cognitivos prejudicam o paciente em suas atividades diárias, na convivência familiar, bem como no desempenho social e ocupacional, dependendo completamente de cuidadores com o avanço da doença (COELHO et al., 2009).

Segundo o World Alzheimer Report (2015), foi estimado 9,9 milhões de novos casos de demência em todo o mundo, ou seja, um novo caso a cada três segundos. Atualmente 46,8 milhões de pessoas vivem com a doença, e de acordo com as projeções esse número dobrará a cada 20 anos, e em 2050 serão 131,5 milhões de acometidos. O custo mundial gerado pela demência em 2015 foi de cerca de 818 bilhões de dólares.

No Brasil, há cerca de 1,2 milhão de casos e a prevalência de demência entre 60 e 65 anos de idade é de 7%, sendo que, mais da metade desses casos apresentam a DA. A Organização Mundial da Saúde estima que daqui a 20 anos, as doenças mentais e neurológicas constituirão a segunda causa de morte no mundo, principalmente pelo aumento da expectativa de vida (PERRONI, 2007; ABRAZ, 2015).

Embora vários fatores tenham sido implicados na DA, sua etiologia não é completamente conhecida. Do ponto de vista neuropatológico, é observado no cérebro de

indivíduos com DA atrofia cortical difusa, a presença de grande número de placas senis e emaranhados neurofibrilares.

As placas senis são encontradas nos espaços extracelulares, na região de sinapse e são formadas devido à agregação do peptídeo β-amiloide (Aβ). Os emaranhados neurofibrilares estão presentes intracelularmente e se formam devido à agregação da proteína Tau, envolvida com a estabilização do citoesqueleto do neurônio. Esses dois fatores culminam com degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (SILVA et al., 2014).

Transtornos da transmissão da acetilcolina (ACh) e acetiltransferases ocorrem nos indivíduos afetados por DA, a ACh é um neurotransmissor envolvido no aprendizado e memória. A progressão dos sintomas da doença está associada a mudanças estruturais nas sinapses colinérgicas em certas regiões do cérebro, como o córtex e o hipocampo, os quais apresentam neurotransmissão colinérgica reduzida (SMITH, 1999; SILVA et al., 2006).

Adicionalmente, outros fatores etiológicos para a DA vem sendo estudados como o processo inflamatório, estresse oxidativo, herança genética, e a apolipoproteína E (ApoE) como fator de risco no desenvolvimento da doença (SILVA et al., 2014).

Com vários eventos patológicos interligados que contribuem para o avanço da doença, durante as últimas décadas, ficou estabelecido por diversas pesquisas que a doença de Alzheimer é um processo multifatorial (TELL & HILGEROTH, 2013).

Os tratamentos atuais da DA aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) são focados no aumento da transmissão colinérgica no cérebro pela inibição das colinesterases, empregando os fármacos tacrina, donepezila, rivastigmina e galantamina (**Figura 1)**.

Tacrina (Cognex®) foi um dos primeiros fármacos introduzidos na terapêutica como inibidor reversível e não seletivo de acetilcolinesterase (AChE), uma vez que apresentou capacidade de também inibir a enzima butirilcolinesterase (BuChE). Mas, o uso de tacrina no tratamento da doença foi prejudicado devido a alta dose diária (120-160 mg) e ao aparecimento de efeitos hepatotóxicos.

Por outro lado, donepezila (Aricept®) atua como inibidor reversível e, ao contrário de tacrina, é seletivo junto à inibição de AChE e requer a utilização diária de 5-10 mg. Os seus efeitos adversos são de natureza, principalmente, gastrointestinal (REICHMAN et al., 2003).

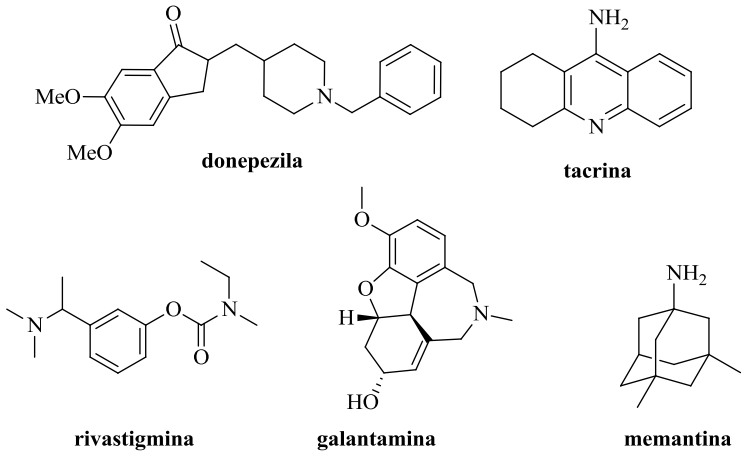


Figura 1. Estruturas dos fármacos donepezila, tacrina, rivastigmina, galantamina, e memantina.

A galantamina (Razadyne®) alcalóide isolado da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), apresenta um mecanismo de inibição duplo no sistema colinérgico, inibindo a AChE e modulando alostéricamente a atividade do receptor nicotínico (nAChR), como agonista. A galantamina apresenta 53 vezes mais seletividade pela AChE humana quando comparada a BuChE. A relação estrutura atividade revela que o grupo hidroxil da galantamina contribui para sua interação na AChE (NG et al., 2015). Efeitos adversos incluem náusea, vômito, perda de apetite e aumento na frequência dos movimentos peristálticos intestinais (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

A Rivastigmina (Exelon®) quimicamente classificado como fenilcarbamato, é outro fármaco utilizado na terapêutica e tem ação inibitória para ambas as colinesterases AChE e BuChE. Apresenta efeitos adversos como os de galantamina.

Outra classe de fármaco aprovada pelo FDA atua bloqueando o receptor de *N*- metil-D-aspartato (NMDAR). Na DA, o excesso de glutamato (um importante neurotransmissor relacionado ao aprendizado e memória) liberado em células danificadas, causa um alto influxo de cálcio para dentro dos neurônios via ativação NMDAR, o que resulta em excitotoxicidade, levando a morte neuronal. Memantina (Nameda®) (**Figura 1**), um agente neuroprotetor que bloqueia NMDAR, foi aprovado em 2003 para o tratamento de Alzheimer de leve a moderada. Memantina pode ser administrada sozinha ou em combinação com inibidores de AChE como o fármaco donepezila (NG et al., 2015). Os principais efeitos colaterais são dor de cabeça, constipação, confusão mental e tontura (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

No entanto, a experiência clínica tem revelado que esses inibidores podem ser apenas paliativos, pois não abordam a etiologia complexa da DA.

1.2 PRINCIPAIS PROCESSOS PATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

1.2.1 Placas amiloides

Um dos processos patológicos mais descritos que está envolvido na DA é o da "hipótese da cascata amiloide", relacionado ao peptídeo Aβ. Muitos pesquisadores acreditam que a produção defeituosa, degradação, e *clearance* do peptídeo Aβ são as causas primárias da DA.

Os eventos da cascata amiloide incluem a superprodução da proteína precursora do amiloide (PPA), além do mau funcionamento das proteases de degradação-Aβ. PPA é uma glicoproteína integral tipo 1 de membrana, com domínio *N*-terminal extracelular, um simples domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta, encontrada preferencialmente nas terminações nervosas. O desequilíbrio entre a produção e *clearance* no processamento da PPA, resulta em excesso de peptídeo Aβ, o qual está relacionado com o desencadeamento patológico, como a redução de sinapses, perda de neurônios, prejuízo no uso da glicose e danos oxidativos (PERNECZKY et al., 2014).

As três enzimas que afetam o processamento da PPA são chamadas secretases (α-, β- e γ-secretases). A PPA pode ser clivada inicialmente em dois sítios, pela α-secretase (via não amiloidogênica) ou β-secretase (via amiloidogênica).

β-Secretase, também conhecida por BACE-1, é uma aspartil protease transmembrana, enzima de clivagem do sítio-β da PPA, localizada nos terminais sinápticos. Estudos indicam que esta β-clivagem é o passo limitante de processamento da PPA e produção do peptídeo Aβ, e sua relevância na DA é evidenciada pelo aumento na expressão e atividade no tecido cerebral de indivíduos com Alzheimer. A γ-secretase é um atípico complexo aspartil protease composto por proteínas individuais (presenilina nicastrina, APH-1, PEN-2, PS-1 e PS-2). Há um consenso de que PS-1 e PS-2 estão intrinsecamente relacionadas com o processamento amiloidogênico de PPA, ao formar a subunidade catalítica da enzima (PERNECZKY et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Na via não amiloidogênica, a α-secretase cliva a PPA gerando o fragmento C-terminal (C83) e o fragmento sPPAα, posteriormente o fragmento C83 é clivado pela γ-secretase liberando os fragmentos não tóxicos p3 e C59. No processamento amiloidogênico, a β-secretase após clivar a PPA libera o fragmento sPPAβ, e há formação do fragmento C-terminal (C99) o qual é clivado pela γ-secretase resultando no peptído $A\beta_{40/42}$ e um fragmento

intracelular C59. O fragmento Aβ40 é o mais frequente, no entanto, o Aβ42 é o que apresenta maior propensão de agregação, sendo o mais encontrado nas placas amiloides (**Figura 2**).

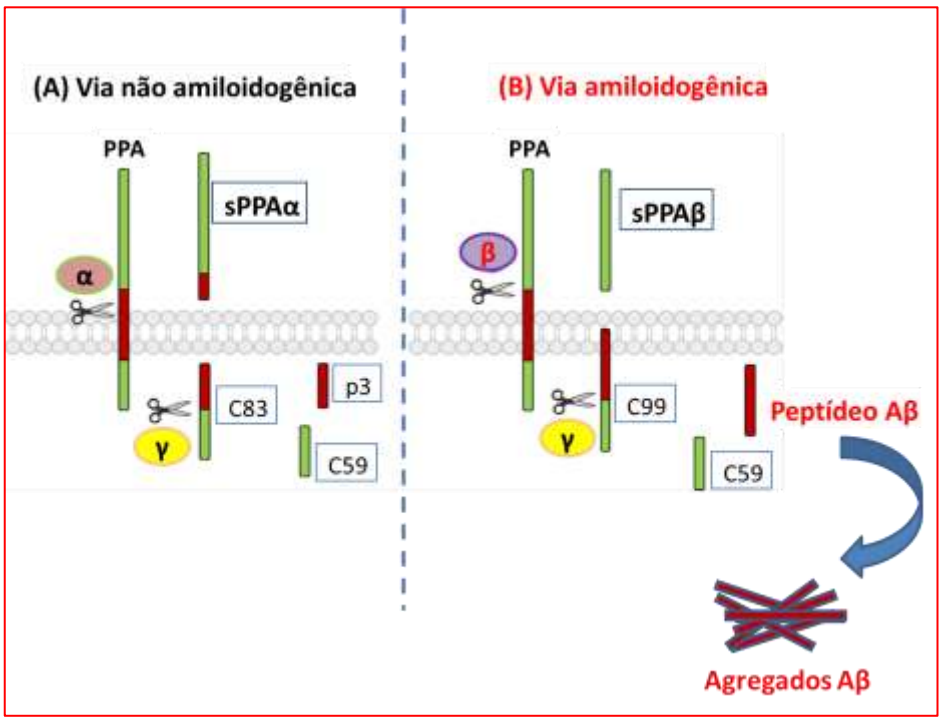


Figura 2. A PPA é alternativamente clivada por ambas, (A) α secretase, resultando em fragmentos não amiloidogênicos ou (B) pela β-secretase, liberando o fragmento neurotóxico Aβ pela adicional clivagem por γ secretase.
Fonte Adaptado de: SILVA et al., Alzheimer's disease, enzyme targets and drug Discovery struggles: From natural products to drug prototypes, Ageing Research Reviews, p.116-145, copyright (2014), com a permissão de Elsevier.

Uma vez formado os peptídeos Aβ, em um processo patológico inicia-se o processo de agregação, dando origem aos agregados chamados oligômeros. Em continuidade a esses agregados são formadas as fibrilas, que consequentemente levam aos entrelaçados de fibrilas formando as chamadas folhas-beta. No estágio final, as folhas-beta se agregam dando origem às placas amiloides (**Figura 3**) (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

Atualmente, os oligômeros são considerados a forma mais prejudicial e tóxica do peptídeo Aβ, ao invés das placas amiloides. Os pequenos agregados bloqueiam a sinalização entre as células nas sinapses, e ainda podem ativar as células do sistema imune que ativam o processo inflamatório local. A toxicidade celular associada com a agregação de fibrilas provê uma explicação para a perda neuronal encontrada nos pacientes (LUO et al., 2011;).

As razões para a toxicidade diferencial entre oligômeros de Aβ e as fibrilas podem ser explicadas pelo arranjo estrutural. Nos oligômeros a superfície hidrofóbica está exposta em folhas β enquanto nas fibrilas estão encobertas internamente nas pilhas de fibrilas. Os oligômeros são menores em tamanho e, por esta razão, podem difundir-se facilmente nos

tecidos quando comparados às longas fibrilas, além disso, os oligômeros são altamente instáveis e desordenados ao contrário das fibrilas (VERMA et al., 2015).

