

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

Enzimas Co-imobilizadas na triagem de ligantes duplo-alvo: estudo de condições

Vitor Eduardo Narciso dos Reis

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para a
obtenção do título de mestre em
Ciências

Área de concentração:
Química

Ribeirão Preto

2021

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

Enzimas Co-imobilizadas na triagem de ligantes duplo-alvo: estudo de condições

Versão Corrigida

Vitor Eduardo Narciso dos Reis

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para a
obtenção do título de mestre em
Ciências

Área de concentração: Química

Orientadora: Prof^a Dra. Carmen Lúcia Cardoso

Ribeirão Preto

2021

Resumo

Narciso dos Reis, VE. Enzimas Co-imobilizadas na triagem de ligantes duplo-alvo: estudo de condições. 2021. 68f. Dissertação de mestrado- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

As enzimas β -secretase1 (BACE1) e acetilcolinesterase (AChE), são enzimas diretamente relacionadas ao desenvolvimento de doenças neurológicas como a Doença de Alzheimer (DA) e são alvos biológicos relevantes no desenvolvimento de novos fármacos para tais enfermidades. Nesse contexto, os inibidores enzimáticos representam uma importante estratégia de tratamento e a identificação de compostos que apresentem seletiva capacidade inibitória e baixo efeito colateral é um paradigma do desenvolvimento de novos fármacos para DA. Os tratamentos disponíveis para DA limitam-se ao uso de inibidores da AChE eficientes em fases iniciais da doença. A complexidade e multifatorialidade da DA tem levado ao entendimento sobre a necessidade de identificação de inibidores que atuem em múltiplos alvos biológicos, o que demanda o desenvolvimento de ensaios que possam contribuir no entendimento do mecanismo inibitório na presença desses múltiplos alvos. A identificação de compostos com atividade biológica seja de origem sintética ou a partir de misturas complexas como os extratos naturais é uma etapa crucial no desenvolvimento de fármacos e altamente dependente de triagem desses compostos através de ensaios robustos, eficientes e confiáveis. Nesse contexto, esse trabalho apresenta o estudo das condições no desenvolvimento de um método on-line de triagem de ligantes monitorando a modulação da atividade catalítica utilizando as enzimas BACE-1 e AChE covalentemente co-imobilizadas em suportes sólidos (suporte-AChE-BACE-1). Após a co-imobilização a determinação de constantes cinéticas (K_{mapp}) e potência inibitória (IC_{50}), de ambas enzimas demonstrou a eficiência da imobilização ao não ser observado comprometimento na conformação ativa das enzimas nem prejuízo às suas atividades catalíticas. O método qualificado foi aplicado na triagem de 60 amostras de origem sintética e os resultados comparados à triagem utilizando as mesmas enzimas imobilizadas individualmente. Foram observadas diferenças nas porcentagens de inibição obtidas durante a triagem. Por exemplo, o composto PQM-185 inibiu em maior porcentagem a BACE1 imobilizada individualmente do que a BACE1 co-imobilizada com a AChE. São necessárias a determinação de mais constantes cinéticas como constante de inibição e de dissociação para descobrir a origem destas diferenças. Uma estratégia para triagem de ligantes em amostras complexas como extratos naturais envolve o uso da afinidade desses ligantes pela biomolécula, diminuindo o número de candidatos e o tempo despendido nessa etapa. Nesse contexto, foi

desenvolvido um método de pesca de ligantes *off-line* com as enzimas BACE-1 e AChE covalentemente co-imobilizadas em partículas magnéticas (MB). Nesse método, após a incubação da amostra com as enzimas MB-AChE-BACE-1, são realizadas etapas de limpeza onde os compostos com afinidade baixa permanecem no sobrenadante e etapas de extração subsequentes nas quais os compostos com maior retenção são removidos utilizando-se uma porcentagem de solvente orgânico. O método foi qualificado com inibidores avaliados no ensaio de atividade realizado no capilar AChE-BACE1, e aplicado em extratos de origem natural onde foi possível observar ligantes presentes na etapa de extração. As enzimas immobilizadas em partículas apresentaram alta atividade e estabilidade durante o armazenamento por 2 meses.

Palavras chave: Doença de Alzheimer, co-imobilização enzimática, ensaio de pesca de ligantes, triagem dual-alvo, Acetilcolinesterase, β -secretase.

Abstract

Narciso dos Reis,VE. Co-immobilized enzymes for screening ligands dual-target: Study of conditions. 2021 67f. Dissertação de mestrado- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

The β -secretase1 (BACE1) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes are enzymes directly related to the development of neurological diseases such as Alzheimer's Disease (AD) and are relevant biological targets in the development of new drugs for such diseases. In this context, enzyme inhibitors represent an important treatment strategy and the identification of compounds that present selective inhibitory capacity and low side effects is a paradigm for the development of new drugs for AD. Available treatments for AD are limited to the use of effective AChE inhibitors in early stages of the disease. The complexity and multifactorial nature of AD has led to the understanding of the need to identify inhibitors that act on multiple biological targets, which requires the development of assays that can contribute to the understanding of the inhibitory mechanism in the presence of these multiple targets. The identification of compounds with biological activity, whether of synthetic origin or from complex mixtures such as natural extracts, is a crucial step in drug development and highly dependent on screening these compounds through robust, efficient and reliable assays. In this context, this work presents the study of conditions in the development of an online method for screening ligands monitoring the modulation of catalytic activity using BACE-1 and AChE enzymes covalently co-immobilized on solid supports (support-AChE-BACE- 1). After co-immobilization, the determination of kinetic constants (K_{mapp}) and inhibitory potency (IC_{50}) of both enzymes showed the efficiency of immobilization as there was no impairment in the active conformation of the enzymes or damage to their catalytic activities. The qualified method was applied to the screening of 60 samples of synthetic origin and the results compared to screening using the same immobilized enzymes individually. Differences were observed in the percentages of inhibition obtained during the screening, as for example the compound PQM-185 inhibited BACE1 individually immobilized in greater percentage than BACE1 co-immobilized with AChE. More kinetic constants such as inhibition and dissociation constants are needed to discover the origin of these differences. A strategy for screening for ligands in complex samples such as natural extracts involve using the affinity of these ligands for the biomolecule, reducing the number of candidates and the time spent in this step. In this context, an offline ligand fishing method was developed with BACE-1 and AChE enzymes covalently co-immobilized on magnetic particles. In this method, after incubation of the sample with the

enzymes, cleaning steps are performed where compounds with low affinity remain in the supernatant and extraction steps where the retained compounds are removed using a percentage of organic solvent. The method was qualified with inhibitors evaluated in the capillaries, and applied in extracts of natural origin where it was possible to observe binders present in the extraction step. Enzymes immobilized on particles showed high activity and stability during storage for 2 months.

Keywords: Co-immobilization, ligand-fishing, dual-target, Alzheimer's Disease. Acetylcholinesterase, β -secretase .

1. Introdução

As enzimas desempenham um papel importante em processos biológicos complexos, participando de mecanismos patofisiológicos em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, que tem como consequência a demência (SCHELTENS et al., 2016). Durante a progressão da doença ocorre a degradação da transmissão colinérgica, um processo mediado pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) e o neurotransmissor Acetilcolina (ACh), além do surgimento de agregados insolúveis e emaranhados neurofibrilares neurotóxicos formados a partir da clivagem da proteína precursora amilóide pela enzima Betasecretase1 (BACE1) (HAMPEL et al., 2021). Por estes motivos, essas proteínas tornam-se alvos biológicos para o tratamento da doença através do desenvolvimento e utilização de inibidores enzimáticos, compostos capazes de reduzir a atividade enzimática (ZHANG et al., 2019). Para a identificação desses novos compostos é importante o desenvolvimento de ensaios enzimáticos rápidos e automatizados, chamados de triagem de alta eficiência (*high throughput screening*-HTS). Esses ensaios tem se tornado o foco em estratégias de monitoramento para detectar o maior número de substâncias biologicamente ativas, gerando informações sobre a interação entre a enzima e o ligante (CARDOSO et al., 2009).

Diferentes abordagens de ensaios enzimáticos do tipo HTS são utilizadas, sendo a maioria em formato multi-poços e uso das enzimas livres em solução utilizando como detecção a fluorescência e absorvância (HERGENROTHER, 2006; HOUSTON; BANKS, 1997). Esses ensaios possuem algumas limitações, como a pouca compatibilidade das enzimas com solventes orgânicos, baixa estabilidade, custo elevado do ensaio devido a etapa de purificação da enzima tornando-os pouco viáveis para triagem de alta eficiência (DE MORAES et al., 2016; DE MORAES et al., 2014).