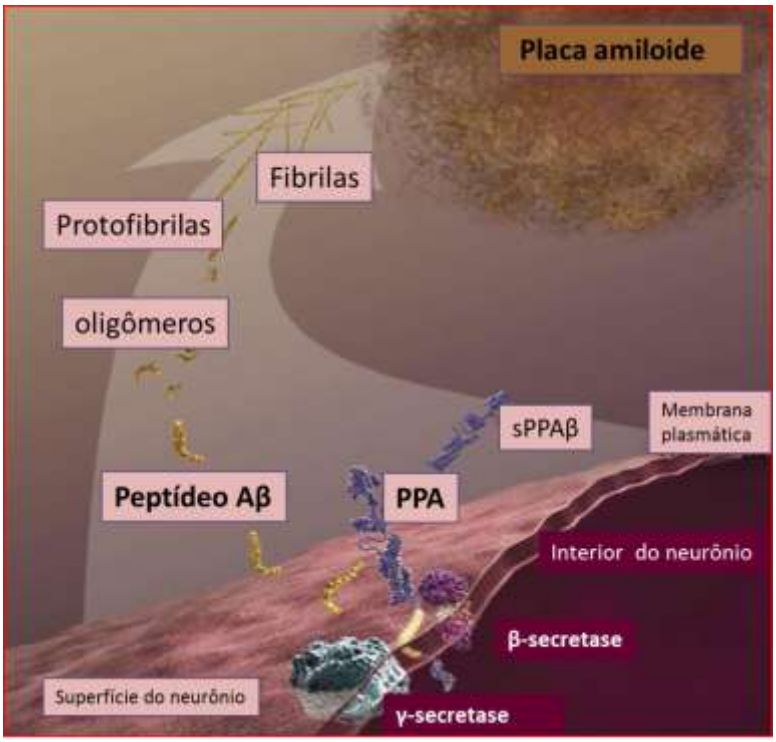


Figura 3. Clivagem da proteína integral de membrana PPA pelas secretases, formação do peptídeo Aβ, oligômeros, fibrilas e a placa amiloide no espaço interneural.
Adaptado Fonte: www.nia.nih.gov/alzheimer

1.2.2 Emaranhados neurofibrilares

A proteína Tau pertence à família de proteínas associadas aos microtúbulos (MAP, do inglês *microtubule-associated proteins*), cuja associação é fundamental na polimerização, estabilização e modulação dos microtúbulos (NAINI & SOUSSI-YANICOSTAS, 2015).

Os microtúbulos, formados pela proteína tubulina (α e β tubulina), juntamente com os neurofilamentos e microfilamentos, são os maiores constituintes do citoesqueleto neural, os quais fazem parte da sustentação estrutural celular e ainda realizam o transporte axonal de organelas, de nutrientes, de vesículas com neurotransmissores, e outros sinalizadores celulares, para manutenção da viabilidade celular (NAINI & SOUSSI-YANICOSTAS, 2015).
A proteína Tau pode se encontrada na forma solúvel ou insolúvel, sendo que a forma insolúvel ocorre quando a proteína está hiperfosforilada e se agrega formando filamentos helicoidais pareados (FHP), principal constituinte encontrado nos emaranhados neurofibrilares (**Figura 4**). A degeneração neurofibrilar associada à hiperfosforilação anormal

da proteína Tau não ocorre apenas em cérebros com a DA, mas é também observado em outras doenças neurodegenerativas, denominadas taupatias, como a demência fronto-temporal com Parkinson, degeneração corticobasal, demência pugilística, dentre outras (PAULA et al., 2009; IQBAL et al., 2010).

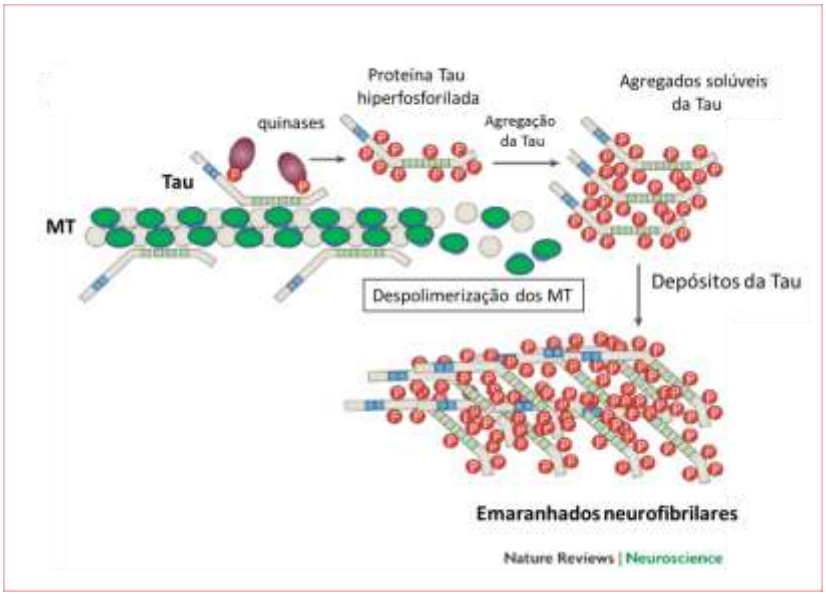


Figura 4. Processo de formação dos emaranhados neurofibrilares, a partir da hiperfosforilação da proteína Tau, desligamento e despolimerização do microtúbulo.
Fonte: Adaptado com a permissão de Macmillan Publishers LTd: Nat. Rev. Neurosci. GOTZ & ITTNER, Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, v.9, p.532-544, copyright (2008).

Quando a proteína Tau encontra-se no estado de hiperfosforilação, há impedimento da ligação com a tubulina, culminando na instabilização da estrutura dos microtúbulos e, consequentemente, do citoesqueleto celular. A hiperfosforilação da proteína Tau pode ser o resultado ou a combinação do aumento da atividade das tauquinases ou da subsensibilização das suas fosfatases, de modo que a hiperfosforilação da Tau é considerada o ponto de partida para a perda funcional e o colapso da estrutura microtubular (PAULA et al., 2009).

Consequentemente os emaranhados neurofibrilares destroem o transporte vital na célula neural realizado pelo citoesqueleto, além de destruir também a arquitetura celular, uma vez que os microtúbulos não conseguem se manter ordenados e se desintegram. Desta forma, como os nutrientes e outros suplementos essenciais não podem mais se mover através das células, ocorre morte neuronal (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

1.2.3 Déficit colinérgico

O sistema colinérgico é o primeiro sistema de neurotransmissores responsáveis pela disfunção cognitiva e da memória no envelhecimento normal e na DA. Assim a estratégia de aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica, a chamada hipótese hipocolinérgica, levou ao desenvolvimento de farmácos capazes de inibir a hidrólise da acetilcolina (MARTORANA et al., 2010; WEINREB et al., 2015). Atualmente a hipótese hipocolinérgica é reforçada pelo uso desses inibidores aprovados pelo FDA (donepezila, rivastigmina e galantamina), que demonstram melhorar os aspectos de cognição e memória dos pacientes com DA.

Os principais componentes envolvidos na transmissão colinérgica são: (1) o neurotransmissor acetilcolina (ACh); (2) acetilcolinesterase (AChE); (3); acetiltransferase (AChT), enzima que sintetiza a ACh e (4) receptores de ACh, especificadamente o receptor nicotínico (nAChR) e receptor muscarínico (mAChR). Pesquisas anteriores sobre envelhecimento e DA, baseados na administração de fármacos anticolinérgicos e pró-colinérgicos, e indução de lesões em certas regiões do cérebro de modelos animais, evidenciaram o grande envolvimento do sistema colinérgico no declínio cognitivo relacionado à idade. A partir desses estudos, novas pesquisas vêm estabelecendo uma forte relação entre prejuízo cognitivo e o sistema colinérgico do prosencéfalo basal (BAXTER & CHIBA, 1999; PAUL et al., 2015).

Outros estudos mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam os genes da proteína presenilina (PS) (relacionada com a porção catalítica da γ-secretase) e PPA, apresentam distrofia colinérgica e redução na atividade da enzima AChT no córtex e no hipocampo, implicando na diminuição da função colinérgica. No entanto, não houveram mudanças significativas nos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal dos animais transgênicos (PEREZ et al., 2007; ZABORSZKYY et al., 2012).

1.2.4 Processo neuroinflamatório

Além dos mecanismos fisiopatológicos mencionados acima como, déficit colinérgico, depósito de peptídeo Aβ e hiperfosforilação da Tau, atualmente há também evidências do desencadeamento de processo inflamatório no tecido neuronal dos pacientes com DA. A

neuroinflamação em vários estágios da doença, bem como a ativação do sistema imune e de algumas células na estimulação da via inflamatória no sistema nervoso central (SNC), já foi reportada (AKIYAMA et al., 2000; HENEKA & O'BANION, 2007; GIUNTA et al., 2008; ROCHA-GONZÁLEZ et al., 2008).

O processo inflamatório na patogênese da DA é caracterizado pela produção anormal pelas células da glia, de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, ativação do sistema complemento, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem interromper a sinapse, levando a perda de memória, culminando com a morte neuronal associada aos últimos estágios da DA. Além disso, evidências de análise *post-mortem* confirmam a presença de microglia ativada e astrócitos reativos em torno dos depósitos de amiloide. Assim, também é interessante o uso de estratégias terapêuticas que possam direcionar o controle da ativação da micróglia, astrócitos e do excesso na produção de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes no controle do processo de neurodegeneração (AGOSTINHO et al., 2010; CHOI et al., 2013).

1.2.5 Genética

Os genes relacionados à DA estão classificados em duas categorias, os genes determinantes e os de risco.

Indivíduos precocemente acometidos pela DA, antes dos 60 anos por exemplo, aos 30 ou 40 anos, mostraram recorrência familiar caracterizada por mutações nos genes da *PPA*, *presenilina-1* e *2* (*PS-1* e *PS-2*), esses casos são chamados de "doença de Alzheimer autossômica dominate (ADAD)" ou "doença de Alzheimer familiar". Variações de Alzheimer determinantes foram encontradas somente em poucas centenas de famílias no mundo todo. Os casos de Alzheimer familiar correspondem a menos de 5 % dos casos (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

Mutações nos genes (*PPA*, *PS-1* e *PS-2*), são relevantes na DA porque todos eles afetam o processamento da PPA e a produção de Aβ. Mutações do gene da *PPA* no cromossomo 21 também aumentam os níveis totais de produção de Aβ. Mutações do gene *PS-1* (no cromossomo 14) e em menor proporção no gene *PS-2* (no cromossomo 1) resultam em aumento na produção de Aβ42. Um aspecto importante sobre o peptídeo Aβ na etiologia da doença é que na Síndrome de Down (SD, trissomia do cromossomo 21) a cópia extra do cromossomo 21 provoca um aumento da expressão de PPA e, por conseguinte aumento nos níveis de Aβ, o que acarreta uma elevação no depósito de placas amiloides em alguns indivíduos com SD (FINDEIS, 2007).

A apolipoproteína E (apoE) participa do transporte e metabolismo de lipídios, particularmente do colesterol e está presente em vários órgãos como fígado e cérebro. No sistema nervoso é produzido pelas células da glia, astrócitos e macrófagos. Estudos recentes demonstraram como fator de risco a presença do alelo *ε4* do gene *apoE*, o qual apresentou relação com a DA em vários estudos independentes, correspondendo entre 20 a 25% dos casos de Alzheimer. O gene da apoE existe em três alelos polifórmicos *ε2*, *ε3* e *ε4*, e apresentam uma frequência de 8,4%, 77,9% e 13,7%, respectivamente, entretanto, em pacientes com DA a frequência do alelo *ε4* está aumentada consideravelmente para cerca de 40% (LIU et al., 2013; NG et al., 2015).

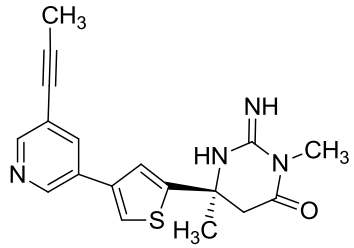
1.3 ALVOS TERAPÊUTICOS EXPLORADOS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Nos últimos anos os avanços nas pesquisas levaram ao reconhecimento de vários alvos e vias relacionadas à DA, sendo os principais descritos nesta seção.

1.3.1 Peptídeo Aβ

Como a β-secretase (BACE-1) é uma enzima que inicia a produção de Aβ, ela passou a ser um alvo terapêutico chave para DA. A deleção genética de BACE-1 em camundongos promoveu a redução da produção de Aβ em consequência da redução do processamento de PPA, indicando que a inibição de BACE-1 deva ser eficaz no tratamento da DA. Entretanto, camundongos nulos para BACE-1, exibiram múltiplos fenótipos neurológicos, sugerindo que fármacos inibidores de BACE-1 devam ocasionar efeitos colaterais relacionados a hipomielização, defeitos de orientação dos axônios, déficits de memória, anormalidades na neurogenesis e neurodegeneração (VASSAR, 2014).

Apesar dos desafios no descobrimento de fármacos inibidores de BACE-1, desde sua descoberta há 15 anos, a introdução recente de vários desses inibidores em triagens clínicas tem redirecionado a atenção para essa abordagem terapêutica na DA. Atualmente, o composto da Merck MK-8931 (**Figura 5**) está descrito como o inibidor que está em estágio mais avançado, em fase 2/3, enquanto os inibidores desenvolvidos pela AstraZeneca, Eisai e Pfizer, por exemplo, estão em fase 1 e 2. Estes compostos demonstraram ser potentes uma vez que promovem a redução de aproximadamente 90% de Aβ no fluido cérebro-espinhal. Adicionalmente, essas substâncias foram bem toleradas em sua maioria (VASSAR, 2014).