A cromatografia de bioafinidade (CB) é uma das metodologias analíticas que vêm sendo utilizada para estudos na triagem e avaliação das interações entre a enzima e o ligante de interesse, eliminando os problemas encontrados nos ensaios em solução. A técnica faz uso de um agente de ligação específico, que possua interesse biológico (enzimas, anticorpos, etc), imobilizado em um suporte sólido para construção de um biorreator. Esse biorreator é acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e um detector como UV ou a um espectrômetro de massas (MS) ((GUO et al., 2019; KIM; WAINER, 2008; KOOL et al., 2011; SARRIA et al., 2016; SEIDL et al., 2019) Essa combinação de técnicas analíticas possibilita o desenvolvimento de ensaios de triagem de compostos sintéticos e a descoberta de

novos ligantes a partir de extratos de plantas (CAO et al., 2018; DENG et al., 2017; MA et al., 2018).

A maioria dos ensaios enzimáticos descritos na literatura utilizam a imobilização de apenas um alvo (CALIL et al., 2016; LI et al., 2020; YE; ZHANG; CAO, 2021). No entanto, devido a multifatorialidade de doenças, têm-se desenvolvido compostos sintéticos ou identificado ligantes de produtos naturais capazes de modular mais de um alvo biológico (CHEN et al., 2017; DENG et al., 2017; RAGHAVENDRA et al., 2018). Para que se possa estudar esses novos compostos é fundamental expandir as técnicas de ensaios HTS que atualmente utilizam os ensaios desenvolvidos com enzimas individuais. Nesse contexto, surge a técnica de co-imobilização em que é realizada a retenção de duas ou mais enzimas em um mesmo suporte permitindo o desenvolvimento de sistemas multi-enzimáticos como alternativa para os ensaios com os alvos separados (BETANCOR et al., 2017; SCHOFFELEN; VAN HEST, 2013).

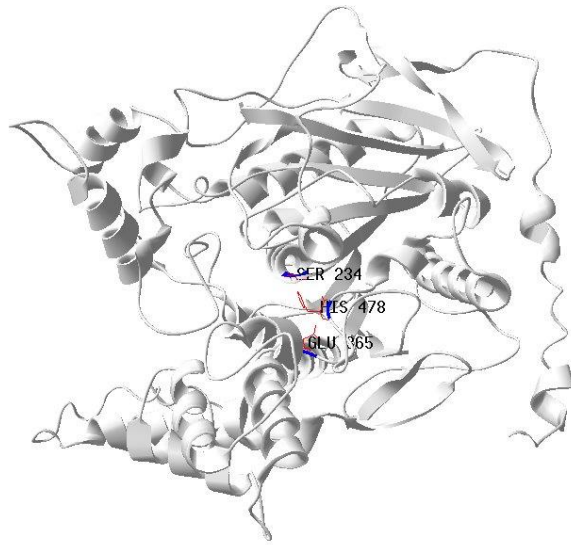
Dada a importância do tema, neste trabalho o ensaio on-line multi-alvo com as enzimas acetilcolinesterase humana e a beta-secretase co-imobilizadas(VILELA et al., 2021) foi avaliado e aplicado na triagem de ligantes sintéticos. Além disso, foi desenvolvido um método de bioafinidade, conhecido como *ligand fishing*, ou pesca de ligantes, para identificação de ligantes por bioafinidade em extratos naturais.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A enzima Acetilcolinesterase

A enzima Acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) é uma hidrolase encontrada no sistema nervoso central (SNC) e é responsável pela hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina (ACh) (ARAÚJO et al., 2016). A Acetilcolinesterase humana (Figura 1) é um dímero de massa molecular de 60kD e em suas subunidades catalíticas há a presença de um sítio iônico para interação entre a carga negativa do resíduo de aminoácido aspartato e a carga positiva do nitrogênio da Acetilcolina e um sítio esteárico onde ocorre a ligação de hidrogênio entre o éster do neurotransmissor e o resíduo de tirosina da enzima(ARAÚJO et al., 2016).