MK 8931

Figura 5. Inibidor de BACE-1 MK 8931 em fase clínica II/III.

O maior desafio para o desenvolvimento de inibidores da BACE-1 na clínica é a relação nível de inibição suficiente desta enzima *versus* estágio da doença, visando otimizar a eficácia do tratamento. Argumentos hipotéticos baseados na mutação do tipo BACE1+/− em camundongos sugeriram que a inibição de aproximadamente 50% da BACE-1 alcançaria uma redução de cerca de 20% de Aβ, que poderia prevenir a DA, caso comece antes dos depósitos significativos de placas amiloides. É esperado que a janela terapêutica para a dose adequada de inibidor BACE-1 seja estabelecida para que haja a redução nos níveis cerebrais de Aβ, e ainda mantenha a atividade de BACE-1 para controlar o surgimento dos efeitos colaterais (VASSAR, 2014).

Dentre as estratégias anti-amiloide, a imunoterapia vem sendo estudada e considerada como a mais promissora para o tratamento da DA. Em particular, a imunoterapia contra Aβ possibilita o desenvolvimento de anticorpos cujo alvo são porções altamente específicas do peptídeo. Recentes avanços na engenharia de proteínas, bem como a produção de proteínas recombinates, tornaram viáveis as produções de anticorpos específicos para uso terapêutico (LANNFELT et al., 2014).

Apesar da modulação imunológica afetar o processamento de Aβ secundariamente, o foco da maior parte das pesquisas atualmente está baseado na estratégia para imunidade ativa e passiva direcionada para a toxicidade e *clearance* de Aβ. O tempo para o aparecimento e distribuição dos oligômeros e até mesmo das placas amiloides no cérebro não correspondem aos dos sintomas clínicos da DA, sendo que o processo de agregação do peptídeo Aβ pode começar até 20 anos antes da perda cognitiva. Por isso, a remoção das placas pode não ser um alvo adequado para o tratamento dos sintomas da DA, embora ainda pudesse ser um alvo viável para a prevenção. Como dito anteriormente, os agregados solúveis de Aβ, como os oligômeros e protofibrilas, são altamente tóxicos para o cérebro e são os alvos lógicos para a imunoterapia Aβ. Entretanto, estes agregados Aβ solúveis tendem a ter curta duração e baixa abundância sendo, portanto, mais difíceis de caracterizar e direcionar como alvo quando

comparados aos monômeros e fibrilas. Um melhor entendimento sobre esses agregados intermediários Aβ solúveis que contribuem para a patogênese da DA pode ajudar no desenvolvimento de imunoterapias anti-amiloide (LANNFELT et al., 2014).

Várias estratégias de imunoterapias estão atualmente sendo testadas em triagens clínicas, como é o caso do Aducanumab e Gantenerumab (CLINICAL TRIALS; ALZFORUM, 2015; ALZHEIMER ASSOCIATION (Clinical trials), 2015).

Os resultados mais promissores foram do Aducanumab, antigo BIIB037, desenvolvido pela empresa Biogen em Cambridge, Massachusetts. Um anticorpo monoclonal recombinante humano, de alta afinidade contra Aβ, capaz de reconhecer os aminoácidos (3 ao 6) *N*-terminal do peptídeo Aβ, o qual entrou em fase clínica em agosto de 2015. Este anticorpo mostrou benefícios dose dependente em remover Aβ e melhorar a cognição. Os estudos revelam que foi possível reduzir as formas de agregação de Aβ, incluindo oligômeros solúveis e fibrilas insolúveis depositadas na placa amiloide em seis regiões do cérebro: frontal, parietal, temporo lateral, sensorimotor e cingulado anterior e posterior. Acredita-se que o mecanismo pelo qual os anticorpos removam o peptídeo Aβ do cérebro seja via mediação celular por fagocitose ou dissolução direta do peptídeo. Os estudos estão previstos para serem executados até 2022, em 150 centros na América do Norte, Europa, Austrália e Ásia (ALZFORUM, 2015; CLINICAL TRIALS).

1.3.2 Proteína Tau

As pesquisas para tratamento dos emaranhados neurofibrilares focam principalmente o desenvolvimento de agentes capazes de inibirem e/ou reverterem à formação dos FHP e também o desenvolvimento de inibidores de quinases, responsáveis pela hiperfosforilação da Tau.

Um dos mais avançados estudos relacionados à inibição da agregação da Tau, está sendo realizado pela TauRx®. Esta empresa, dirigida pelo Prof. Dr. Claude Wischik (Professor da Universidade de Aberdeen, e o pioneiro na pesquisa sobre a proteína Tau) vem estudando o azul de metileno (Rember®) (**Figura 6**) e tem demonstrado em ensaios clínicos de fase II que este fármaco atua na prevenção e na dissolução dos emaranhados. Novos estudos para melhorar a absorção, biodisponibilidade e tolerabilidade do Rember® deu origem a um novo protótipo, o TRx0237, o qual se encontra em ensaios de fase III. (LANSDALL, 2014).

Outra abordagem terapêutica relevante a fim de evitar a formação dos agregados FHP é o desenvolvimentos de inibidores das tauquinases, responsáveis pelo processo de fosforilação da proteína Tau. As principais quinases responsáveis pelo processo de fosforilação da Tau são: glicogênio sintase quinase 3-beta (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3β), caseína quinase 1 (casein kinase 1, CK-1) e quinase dependente de ciclina 5 (Cdk5), sendo a primeira amplamente estudada (LANSDALL, 2014).

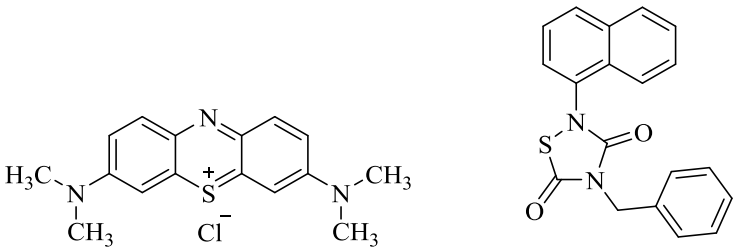
A GSK-3β é uma das isoformas mais abundantes da GSK-3, possui 47 kDa (WOODGETT, 1990) e é composta por 420 aminoácidos. Esta enzima é uma proteína serina-treonina quinase que, em resposta a eventos de sinalização celular, modifica as funções de uma variedade de proteínas por fosforilação de serinas ou treoninas.

Estudos recentes demonstram que o aumento da atividade da GSK-3 promove vários eventos, como a fosforilação da proteína Tau em sítios específicos, e também facilita a transformação da PPA, resultando no aumento da produção de Aβ e, consequentemente, favorecendo a formação das placas amiloides (PHIEL et al., 2003; LATHER et al., 2008).

A caseína quinase 1 (CK1), faz parte de uma grande família de proteínas monoméricas de serina/treonina, encontradas em diversas partes da célula, incluindo núcleo, citoplasma, citoesqueleto, vesículas e membrana plasmática (VIELHABER & VIRSHUP, 2001). De forma semelhante à GSK-3, CK1 desempenha um importante fator na hiperfosforilação da Tau, e sua inibição evita a formação dos emaranhados neurofibrilares e também diminui a formação das placas senis, pela redução da formação de Aβ (KURET et al., 1997). Dados recentes indicam que várias isoformas de CK1 (α, β, ε) foram encontradas em filamentos e em lesões grânulo vacuolares em cérebros com DA (VIELHABER & VIRSHUP, 2001; KURET et al., 1997)

A vantagem desta abordagem envolvendo GSK-3β e CK1, como um novo alvo terapêutico frente às demais, é que os compostos usuais utilizados para diminuir a produção de Aβ também bloqueiam a quebra de outras proteínas, causando graves efeitos colaterais. Contudo, estudos conduzidos por Flajolet e colaboradores (2007) identificaram que as enzimas-chave envolvidas na produção de Aβ (BACE-1 e γ-secretase) são alvos dessas duas quinases, GSK-3β e CK1, e sua inibição diminui a formação de Aβ sem interferir nos demais processos enzimáticos.

Tideglusib (NP-12), desenvolvido pela Noscira, é um derivado de tiadiazolidinas e atua como inibidor irreversível ATP-não competitivo de GSK-3β (**Figura 6**).



azul de metileno **tideglusib (NP-12)**

Figura 6. Estrutura do azul de metileno (Rember®), inibidor de agregação da Tau, e do tideglusib (NP12), inibidor de GSK-3β.

Tideglusib apresentou, nos ensaios pré-clínicos, uma significante neuroproteção envolvendo neurônios do hipocampo, depois de dano excitotóxico. A administração de tideglusib em camundongos *PPAsw* transgênicos reduziu os níveis de Tau hiperfosforilada e depósitos de Aβ. Esses ensaios encorajaram a entrada em fase clínica de tideglusib, alcançando a fase IIb para o tratamento da DA e também de uma rara taupatia conhecida como paralisia supranuclear progressiva (PSP). Nessa fase, tideglusib foi bem tolerado pelos pacientes que apresentavam a DA em grau leve a moderado, conduzindo a alterações positivas na cognição, mas sem significância estatística devido ao pequeno grupo amostral. A eficácia clínica de tideglusib em pacientes com DA deve ser assistida em um número maior de pacientes para que os resultados sejam estatisticamente significativos (LANSDALL, 2014; SILVA et al., 2014).

1.3.3 Neuroinflamação

Atualmente, células do sistema imune nato, e também micróglias são os primeiros alvos para modulação da neuroinflamação. As triagens clínicas prospectivas falharam em demonstrar efeitos positivos do uso dos tradicionais anti-inflamatórios não esteróidais (NSAIDS) e também dos inibidores seletivos de ciclo-oxigenase 2 (COX 2) no tratamento ou prevenção da DA. Entretanto, em uma grande triagem de prevenção, os participantes demonstraram melhora na cognição por um período de tempo prolongado após terminar o tratamento com NSAIDS. Assim a eficácia dos anti-inflamatórios no tratamento pré-sintomático de indivíduos é atualmente inconclusiva. Isto demonstra a importância da avaliação rigorosa em relação ao momento do uso, antes ou após o início dos sintomas e alterações dos biomarcadores, além da duração do tratamento com anti-inflamatório na DA (HEPPNER et al., 2015).

1.3.4 Colinesterases

Acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) são glicoproteínas homólogas, que apresentam mais de 50% de homologia. AChE é principalmente expressa pelos neurônios, enquanto a BuChE está associada as células gliais. No córtex de pacientes com DA, a atividade da AChE reduz progressivamente dos estágios moderado a severo da doença e passa a ter apenas de 10 a 15% do valores normais, enquanto a atividade da BuChE está inalterada ou as vezes aumentada atingindo até 120%. Alguns estudos demonstram que a BuChE desenvolve um papel de suporte compensatório nesse processo, como nos estudos em camundongos nulizigotos para AChE que demonstraram que a BuChE recupera a função colinesterásica na ausência de AChE (GIACOBINI, 2004; BRUS et al., 2014).

A enzima acetilcolinesterase no sistema nervoso periférico é responsável pelo controle nos impulsos nervosos, dos batimentos cardíacos, pela contração de músculos lisos, dilatação de vasos sanguíneos, e no sistema nervoso central modula o controle motor, a memória e cognição. Nas sinapses colinérgicas de vertebrados regula a neurotransmissão através da rápida e eficiente hidrólise da ACh em colina e acetato, com capacidade em catalisar até $6x10^5$ moléculas de ACh por molécula de enzima a cada minuto (PETRONILHO et al., 2011).

A AChE é uma molécula de aproximadamente 320.000 Da, consistindo em duas cadeias polipeptídicas, na qual cada uma se apresenta em dobro (α2, β2). Apresenta três regiões importantes na extensão catalítica: o sítio catalítico (CAS, do inglês *catalytic anionic site*), o sítio periférico (PAS, do inglês *peripheral anionic site*) e uma fenda hidrofóbica que une o PAS ao CAS. O CAS é dividido em dois subsítios, um esterásico, responsável pela hidrólise do grupo éster do substrato ACh, envolvendo os resíduos da tríade catalítica (Ser 200 (203), His (440) 447 e Glu (327) 334) [número referente a *Torpeto californica* é dado primeiro, seguido pelo referente da espécie *humana*], e outro relacionado à interação com a região de colina, rico em aminoácidos hidrofóbicos, como o Trp 84 (86) (JOHNSON & MOORE 2006; DVIR et al., 2010).

O PAS, localizado na entrada da fenda catalítica, distante cerca de 14Å do CAS, contém o Trp 279 (286) como o resíduo responsável pela função de adesão na AChE. Este sítio está envolvido com a modulação alostérica da catálise no CAS e é alvo de vários agentes anticolinesterásicos. Está também implicado em várias funções não clássicas da enzima, como, em particular, o depósito de peptídeo Aβ, adesão celular, e crescimento em expansão dos dendrímeros (MUÑOZ- TORRERO & CAMPS, 2006; SILVA et al., 2006; JHONSON & MOORE, 2006; CHEUNG et al., 2012).

BuChE, também conhecida como pseudocolinesterase, é sintetizada no fígado, encontrada no plasma sanguíneo e catalisa a hidrólise de ésteres de colina, incluindo a butirilcolina, succinilcolina e acetilcolina. É estruturalmente e funcionalmente relacionada com a AChE, ambas apresentam um resíduo de serina essencial para a atividade catalítica. AChE e BuChE pertencem a família de proteínas de enovelamento-α/β uma vez que contém a folha-β central circundada por α-hélice. Esta enzima demonstrou catalisar a hidrólise de outros ésteres como a cocaína, o ácido acetilsalicílico e heroína. Além disso, a BuChE é importante na proteção do organismo diante de anticolinesterásicos, como fisostigmina e organofosforados (DARVESH et al., 2003).

A butirilcolinesterase humana (*h*BuChE) contém uma tríade catalítica, composta pela Ser226, histidina 466 e ácido glutâmico 353, e assim como na AChE é também encontrada na extremidade de um cavidade de 20 Å de profundidade, a qual está alinhada por seis resíduos de aminoácidos. Além da tríade catalítica, o sítio ativo contém o chamado "sítio aniônico", que pode se ligar ao nitrogênio quaternário do substrato. O sítio aniônico compreende o aminoácido triptofano 82 (DARVESH et al., 2003).

Consequentemente, é esperado que a inibição da BuChE possa beneficiar pacientes com DA da mesma forma que os inibidores de AChE (DARVESH et al., 2003; ZAWADZKA et al., 2013; BRUS et al., 2014).

1.3.4.1 Relação entre AChE e proteína Aβ

Recentemente, algumas evidências indicam que a formação, agregação e neurotoxicidade do peptídeo Aβ pode estar sob controle colinérgico e que os clássicos efeitos dos inibidores de AChE podem interferir no processo de geração dos componentes não-amiloidogênicos dos precursores de proteína amiloide. Ativação de receptores muscarínicos M_1, em decorrência da inibição da AChE e subsequente ativação da via da proteína quinase C (PKC) podem estimular a secreção da proteína amiloide solúvel neurotrófica e neuroprotetora (αPPAs), com consequente redução na liberação de Aβ. Este fato sugere que inibidores de AChE podem prevenir a formação das placas amiloides e promover o processamento normal da PPA (MUÑOZ-TORRERO & CAMPS, 2006).

Outros estudos revelam que a enzima AChE também apresenta funções não colinérgicas, a AChE foi encontrada associada aos depósitos de Aβ no início da formação das placas. De fato, ambos os depósitos pré-amiloides difusos, bem como placas senis compactas contém a enzima. Além disso, a AChE forma complexos *in vitro* enzima-Aβ muito estáveis e permanecem fortemente ligados mesmo após lavagens com soluções salinas concentradas e

detergentes. Estes resultados indicam que a AChE pode participar do processo de formação de placas, fornecendo um núcleo heterogêneo durante a formação e crescimento das fibrilas amiloides (INESTROSA & MUÑOZ, 1999).

Assim, a AChE pode se ligar a um confôrmero não amiloidogênico de Aβ, induzir uma transição conformacional para uma forma amiloidogênica e, consequentemente, para fibrilas amiloides, formando complexos estáveis de Aβ-AChE. Estes complexos estáveis de Aβ-AChE são capazes de modificar as propriedades bioquímicas da enzima e causar aumento na neurotoxicidade das fibrilas de Aβ (**Figura 7**). O local de ligação na AChE é o PAS, o responsável pela função de adesão na enzima. Como consequência, os inibidores de AChE (AChEIs) capazes de interagir com esse sítio periférico da enzima poderiam exibir um interessante efeito neuroprotetor resultante da sua habilidade de bloquear a interação entre AChE com Aβ, o que pode representar uma nova forma para retardar o processo degenerativo na doença de Alzheimer (ALONSO et al., 2005; MUÑOZ-TORRERO & CAMPS, 2006; CAMPS et al., 2010).

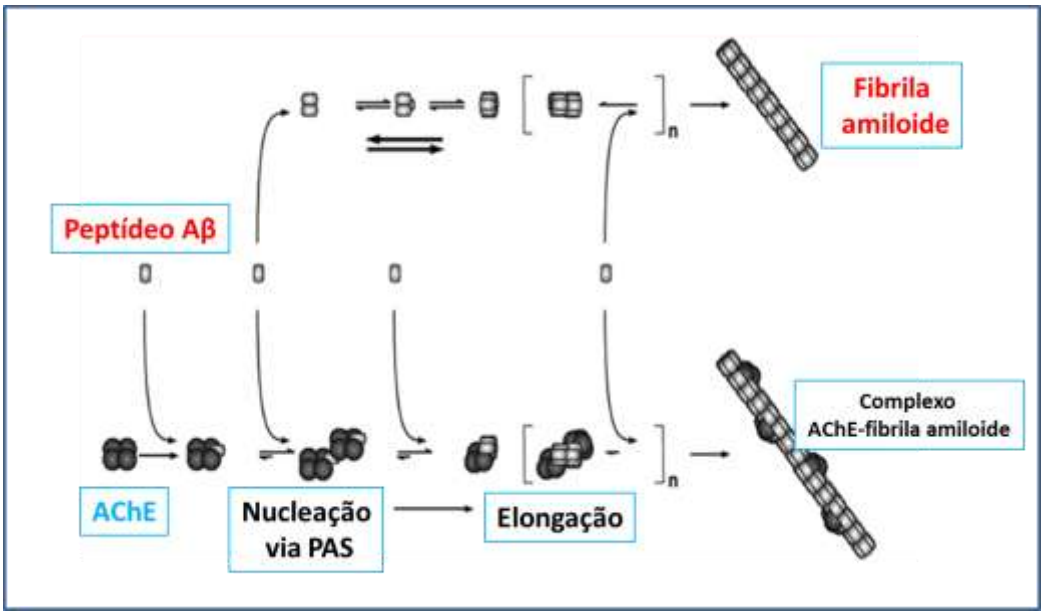


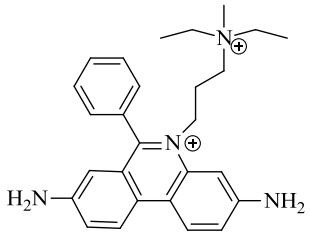
Figura 7. Formação do complexo Aβ-AChE, induzida via sítio periférico da enzima atuando como um ponto de nucleação e elongação das fibrilas.
Adaptado Fonte: CARVAJAL & INESTROSA, 2011.

1.3.4.2 Inibidores do sítio periférico

Considerando os aspectos não colinérgicos da AChE, sua relação com as principais evidências da doença e o envolvimento do sítio periférico da enzima em todas essas funções,

o mesmo foi considerado um alvo atrativo para o desenho de novos fármacos anti-Alzheimer. Inibidores do sítio periférico ou dos dois sítios de AChE (através de modulação alostérica via sítio periférico, ou bloqueio ao sítio ativo) podem simultaneamente aliviar o déficit de memória nos pacientes com Alzheimer, e o mais importante, evitar a agregação do peptídeo Aβ. O desenvolvimento desses inibidores representa um novo caminho para retardar o processo neurodegenerativo (CASTRO & MARTÍNEZ, 2001).

O primeiro composto descrito com alta capacidade de bloquear a interação entre o peptídeo Aβ e a AChE foi o propídio (**Figura 8**), um inibidor descrito como capaz de interagir exclusivamente com o sítio periférico. Sua baixa capacidade em inibir a AChE, e sua natureza dicatiônica fez descartar seu uso na farmacoterapia anti-Alzheimer (CANTADOR, 2012).



propídio

Figura 8. Estrutura do propídio, capaz de bloquear a interação entre peptídeo Aβ e a AChE.

Além do propídio, alguns compostos heterocíclicos foram desenhados como inibidores de AChE capazes de interagir com o PAS. Como é o caso da 4,4'- bipiridina (**I**), fenilcarbamato dissubstituído (**II**) e indenoquinolilamina (**III**). O mecanismo de inibição nos três casos foi determinado por estudos cinéticos. Assim, os compostos foram caracterizados como inibidores dirigidos ao sítio periférico aniônico (**Figura 9**). Huprina x (**IV**), um híbrido que combina a subestrutura carbocíclica da huperzina A com 4-aminoquinolina, subestrutura da tacrina, tem uma das mais altas afinidades pela AChE já descritas. O seu modo de ligação na enzima foi verificado em estudos de competição com o inibidor de sítio periférico propídio, e o edrophonium que promove inibição no sítio ativo. Resultados indicaram que a huprina x (**IV**) interage no sítio de acilação no sítio ativo da enzima, mas interfere levemente com a ligação dos ligantes do sítio periférico (SIMEON-RUDOLF et al., 1999; LIN et al., 1999; RAMPA et al., 2000; CAMPS et al., 2000; CASTRO & MARTÍNEZ, 2001).

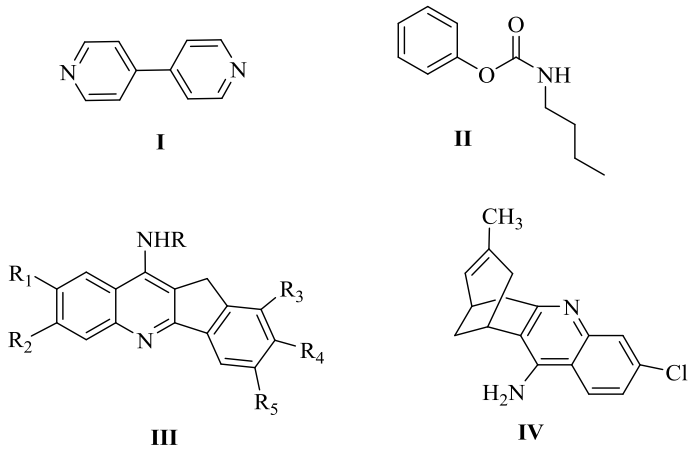


Figura 9. Inibidores do sítio periférico de AChE.

1.3.4.3 Inibidores duplos de AChE (dual binding site)

Várias classes de inibidores duplos de AChE, denominados *dual binding site,* têm sido desenvolvidos pela hibridação adequada de duas unidades que interagem com a enzima, que em geral, são derivados dos inibidores clássicos da AChE (donepezila e/ou tacrina) e tem sido relacionados ao bloqueio dos sítios periférico e catalítico da AChE. O sucesso da estratégia envolvendo *dual binding site* é evidente pelo grande aumento na inibição da AChE em relação aos compostos de origem (CAMPS et al., 2008; MEHTA et al., 2012). Adicionalmente, o desenvolvimento de fármacos *dual binding site* tem sido particularmente interessante por apresentarem propriedade de inibição da agregação do peptídeo Aβ induzida pela AChE, via interação pelo sítio periférico, o que faz desses compostos promissores candidatos para o tratamento da doença de Alzheimer (CAMPS et al., 2008).

A **Figura 10,** mostra alguns exemplos de inibidores híbridos de AChE do tipo *dual binding site* **V**-**XI**, em seguida na **Tabela 1** estão apresentadas as correspondentes atividades biológicas (**V**-**VIII** e **X**-**XI**).

Dentre as substâncias *dual binding site* apresentadas na **Figura 10**, a que apresentou melhor inibição da AChE foi **XI-A** e **B** com IC_{50} de 0,070 e 0,060 nM, respectivamente, além da inibição de 98 e 96% na agregação da proteína Aβ amiloide induzida pela AChE respectivamente, conforme **Tabela 1**.

Alonso e colaboradores (2005) sintetizaram os híbridos de donepezila-tacrina **V** e **VI** (considerando o núcleo ftalimida como bioisóstero da indanona), os quais apresentaram atividade inibidora da AChE 8 e 70 vezes mais potentes que donepezila e tacrina, respectivamente. Neste mesmo estudo, foi realizado ensaio de competição pelo propídio

(ligante seletivo do sítio periférico da enzima), para confirmar a interação das substâncias neste sítio de ligação, e prever indiretamente o potencial de inibição da agregação Aβ amiloide. Como resultado, os compostos **V** e V**I** foram capazes de deslocar o propídio nos ensaios de competição, mostrando IC_{50} de 10 e 1 μM, respectivamente, sendo a unidade ftalimida destes compostos apontada como a responsável pela ligação ao sítio periférico.

Os compostos **VII** e **VIII** também apresentaram resultados positivos de inibição em AChE 0,27 e 7,98 nM respectivamente, e ainda foram capazes de inibir a agregação do peptídeo Aβ induzido por AChE em 46 e 65%. O composto **VII** conservou as porções de acridina da tacrina e indanona de donepezila unidas por um linker de piperidina, demonstrando ser interessante essa combinação frente à inibição de AChE (CAMPS et al., 2010), quando comparada, por exemplo, ao composto **VIII** que manteve apenas a porção acridina de tacrina (LUO et al., 2011).

Camps García e colaboradores (2007) sintetizaram o composto **IX** (**Figura 10**), além de vários derivados e seus sais, incluindo estereoisômeros ou misturas de estereoisômeros, no qual *R1*, *R2*, *R3* e *R4* são radicais relacionados ao H, Cl, F, Br, CF3, (C1-C4) alquil, (C1-C4) alcoxil e nitro; *R5*, *R6*, *R7* e *R8* relacionado ao H e (C1-C6) alcoxil; *n* é um número de carbonos de 3 a 5; *r* é um número de carbono de 2 a 5; *s* é um número de 1 a 5 e *X* é CO ou CH_2.