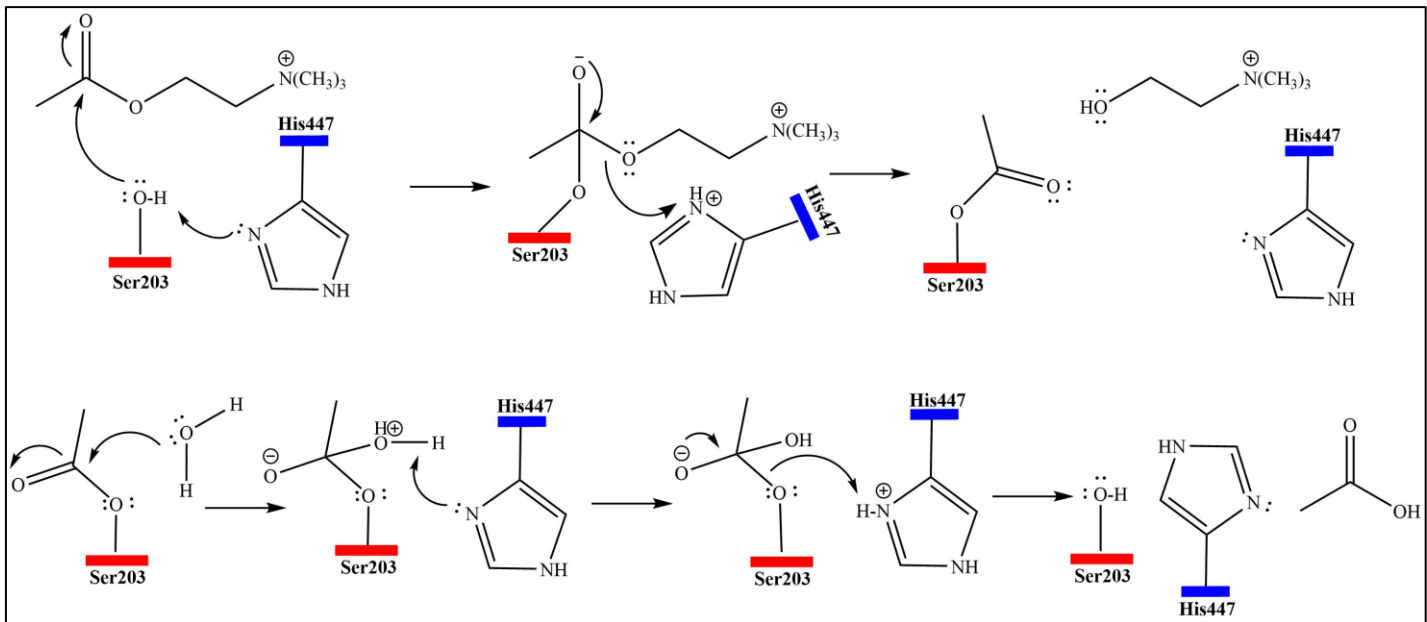
Figura 1: Estrutura tridimensional da enzima Acetilcolinesterase com os resíduos de aminoácidos Serina, Histidina e Ácido glutâmico destacados.



Fonte: Modelagem da estrutura tridimensional: PHYRE 2.0. Análise da estrutura tridimensional: Swiss-PdbViewer.

O mecanismo de catálise consiste em uma acetilação/desacetilação. Na primeira etapa, após a chegada da acetilcolina no sítio ativo da enzima acontece um ataque nucleofílico pelo par de elétrons da hidroxila do resíduo de aminoácido de serina, enquanto a histidina age como uma base removendo o próton do íon hidroxônio formado e em sequência este próton é transferido para a serina acarretando na liberação do primeiro produto que é a colina. Entretanto, a enzima permanece acetilada e para que ocorra seu sítio ativo seja regenerado para a próxima catálise acontece a segunda etapa que é a desacetilação, onde acontece uma hidrólise com uma molécula de água agindo como nucleófilo e posterior liberação do ácido acético (ARAÚJO et al., 2016) (Figura 2).

Figura 2: Mecanismo de catálise da hidrólise da acetilcolina no sítio ativo da Acetilcolinesterase pelos resíduos de Histina e Serina.