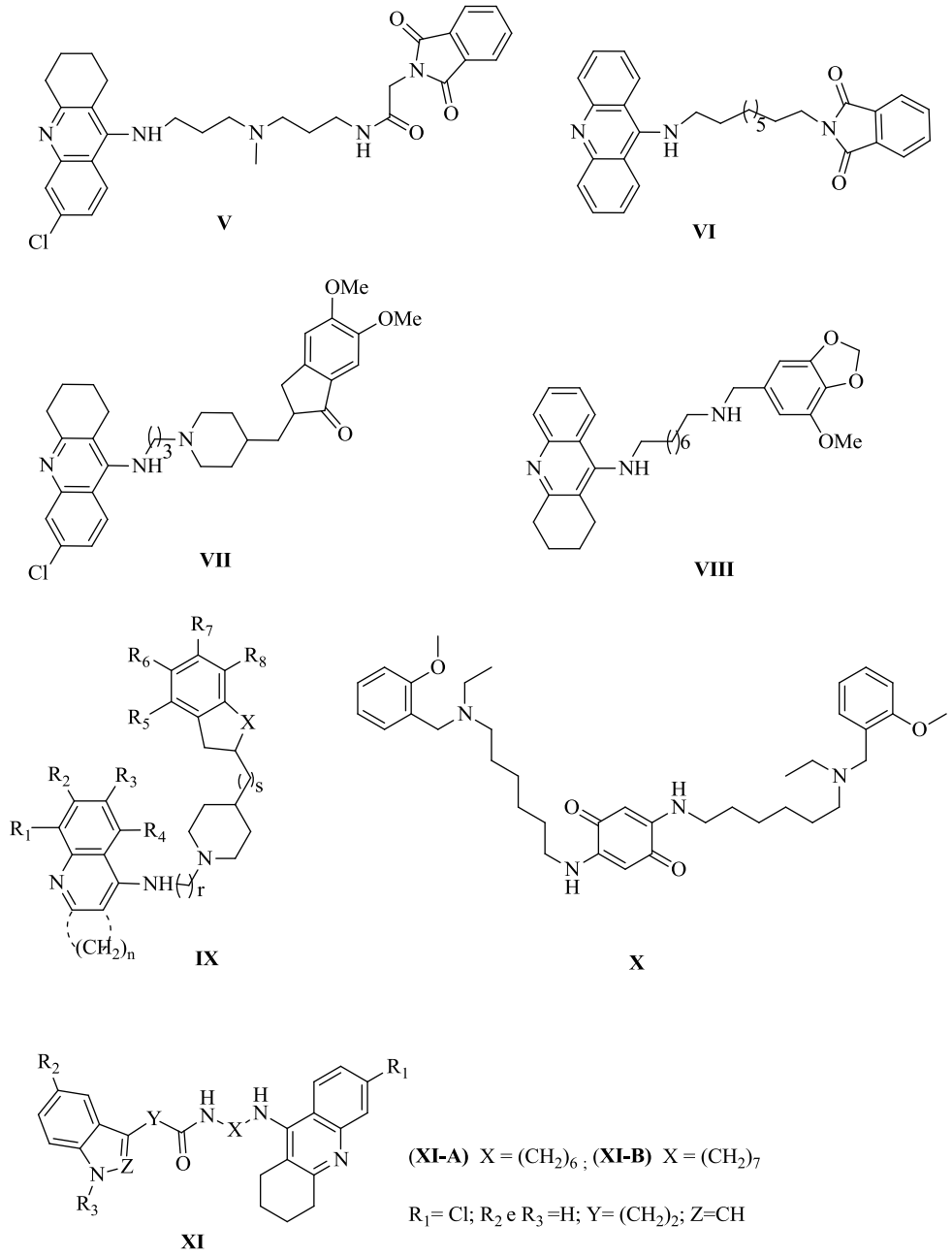


Figura 10. Inibidores de AChE *dual binding site* (**V-XI**).

Estas estruturas (**IX**) foram patenteadas uma vez que se comportam como inibidores da AChE nos dois sítios de ligação e são úteis como protótipo contra a doença de Alzheimer, apesar dos ensaios biológicos não terem sido descritos.

Tabela 1. Atividade biológica das substâncias *dual binding site* (**V-X e XI**).

Dual binding site	IC_{50} AChE (nM)	IC_{50} BuChE (nM)	Ensaio propídio (μM)	Ensaio de inibição da agregação Aβ amiloide induzida pela AChE (%)
V	2,80	7,50	10,0	--
VI	2,40	90,0	1,0	--
[a]VII	0,27	66,3	--	46
[b]VIII	7,98	7,94	--	65
[a]X	1,55	1440,0	--	87
[a]XI -A	0,070	0,014	--	98
[a]XI -B	0,060	0,10	--	96

[a]Ensaio de inibição, método Tioflavina –T, na presença de 100 μM de inibidor.

[b]Ensaio de inibição, método Tioflavina –T, na presença de 20 μM de inibidor.

De acordo com esses exemplos, é possível visualizar a potencialidade dos inibidores de AChE *dual binding site*, não só em inibir a AChE e, consequentemente, aumentar a transmissão colinérgica, melhorando a cognição, bem como em inibir a agregação do peptídeo Aβ induzida pela AChE, o qual é neurotóxico e culmina na perda neuronal.

Os resultados dos ensaios *in vitro* de inibição da agregação do peptídeo Aβ pelos AChEIs *dual binding site* têm apresentado correlação direta com os ensaios *in vivo.* Assim, a memoquina (**X**), *um dual binding site* que *in vitro* bloqueou 87% da indução da agregação do peptídeo Aβ amiloide pela AChE a 100 μM, tem demonstrado reduzir depósitos de peptídeo Aβ amiloide e resgatar o déficit comportamental ligado a atenção em camundongos que apresentam o conjunto completo de características da DA (CAMPS et al., 2008; BOLOGNESI et al., 2007).

Além da memoquina (**X**), a subtância da Neuropharma NP-61 (antigamente chamado de NP-0361), um AChEI *dual binding site*, inibiu *in vitro* a agregação do peptídeo Aβ amiloide induzida pela AChE, com IC_{50} uma ordem de magnitude menor que o propídio, e também reduziu o número, a área de superfície e tamanho das placas amiloides no córtex e hipocampo em camundongos transgênicos (Swedish e London). A redução da carga proteica amiloide resultou em significante aumento na cognição (aprendizado espacial e memória no teste de Morris *water maze*), destacando a relação direta entre o ensaio *in vitro* e *in vivo*. Na primeira metade de 2007, NP-61 entrou em ensaio clínico de fase I para tratamento da doença

de Alzheimer na Inglaterra, o que constitui uma evidência clara do promissor papel dessas substâncias contra a DA (CAMPS et. al, 2008).

NP-61 faz parte dos heterodímeros indol-tacrina sintetizadas por Muñoz-Ruiz e colaboradores (2005) representado por **XI** (**Figura 10**), em uma série de inibidores *dual binding site* obtidos pelo grupo. De acordo com os resultados mostrados, duas moléculas (**A** e **B**) foram mais promissoras, ambas apresentam R_1= Cl; R_2 e R_3=H; Y= $(CH_2)_2$; Z=CH; diferem apenas pelo fato de que na molécula (**A)** X = $(CH_2)_6$ e em (**B)** X = $(CH_2)_7$, os dados das atividades biológicas estão na **Tabela 1** (GARCÍA-PALOMERO et al., 2008).

Estudos de *docking* utilizando AChE, isolada de *Torpedo californica* (*Tc*AChE), foram realizados para o heterodímero **XI-A**, no qual a porção tacrina interage com o sítio ativo com os resíduos de aminoácidos Trp84 e Tyr330, o nitrogênio aromático da tacrina faz ligação de hidrogênio com o carbono carbonílico da cadeia principal da His440. Adicionalmente, uma ligação de hidrogênio também é formada entre o grupo amino da tacrina e o carbono carbonílico de Trp84, além do átomo de cloro que ocupa uma cavidade hidrofóbica, formado por Trp432, Met436 e Ile439. A cadeia ligante é alinhada ao longo da fenda e as principais interações são realizadas pelo grupo amida. No sítio periférico é possível notar interações entre o anel indol junto ao anel aromático do Trp279 (MUÑOZ-RUIZ et al., 2005).

1.4 JUSTIFICATIVA PARA SÍNTESE DO NOVO HÍBRIDO TACRINA-DONEPEZILA

Analisando todo processo multifatorial envolvido na DA, torna-se evidente a necessidade de uma abordagem mais ampla na pesquisa a fim de se obter um fármaco capaz de bloquear a evolução da doença em distintas vias patológicas. Assim, uma das estratégias atuais é o desenvolvimento de novos agentes anti-Alzheimer com múltiplas potências. Dentre os principais processos multialvos envolvidos na DA, o desenvolvimento de substâncias com atividade inibidora de colinesterases e de agregação do peptídeo Aβ, vem sendo estudadas e tem se mostrado serem bastante promissoras (DVIR et al., 2002; LUO et al., 2011; RIZZO et al., 2008; RIZZO et al., 2010; YAN et al., 2012). Inibidores de colinesterase e formação/agregação do peptídeo Aβ são extensivamente explorados ao longo de décadas e o grande número de informações já descritas facilita o desenvolvimento racional de novos inibidores multialvos do tipo inibidores duplos de AChE.

Com base na estrutura tridimensional de *Tc*AChE, e análise das interações moleculares entre os resíduos da enzima e os fármacos donepezila (**1**), capaz de interagir no sítio periférico, e tacrina (**2**), capaz de interagir na região de colina no sítio ativo, foi possível planejar compostos híbridos com potencial afinidade pelos dois sítios enzimáticos (**Figura 11**).

Neste caso, o processo de hibridação molecular, representado pela conjugação das principais características estruturais dos dois fármacos em uma única substância bioativa, pode ser aplicado para melhorar as propriedades farmacodinâmicas desta classe de compostos inibidores de AChE. De fato, estudos anteriores de modelagem molecular e *docking*, realizados pelo grupo de pesquisa, mostraram que a combinação dos fármacos donepezila (**1**) e tacrina (**2**) pode dar origem a moléculas híbridas, como mostrado na **Figura 11**, com grande complementaridade estrutural para preencher ambas as cavidades da enzima, sítio ativo (CAS) e periférico (PAS) (SILVA et al., 2006).

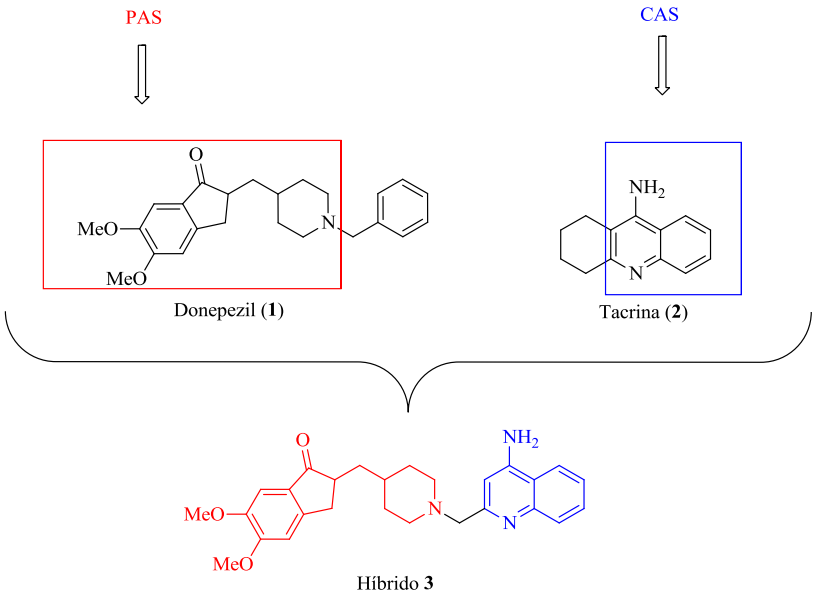


Figura 11. Estratégia de hibridação molecular, envolvendo os fármacos donepezila (**1**) e tacrina (**2**) para obtenção do híbrido **3**, capaz de interagir nos sítios ativo e periférico da AChE como *dual binding site.*

Adicionalmente, estudos de predição de toxicidade e metabolismo, realizados pelos programas DEREK1[1] e METEOR, indicaram que estes derivados poderiam apresentar propriedades farmacocinéticas adequadas. Entre os derivados propostos, o **híbrido 3** apresentou o melhor resultado de docking, com score 88. A molécula foi mantida orientada

[1] Derek é uma base de dados que faz a predição qualitativa de toxicidade envolvendo uma série de regras que relacionam a estrutura química ou o toxicóforo á toxicidade da molécula associada, e também a carcinogênicidade, mutagênicidade, sensibilização da pele, irritação, teratogenicidade e neurotoxicidade (GUPTA et al., 2011).

permitindo interação π-stacking envolvendo o grupo indanona do híbrido, bem como as interações π-stacking com Trp 84 e ligações de hidrogênio com o resíduo His440 da AChE, além de uma interação adicional por ligação de hidrogênio entre o grupo amino livre do composto proposto e a cadeia lateral do Glu199 (SILVA et al., 2006).

Apesar de derivados híbridos de tacrina-donepezila já terem sido descritos na literatura, nenhum possui a combinação estrutural entre os dois fármacos, como proposto para o híbrido **3**.

Na **Figura 12 a-b** está representado o resultado de docking realizado com o híbrido **3**, mostrando a complementariedade deste composto em ambos os sítios e interação de maneira semelhante aos fármacos de origem. Devido a possível isomerização no carbono α-carbonila, a estereoquímica específica do híbrido **3** não está sendo representada.

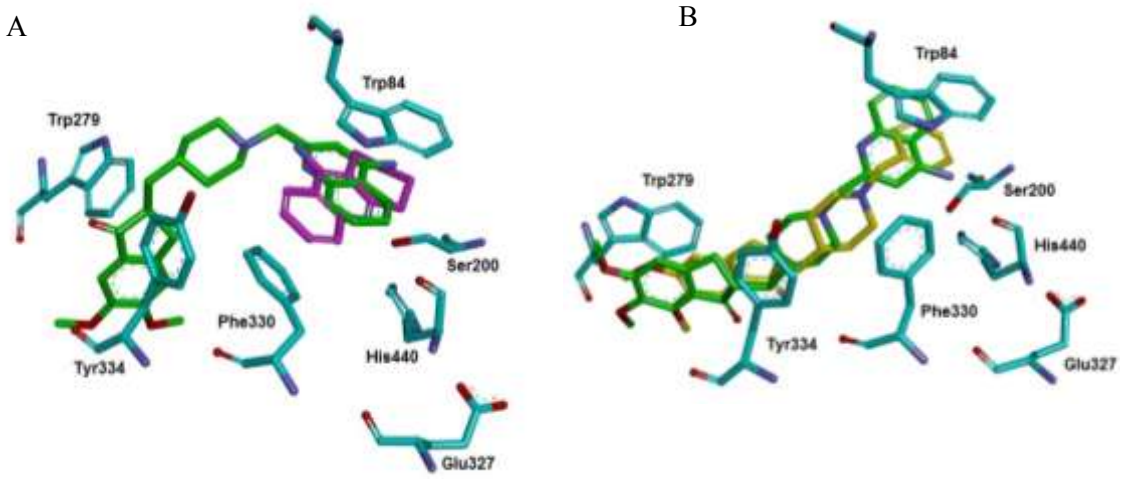


Figura 12. **A-** Sobreposição de tacrina (**1**), em rosa e híbrido **3**, em verde; **B-** Sobreposição de donepezila (**2**), em amarelo, e híbrido **3**, em verde, nos sítios ativo e periférico da enzima AChE, relacionados aos complexos PDB 1ACJ para tacrina e 1EVE para donepezila, obtidos a partir de estudos de docking.

Com relação aos compostos dual binding site descritos anteriormente (**Figura 10**), o híbrido **3** difere dos compostos V**II e IX** pela presença de anel quinolínico, em substituição ao sistema anelar de acridina, pelo local de ligação do nitrogênio metil-piperidínico ao anel heterocíclico quinolínico, o qual ocorre na posição C-2 no híbrido **3**, conforme sugerido pelos estudos de *docking*, enquanto nas estruturas V**II** e **IX** ocorrem no grupo amino presente em C-4 do núcleo de acridina.

Como pode ser observado, embora haja semelhança nas estruturas citadas de *dual binding site* com o híbrido **3**, é possível notar uma diferença característica importante no aspecto de toxicidade. Enquanto os exemplos citados apresentam a unidade acridina da tacrina

(**2**), o híbrido **3** apresenta o anel simplificado quinolínico, capaz de manter as mesmas interações de tacrina. Está bem estabelecida que a estrutura planar de anéis tricíclicos confere aos compostos a habilidade de interferir em uma variedade de processos metabólicos tanto em células procarióticas como eucarióticas (DI GIORGIO et al., 2011). Os agentes intercalantes de DNA mais extensivamente estudados são acridina e seus derivados, os quais são ligados não covalentemente ao DNA e são altamente mutagênicos (LYNNETTE et al., 2007).

Os efeitos genéticos de compostos de acridina têm sido estudados em microrganismos, insetos, plantas e células de mamíferos. O efeito mutagênico mais notável são as mutações *frameshift* (inserção ou deleção de bases) culminando com a leitura incorreta do DNA (HOFFMANN et al., 1996).

O metabolismo da tacrina é realizado no sistema oxidativo microsomal hepático juntamente com as enzimas do citocromo P450 família 1A. Dentre os metabólitos da tacrina estão os derivados mono e diidroxilados. Dentre esses a 7-hidróxitacrina, após oxidações adicionais, conduz a formação do derivado reativo quinona metide que pode formar conjugados com proteínas pela reação do grupo tiol e/ou com a glutationa reduzida (**figura** 13). Os danos celulares podem resultar da interação da quinona metide com macromoléculas essenciais ou por induções de diferentes ciclos de redox, provocado pela indução da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de radicais livres, o que leva a crer que a 7-hidróxitacrina seja um composto potencialmente perigoso (PATOCKA et al., 2008).

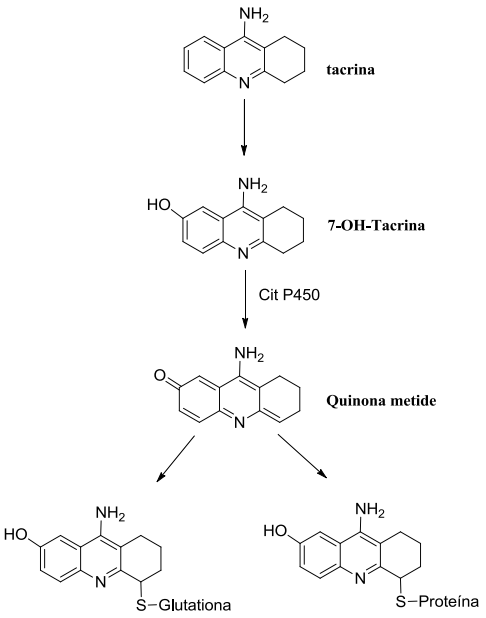


Figura 13. Formação de metabólitos reativos da tacrina.
Fonte adaptado PATOCKA et al., 2008.

Por outro lado, quinolina é uma base terciária fraca e não tóxica para humanos em absorção oral e inalação. O núcleo quinolina ocorre em vários compostos naturais (alcalóides da Cinchona) e substâncias farmacologicamente ativas, como antimalárico (cloroquina, primaquina, quinina, mefloquina), antifúngico (tetahidroquinolinas), antihelmíntico (2,4-arilquinolinas), com atividade cardiovascular (amida quinolínica; quinolina-4-ácido carboxílico; tetraidroquinolinas), no sistema nervoso central (quinolina base antagonista de receptor NK3), anti-inflamatório (2-(furan-2-il)-4-fenoxi-quinolina derivado), analgésico (4-Substituído-7-trifluorometilquinolinas), antiglicêmico (quinolina carboxiguanidas) (MARELLA et al., 2013).

De fato, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa utilizando o programa DEREK prediz que são prováveis os danos ao cromossomo ao se verificar o anel de acridina, enquanto ao anel de quinolina são apresentadas apenas advertências plausíveis (chances remotas de ocorrer).

relação teórica entre a fração absorção intestinal (Fa) e a permeabilidade foi descrita por Amidon e colaboradores (1988) como uma função não-linear, expressa pela seguinte equação:

$$\text{Fa}\% = (1 - e^{-a \cdot P_e}) \cdot 100$$

A Fa% pode ser calculada utilizando o software estatístico SPSS ou JMP (ZHU et al., 2002).

6. CONCLUSÃO

O trabalho foi realizado de forma satisfatória e diversos resultados foram obtidos. Entre os resultados mais relevantes, vale destacar:

- A síntese total do híbrido **3**, como produto final proposto no projeto, foi realizada após sete etapas de síntese e envolvendo diversas reações que, apesar de clássicas, foram investigadas para padronização das melhores condições reacionais; apesar de algumas etapas terem apresentado baixo rendimento, como por exemplo a etapa final, é possível variar as condições reacionais para obtenção de maiores quantidades, caso o produto **3** apresente, de fato, elevada atividade junto a AChE, como inibidor *dual binding site*;

- Além do híbrido **3**, quatro novos derivados foram obtidos (**13**, **19**, **20** e **25**), como intermediários da sequência sintética, contendo aspectos estruturais importantes e relacionados ao produto final para estudos de relação estrutura-atividade;

- Os ensaios enzimáticos empregando o método de Ellman, envolvendo *h*AChE e *h*BuChE foram realizados com sucesso e, apesar do híbrido **3** ainda não ter sido testado, foi possível avaliar a atividade dos intermediários relacionados estruturalmente ao híbrido **3**, como o composto **25**, com atividade inibidora junto a *h*AChE na ordem de nanomolar (IC_{50} 0,014 μM) e **13** (IC_{50} 4,88 μM), além dos derivados **20** e **25** com atividade inibidora junto a *h*BuChE (IC_{50} 5,99 e 3,69 μM, respectivamente).

- A partir dos ensaios de inibição enzimática, foram explorados os estudos de cinética enzimática para determinação do mecanismo de inibição dos derivados mais ativos. Os derivados azido **13** e clorado **20** apresentaram mecanismos mistos de ação em *h*AChE e *h*BuChE, respectivamente, podendo atuar portanto como inibidores *dual binding site.* Em contrapartida, o derivado **25**, o qual difere do híbrido **3** apenas pela presença de uma função olefina, apresentou mecanismo não competitivo. De acordo com os estudos de modelagem molecular, este dado de cinética enzimática pode demonstrar a grande afinidade do composto **25** pelo sítio periférico;

- Estudos de relação estrutura-atividade preliminares mostram a potencialidade do composto híbrido amino-quinolínico **3** em inibir *h*AChE em maior proporção que o seu correspondente intermediário olefínico **25**, principalmente, quando são comparados as atividades de donepezila (IC_{50} 0,0057 μM) com o seu precursor insaturado **21** (IC_{50} 0,13 μM).

- Os compostos híbridos intermediáridos (**13**, **20** e **25**, além de donepezila (**1**) e seu precursor **21**) também foram avaliados adequadamente na predição de permeabilidade pela barreira

hematoencefálica e intestinal pelo método PAMPA, realizado no centro de pesquisa CIB-CSIC (Espanha), durante o estágio (BEPE); os compostos **13**, **20**, **21** e donepezila foram capazes de atravessar a BHE.

Embora não tenha sido realizado o ensaio biológico de agregação do peptídeo beta-amiloide induzido pela AChE, como proposto, devido a baixa quantidade de híbrido **3** obtido, o mesmo será realizado após nova obtenção de **3** pela reprodução de algumas reações finais da sequência sintética.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGID A. F.; MARYANOFF C. A.; CARSON K. G. Reductive amination of aldehydes and ketones by using sodium triacetoxyborohydride. **Tetrahedron Lett.,** v. 31(39), p. 5595-5598, 1996.

ABRAZ- Associação Brasileira de Alzheimer. Disponível em: <http://www.abraz.org.br/>. Acesso em: 10 dezembro 2015.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G. M.; COOPER, N. R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, L. B.; FINCH, C.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W. S. T.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L. -F.; MRAK, R.; MACKENZIE, R. I.; MCGEER, L. P.; O'BANION, K. M.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; MUISWINKEL, V. L. F.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T.; Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, v.21, p.383, 2000.

ALONSO, D; DORRONSORO, I; RUBIO, L; MUÑOZ, P; GARCÍA-PALOMERO, E M. DEL MONTE, A. BIDON-CHANAL, M. OROZCO, F.J. LUQUE, A. CASTRO, M. MEDINA, A. MARTÍNEZ. Donepezila–tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. **Bioorg. Med. Chem.**, v.13 (24), p. 6588-6597, 2005.

ALZHEIMER´S ASSOCIATION, **Alzheimer's Disease Facts and Figures.** Disponível em: <http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2011.pdf>. Acesso em: 12 novembro de 2011. Disponível em: <http://www.alz.org/facts/overview.asp>. Acesso em: 5 janeiro de 2016.

ALZHEIMER ASSOCIATION. Clinical trials results and new data analyses in amyloid-related therapies from the Alzheimer's association international conference 2015.Disponível em: www.alz.org/aaic. Acesso em: 20 janeiro 2016.

ALZFORUM. International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases 2015. Disponível em: www.alzforum.org/print-series/413246. Acesso em: 20 janeiro 2016.

AGOSTINHO P.; CUNHA R.A.; OLIVEIRA C. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Curr. Pharm. Design.**, v.16, p. 2766-2778, 2010.

AMIDON G.L., SINKO P.J., FLEISHER D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. **Pharm. Res.**, v.10, p.651-654, 1988.

AUSPEX PHARMACEUTICALS, INC. GANT T. G.; SARSHAR S.; SHAHBAZ M.M .Indanone Inhibitors of acetylcholinesterase. **U.S. Pat. PPAl 2010/0143505A1**, 10 junho 2010.

AVDEEF, A. Permeability-Thin membrane model without retention. In absorption and drug development: solubility, permeability and charge state. Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

BAXTER M. G. & CHIBA A. A. Cognitive functions of the basal forebrain. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.9, p.178–183, 1999.

BOLOGNESI L. M.; BANZI R., BARTOLINI M.; CAVALLI A.; TAROZZI A.; ANDRISANO V.; MINARINI A.; ROSINI M.; TUMIATTI V.; BERGAMINI C.; FATO R.; LENAZ G.; HRELIA P.; CATTANEO A.; RECANATINI M.; MELCHIORRE C. Novel Class of Quinone-Bearing Polyamines as Multi-Target-Directed Ligands To Combat Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem.,** v. 50*,* p. 4882-4897, 2007.

BOYER, N.; GLOANEC, P.; DE NANTEUIL, G.; JUBAULT, P.; QUIRION, J.C. Synthesis of α,α-Difluoro-β-amino Esters or*gem*-Difluoro-β-lactams as Potential Metallocarboxypeptidase Inhibitors. **Eur. J. Org. Chem**., p.4277–4295, 2008.

BRUS B.; KOŠAK U.; TURK S.; PIŠLAR A.; COQUELLE N.; KOS J.; STOJAN J.; COLLETIER J.; GOBEC S. Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. **J. Med. Chem**., v.57, p.8167−8179, 2014.

BUCHWALD HARTWIG AMINATION. Disponível em: <http://www.name-reaction.com /buchwald-hartwig-amination>. Acesso em: 21 janeiro 2015.

CAMPS, P.; ELACHAB, R.; MORRAL, J.; MUÕZ-TORRERO, D.; BADIA, A.; BAÑOS, 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. **J. Med. Chem**., v.43, p.4657-4666, 2000.

CAMPS P.; DOMINGO L.R.; FORMOSA X.; GALDEANO C.; GONZÁLEZ D., MUÑOZ-TORRERO D.; SEGALÉS S.; FONT-BARDIA M.; SOLANS X. Highly Diastereoselective One-Pot Synthesis of Spiro{cyclopenta[*a*]indene-2,2'-indene}diones from 1-Indanones and Aromatic Aldehydes. **J. Org. Chem.,** v.71(9), p. 3464–3471, 2006.

CAMPS, GARCÍA P.; MUÑOZ T.; LÓPEZ I. D.; FORMOSA X.; MÁRQUEZ X.; SCARPELLINI, M. Acetylcholinesterase-inhibiting compounds for treating Alzheimer desease, Barcelona, Universidad de Barcelona, **Pat.** WO 2007/122274 A1, 2007.

CAMPS P.; FORMOSA X.; GALDEANO C.; GÓMEZ T.; MUÑOZ-TORRERO D.; SCARPELLINI M.; VIAYNA E.; BADIA A.; CLOS M.V.; CAMINS A.; PALLÀS M.; BARTOLINI M.; MANCINI F.; ANDRISANO V.; ESTELRICH J.; LIZONDO M.; BIDON-CHANAL A.; LUQUE F.J. Novel Donepezila-Based Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase-Induced -Amyloid Aggregation. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 3588-3598, 2008.

CAMPS P.; FORMOSA X.; GALDEANO C.; GÓMEZ T.; MUÑOZ-TORRERO D.; RAMÍREZ L.; VIAYNA E.; GÓMEZ E.; ISAMBERT N.; LAVILLA R.; BADIA A.; CLOS M. V.; BARTOLINI M.; MANCINI F.; ANDRISANO V.; BIDON-CHANAL A.; HUERTAS Ó.; DAFNI T.; LUQUE F. J. Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates. **Chem. Biol. Interact.,** v.187, p. 411-415, 2010.

CANTADOR C. G., **Disseny, síntesi, avaluació farmacológica i modelatge molecular de nousinhibitors de I' acetilcolinesterasa de lloc d'unió dual**. TESE, Universitat de Barcelona, Departament de Farmacologia I Química Terapèutica, Facultat de Farmàcia, 297 f., 2012.

CARDOSO, F. L.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation PPAroaches. **Brain Res. Dev**., v.64, p. 328-363, 2010.

CASTRO A. & MARTINEZ A. Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in treatment of Alzheimer's Disease. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.1, p.267-272, 2001.

CHAKRABORTY**,** V**.;** BORDOLOI, M**.;** Microwave-assisted Oxidation of Alcohols by Pyridinium Chlorochromate. **J. Chem. Res. (S)**, p. 118-119, 1999.

COELHO, F. G. M.; GALDUROZ-SANTOS, R. F.; GOBBI, S.; STELLA, F. Atividade física sistematizada e desempenho cognitivo com demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 31, p. 163-170, 2009.

COREY E.J. & SUGGS J.W. Pyridinium chlorochromate. An efficient reagente for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. **Tetrahedron lett.**, n.31, p.2647-2650, 1975.

CARVALHO I.; ANDRADE P.; CAMPO V. L.; GUEDES P. M.M.; SESTI-COSTA R; SILVA J. S.; SCHENKMAN S.; DEDOLA S.; HILL L.; REJZEK M.; NEPOGODIEV S. A.; FIELD R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against Trypanosoma cruzi and its cell surface trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p.2412–2427, 2010.

CARVAJAL F.J. & INESTROSA N.C. Interactions of AChE with Aβ Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. **Front. Mol. Neurosci**., v.4(19), 2011.

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

CHOI, S.; AID, S.; CARACCIOLO, L.; MINAMI, S.; NIIKURA, T.; MATSUOKA, Y.; TURNER, R. R.; MATTSON, M. P.; BOSETTI, F. Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **J. Neurochem**.,v.124, p.59–68, 2013.

CLAYDEN J.; GREEVES N.; WAREN S.; WOTHERS P. **Organic Chemistry**, 1st ed. Oxford University Press, 2001.

CLINICAL TRIALS. Disponível em: www.clinicaltrials.gov. Acesso em: 20 janeiro 2016.

COX, M.M. & NELSON, D.L. Lehninger Principles of Biochemistry, 6th edn. WH FREEMAN, UK, 2013.

CRAWFORD S. M.; LAVERY, C. B.; STRADIOTTO, M., BippyPhos: A Single Ligand With Unprecedented Scope in the Buchwald–Hartwig Amination of (Hetero) aryl Chlorides. **Chem. Eur. J**., v. 19, p. 16760–16771, 2013.

CRAWFORD, S. M., LAVERY, C. B.; STRADIOTTO, M. ChemInform Abstract: BippyPhos: A Single Ligand with Unprecedented Scope in the Buchwald—Hartwig Amination of (Hetero)aryl Chlorides. **Chem. Inform.**, v.45, 2014.

CRIVORI, P.; CRUCIANI, G.; TESTA, B. Predicting Blood-Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **J. Med. Chem**.,v. 43, p. 2204-2216, 2000.

DANTAS H. J., **Síntese diastereosseletiva e estudo espectroscópico da (1r, 3r, 3'r, 4r)-3-[(3-piridinil)-hidroximetil]-1,7,7- trimetil biciclo[2.2.1]heptan-2-ona, do regioisômero (4-piridinil) e seus produtos de redução assimétrica**, 2010. Tese de doutorado Universidade da Paraíba, Departamento de Química, 2010. Disponível em :< http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/>. Acesso em 20 outubro 2014.

DARVESH S.; HOPKINS D. A.; GEULA C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.4, p.131-138, 2003.

DESS, D.B. & MARTIN, J.C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. **J. Org. Chem**.,v.48, p. 4156, 1983.

DI L.; KERNS E.H.; FAN K.; MCCONNELL O.J.; CARTER G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. **Eur. J. Med. Chem.** v.38, p.223-32, 2003.

DI GIORGIO C.; BENCHABANE Y.; BOYER G.; PICCERELLE P.; DE MÉO M. Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 49, p. 2773–2779, 2011.

DIAS D. F.; PRADO F. M. A.; PINTO G. D.L; ALVES R. J.; ALVES R. B.; SOUZA F. J. D. D. Síntese de aliloxi-*orto*-iodobenzamida derivada de d-glicose e reação de ciclização radicalar mediada por hidreto de tri-*n*-butilestanho. **Quím. Nova**, v.29 (3), p. 444-451, 2006.

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,** v.41, p.10810-10818, 2002.

DVIR H.; SILMAN I.; HAREL M.; ROSENBERRY T. L.; SUSSMAN J. L.; Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chem. Biol. Interact**, v. 187, p.10-22, 2010.

ELATI C. R.; KOLLA N.; RAO CHALAMALA S.; VANKAWALA P. J.; SUNDARA V.; VURIMIDI H.; MATHAD V. T. New Synthesis of Donepezila Through Palladium-Catalyzed Hydrogenation PPAroach. **Synth. Commun.**, v. 36 (2), p. 169-174, 2006.

ELLMAN, G. L., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, p. 88-95, 1961.

ENGEN, W.; O'BRIEN, T.E.; KELLY, B.; DO, J.; RILLERA, L.; STAPLETON, L.K.; YOUNGREN, J.F.; ANDERSON, M. O. Synthesis of aryl-heteroaryl ureas (AHUs) based on 4-aminoquinoline and their evaluation against the insulin-like growth factor receptor (IGF-1R). **Bioorg. Med. Chem.**, v.18 (16), p.5995-6005, 2010.

FINDEIS, M. A. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. **Pharmacol. Ther.**, v.116, p.266–286, 2007.

FLAJOLET, M.; HE, G.; HEIMAN, M.; LIN, A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.; Regulation of Alzheimer's disease amyloid-β formation by casein kinase I. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.104(10), p.4159-4164, 2007.

GANT T. G., SARSHAR S., SHAHBAZ M.M .Indanone Inhibitors of acetylcholinesterase. **U.S. Pat. Appl 2010/0143505A1**.

GARCÍA-PALOMERO, E.; MUÑOZ, P.; USAN, P.; GARCIA, P.; DE AUSTRIA, C.; VALENZUELA, R.; RUBIO, L.; MEDINA, M.; MARTÍNEZ, A. Potent β-AmyloidModulators. **Neurodegener. Dis.**, v.5, p. 153–156, 2008.

GIACOBINI E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacol. Res.**, v.50, p.433–440, 2004.

GIUNTA, B.; FERNANDEZ, F.; NIKOLIC, W. V.; OBREGON, D.; RRAPO, E.; TOWN, T.; TAN, J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **J. Inflammation**, v. 5, p.51, 2008.

GOTZ, J. & ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nat. Rev. Neurosci.,** v.9, p.532-544, 2008.

GUPTA S.; MOHAN C. G. 3D-pharmacophore model based virtual screening to identify dual-binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors, **Med. Chem. Res.**, v.20, p.1422–1430, 2011.

HAINES ALAN H., Methods for the oxidation of organic compounds, Alcohols, Alcohol Derivatives, Alkyl Halides, Nitroalkanes, Alkyl Azides, Carbonyl compounds, Hydroxyarenes and Aminoarenes. **Best Synthetic Methods**. Academic Press, 1988.

HARIG M.; KUCK D. The first Centro hexaindane bearing twelve functional groups at its outer molecular periphery and related lower veratrole-derived centropolyindanes. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 1647-1655, 2006.

HENEKA, M.T.; O'BANION, M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J. Neuroimmunol.**, v.184, p. 69, 2007.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.16, p.358-372, 2015.

HOFFMANN G. R.; DESCHÊNES S.M.; MANYIN T.; FUCHS R. P.P. Mutagenicity of acridines in a reversion assay based on tetracycline resistance in plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. **Mutation. Research.** v. 351, p. 33-43, 1996.

HUANG L.; LU C.; SUN Y.; MAO F.; LUO Z. SU T.; JIANG H.; SHAN W.; LI X. Multitarget-directed benzylideneindanone derivatives: anti-β-amyloid (Aβ) aggregation, antioxidant, metal chelation, and monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition properties against Alzheimer's disease. **J. Med. Chem.** v. 55(19), p. 8483-92, 2012.

INESTROSA N.C.; MUÑOZ J. F. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid L-peptide aggregates is dependent on the type of AL peptide and the AChE concentration present in the complexes. **FEBS Letters**, v. 450, p.205-209, 1999.

IQBAL K.; LIU F.; GONG C.; GRUNDKE-IQBAL I.Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. **Curr. Alzheimer Res.**, v.7(8), p. 656–664, 2010.

JOHNSON G. & MOORE S.W. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. **Curr. Pharm. Design.**, v. 12, p.217-225, 2006.

JUNIOR L.F.S. Oxidações- IQ-USP, 2012. Dísponível em: http://www.iq.usp.br/luizfsjr/QFL5928_2012_04_Oxidacao.pdf. Acessado em: 21 junho 2014.

KAMIYA S.; SUEYOSHI S.; MIYAHARA M.; YANAGIMACHI K.; NAKASHIMA T.; Synthesis of 4- azidoquinoline 1 oxides and related compounds. **Chem. Pharm. Bull.**, v.28 (5), 1485-1490, 1979.

KANSY M., SENNER F, GUBERNATOR K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. **J. Med. Chem.**, v. 41, n.7, 1998

KÖHLER M., MACHILL S., SALZER R., KRAFFT C. Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v.393 (5), p.1513-1520, 2009.

KORABECNY J.; DOLEZAL R.; CABELOVA P.; HOROVA A.; HRUBA E.; RICNY J.; SEDLACEK L.; NEPOVIMOVA E.; SPILOVSKA K.; ANDRS M.; MUSILEK K., OPLETALOVA V., SEPSOVA V., RIPOVA D., KUCA K.. 7-MEOTA–donepezila like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 82, p. 426-438, 2014.

KURET, J.; JOHNSON, G. S.; CHA, D.; CHRISTENSON, E. R.; DEMAGGIO, A. J.; HOEKSTRA, M. F.; J. Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. **Neurochem.**,v. 69(6), p. 2506-15, 1997.

LANNFELT L.; RELKIN N. R.; SIEMERS E. R. Amyloid-ß-directed immunotherapy for Alzheimer's disease. **J. Intern. Med.,** v. 275, p.284–295, 2014.

LANSDALL C. J. An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. **Biosci. Horiz.,** v.7, p.1-11, 2014.

LATHER, V.; KRISTAM, R.; SAINI, J. S.; KRISTAM, R.; KARTHIKEYAN, N.A.; BALAJI, V.N.; QSAR Models for Prediction of Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitory Activity of Indirubin Derivatives. **QSAR Comb. Sci**.,v. 27(6), p.718-728, 2008.

LIN G.L.; LAI C.Y.; LIAO W.C. Molecular recognition by acetylcholinesterase at the peripheral anionic site: Structureactivity relationships for inhibitions by aryl carbamates. **Bioorg. Med. Chem.,** v.7, p.2683-2689, 1999.

LIU C.; KANEKIYO T.; XU H.; BU G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. **Nat. Rev. Neurol.**, v.9 (2), p.106-118, 2013.

LUO W. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, (2), p. 763-770, 2011.

LYNNETTE R. F.; WILLIAM A. D. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators (Review). **Mutat. Res.,** v.623, p.14–23, 2007.

MARELLA A.; TANWAR O. P.; SAHA R.; ALI M. R.; SRIVASTAVA S.; AKHTER M.; SHAQUIQUZZAMAN M.; ALAM M. M. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharm. J.,** v. 21 (1), p. 1–12, 2013.

MARTÍNEZ A.; FERNÁNDEZ M.; ESTÉVEZ J.C.; ESTÉVEZ R.J.; CASTEDO L. Studies on the chemistry of 2-(2-oxo-3-phenylpropyl)-benzaldehydes: novel total synthesis of 3-phenylnaphthaleno-2-ols and 2-hydroxy-3-phenyl-1,4-naphthoquinones. **Tetrahedron,** v.61, p. 485-492, 2004.

MARTORANA A.; ESPOSITO Z.; KOCH G. Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer's Disease? **CNS Neurosci. Ther.,** v.16, p.235–245, 2010.

MATOS C.R.R.; LOPES R. S.C; LOPES C.C.; Synthesis of 1-deoxinofirimycin and n-butyl-1-deoxynojirimycin. **Synthesis**, v.4, p. 571-573, 1999.

MEHTA M.; ADEM A.; SABBAGH M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **Int. J. Alzheimers Dis**., v. 2012, Article ID 728983, 8 pages, 2012.

MEYER, S.D. & SCHREIBER, S.L**. J.Org. Chem**. v.59, p. 7549, 1994.

MORE J.D & FINNEY N.S. A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with o- iodoxybenzoic acid (IBX). **Org. Lett.**, v.4(17), p.3001-3003, 1999.

MUÑOZ-RUIZ, P.; RUBIO, L.; GARCÍA-PALOMERO, E.; DORRONSORO, I.; DEL MONTE-MIL , M.; VALENZUELA, R.; US AN, P.; DE AUSTRIA, C.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; BIDON-CHANAL, A.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J.; MEDINA, M.; MARTÍNEZ, A. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: New Disease-Modifying Agents for Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem**., v. 48, p. 7223–7233, 2005.

MUÑOZ-TORRERO & CAMPS. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. **Curr. Med. Chem.,** v. 13, p. 399-422, 2006.

NAINI S. A. & SOUSSI-YANICOSTAS N. Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? **Oxid. Med. Cell. Longev.,** v.2015, Article ID 151979, p.1-17, 2015.

NIPHADE N.; MALI A.; JAGTAP K.; OJHA R. C.; VANKAWALA P. J.; MATHAD V. T. AN improved and efficient process for the production of donezepil hidrochloride: substitution of sodium hidroxide for *n*-butyl lithium via phase transfer catalysis. **Org. Process. Res. Dev.**, v. 12, p. 731-735, 2008.

NG Y. P.; OR T. C. T.; IP N. Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochem. Int.** v.89, p.260-270, 2015.

PAUL S.; JEON W. K.; BIZON J. L. Han J. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Front. Aging. Neurosci .**, v.7 (43), 2015.

PAULA V. J. R. DE; GUIMARÃES F. M.; FORLENZA O. V. The role of TAU protein in the pathophysiology of frontotemporal dementia. **Rev. Psiq. Clín.,** v. 36(5), p.197-202, 2009.

PATOCKA J., JUN D., KUCA K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. **Curr. Drug. Metab**., v.9(4), p.332-5, 2008.

PEREZ S.E.; DAR S.; IKONOMOVIC M.D.; DEKOSKY S.T.; MUFSON E.J. Cholinergic Forebrain Degeneration in the PPAswe/PS1ΔE9 Transgenic Mouse. **Neurobiol. Dis**., v.28(1), p.3-15, 2007.

PÉREZ B. C., TEIXEIRA C., FIGUEIRAS M. , GUT J. , ROSENTHAL P. J., GOMES J. R. B., GOMES P. Novel cinnamic acid/4-aminoquinoline conjugates bearing non-proteinogenic amino acids: towards the development of potential dual action antimalarials. **Eur. J. Med. Chem.** v.54, p.887-899, 2012.

PÉREZ-MELERO C.; MAYA A.B.S; DEL REY B.; PELÁEZ R.; CABALLERO E.; MEDARDE M.L. A new family of quinoline and quinoxaline analogues of combretastatins. **Bioorg. Med. Chem. Lett.,** v.1, p.3771–3774, 2004.

PERNECZKY R.; ALEXOPOULS P.; KURZA. Soluble amyloid precursor proteins and secretases as Alzheimer's disease biomarkers. **Trends. Mol. Med.**, v. 20(1), p.8-15, 2014.

PERRONI, G.G.G., **Capacidade functional de indivíduos idosos portadores da doença de Alzheimer.** Dissertação, Programa de Pós-graduação do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 14 janeiro 2016.

PETRONILHO DA C. E.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e GUERRA QUÍMICA. **Ciência e Tecnologia**, v.3, 2011.

PLOBECK N.; DELORME D.; WEI ZHONG-YONG; YANG H.; ZHOU F.; SCHWARZ P.; GAWELL L.; GAGNON H.; PELCMAN B.; SCHMIDT R.; YUE S. Y.; WALPOLE C.; BROWN W.; ZHOU E.; LABARRE M.; PAYZA K.; ST-ONGE S.; KAMASSAH A.; PIERRE-EMMANUEL M.; PROJEAN D.; DUCHARME J.; ROBERTS E. New Diarylmethylpiperazines as Potent and Selective Nonpeptidic δ Opioid Receptor Agonists with Increased In Vitro Metabolic Stability. **J. Med. Chem.**, v.43, p.3878-3894, 2000.

PHIEL, C. J.; WILSON, C. A.; LEE, V. M.; KLEIN, P. S.; GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Nature**, v.423, p.435- 439, 2003.

POTTHAST A.; ROSENAU T.; CHEN C.L.; GRATZL J. S. Selective Enzymic Oxidation of Aromatic Methyl Groups to Aldehydes. **J. Org. Chem.**, v.60 (14), p. 4320–4321, 1995.

RAMPA, A.; BISI, A.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; VALENTI, P.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V.; CAVALLI, A.; RECANATINI, M. Acetylcholinesterase inhibitors for potential use in Alzheimer's disease: molecular modeling, synthesis and kinetic evaluation of 11H-indeno-[1,2-b]-quinolin-10-ylamine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, p.497-506, 2000.

REICHMAN W.E. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. **Ann. Gen. Hosp. Psychiatry,** v. 2, p.1–14, 2003.

RIZZO S.; RIVIÈRE C.; PIAZZI L.; BISI A. S.; BARTOLINI M.; ANDRISANO V.; MORRONI F.; TAROZZI A.; MONTI JEAN-PIERRE; RAMPA A. Benzofuran-Based Hybrid Compounds for the Inhibition of Cholinesterase Activity, *β* Amyloid Aggregation, and A*β* Neurotoxicity**. J. Med. Chem.,** v.51, p.2883–2886, 2008.

RIZZO S.; BARTOLINI M.; CECCARINI L.; PIAZZI L.; GOBBI S.; CAVALLI A.; RECANATINI M.; ANDRISANO V.; RAMPA A.Targeting Alzheimer's disease: Novel indanone hybrids bearing a pharmacophoric fragment of AP2238. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p. 1749–1760, 2010.

ROCHA-GONZÁLEZ, H.I.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; GRANADOS-SOTO, V.; Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci. Ther**, v.14, p.234, 2008.

SEYDEN-PENNE J. Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis Second Edition, Wiley-VCH, 1997.

SHAO D.;ZOU C.;LUO C.; TANG X.; LI Y.; Synthesis and evaluation of tacrine–E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem. Lett**., v.14, (18),p.4639-4642, 2004.

NISHIMURA S. Handbook of heterogeneous catalytic hydrogenation for organic synthesis, ISBN 0-471-39698-2, 2001.

SILVA C.H.; CAMPO V.L.; CARVALHO I.; TAFT C.A. Molecular modeling, docking and ADMET studies PPAlied to designed of a novel hybrid for treatment of Alzheimer´s disease. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 25, p.169-175, 2006.

SILVA T.; REIS J.; TEIXEIRA J.; BORGES F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Aging Res. Rev.,** v.15, p.116–145, 2014.

SIMEON-RUDOLF R.; KOVARIK Z.; RADIC Z.; REINER E. Reversible inhibition of acetylcholinesterase by 4,4′-bipyridine and by a coumarin derivative. **Chem. Biol. Interact.**, p.119-120, 1999.

SMITH, M.A.C, Doença de Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr**., v.21, s.2, 1999.

EISAI CO., Ltd.(Japan) SUGIMOTO H.; TSUCHIYA Y.; HIGURASHI K.; KARIBE N.; LIMURA Y.; SASAKI A.; YAMANASHI Y.; OGURA H.; ARAKI S.K. M.; KOSASA T.; KUSOTA A.; KOZASA M.; YAMATSU K. 1,4-Substituted piperidines as acetylcholinesterase inhibitors and their use for the treatment of Alzheimer's disease, **Pat. EP0296560**, 1996.

SUGIMOTO H.; IIMURA Y.; YAMANISHI Y.; YAMATSU K. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride (E2020) and related compounds, **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v.2 (8), p. 871-876, 1992.

SUGIMOTO H.; IIMURA YO.; YAMANISH Y.; YAMATSU. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-Benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl] piperidine hydrochloride and related compounds, **J. Med. Chem.,** v. 38 (24), p. 4821-4829, 1995.

TAGAWA Y.; YAMASHITA K.; HIGUCHI Y.; GOTO Y. Improved oxidation of active methyl group of N-heteroaromatic compouns by selenium dioxide in the presence of tert-butyl hidroperoxide. **Heterocycles**, v. 60(4), p. 953-957, 2003.

TELL V. & HIGEROTH A. AD-relevant protein kinase inhibitors. **Front. Cell. Neurosci.**, v.7 (Article 189), p.28-33, 2013.

TROST, B.M; LATIMER, L.H. Generation and alkylation of dianion (homoenolate) of a 1-indanone. **J. Org. Chem.**, v. 42, p.3213, 1977.

VAN ASPEREN, J.; MAYER, U.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J. H. The Functional Role of P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier. **J. Pharm. Sciences**, v. 86 (8), p.881-884, 1997.

VASSAR, R. BACE-1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. **Alzheimers Res. Ther.**, v.6, p.1-14, 2014.

VERMA M, VATS A, TANEJA V. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. **Ann. Indian. Acad. Neurol**. v.18(2), p.138-145, 2015.

VIELHABER, E.; VIRSHUP, D.M.; Casein kinase I: From obscurity to center stage. **IUBMB Life**, v.51(2), p.73-78, 2001.

YAN J.W. Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as dual inhibitors for acetylcholinesterase and amyloid beta aggregation. **Bioorg. Med. Chem.,** v. 20 (8), p. 2527–2534, 2012.

ZABORSZKYY L.; POL A. VAN DEN; GYENGESI E. The Basal Forebrain Cholinergic Projection System in Mice. **The Mouse Nervous System**, chapter 28, p.684-709, 2012.

ZHANG S.; WANG T., BEITZ D., Soy Lecithin but Not Egg Lecithin Decreased the Plasma Cholesterol Concentration in Golden Syrian Hamsters. **A.S. Leaflet R2080**, http://www.ans.iastate.edu/report/air/2006pdf/R2080.pdf

ZAWADZKA A.; LOZIN´SKA I.; MOLE DA Z.; PANASIEWICZ M.; CZARNOCKI Z. Highly selective inhibition of butyrylcholinesterase by a novel melatonin–tacrine heterodimers. **J. Pineal Res.**, v.54, p.435–441, 2013.

ZHU C. JIANG L.,CHEN T.-M., HWANG K.-K., A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **Eur. J. Med. Chem.** v.37 (5), p. 399-407, 2002.

XU H., WOLF C., Efficient copper-catalyzed coupling of aryl chlorides, bromides and iodides with aqueous ammonia. **Chem. Commun**., p.3035-3037, 2009.

WEINREB O.; AMIT T.; BAR-AM O.; YOUDIM M. B. H. REVIEW Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and β-amyloid in ageing and Alzheimer's disease. **Br. J. Pharmacol.**, 2015.

WORLD ALZHEIMER REPORT, 2015. Disponível em:< http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>. Acesso em: 20 dezembro 2015.

WOODGETT, J. R., Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **Embo J.,**v. 9(8), p.2431-2438, 1990.

www.nia.nih.gov/alzheimer. Acesso em 20 janeiro 2016.

www.organic-chemistry.org. Acesso em 17 novembro 2015.