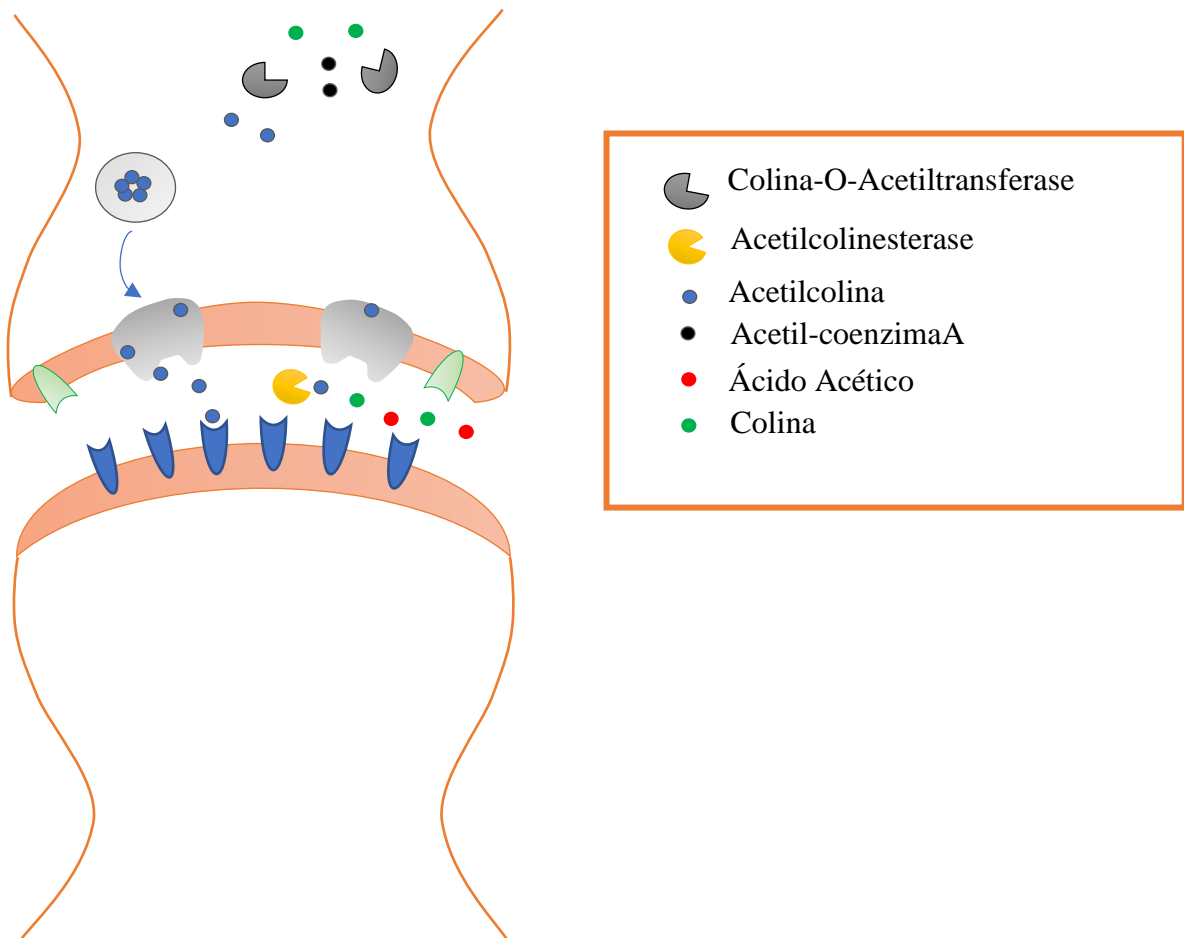


Fonte: Adaptado de (ARAÚJO et al., 2016)

2.2 Doença de Alzheimer e a hipótese colinérgica

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença neurodegenerativa que atinge cerca de 40 milhões de pessoas acima dos 60 anos, com estimativa de dobro de casos para o ano de 2050 (SCHELTENS et al., 2016). É uma doença responsável por acarretar problemas funcionais que atrapalham atividades básicas diárias como cozinhar, ler, formar frases durante a comunicação; dificuldades associadas às constantes perdas de memória e cognição. (KUMAR et al., 2015). Uma das hipóteses para a doença é a denominada hipótese colinérgica e está associada à diminuição do neurotransmissor acetilcolina nos neurônios colinérgicos que são danificados no prosencéfalo basal no sistema nervoso central (SCN). Neurotransmissores como a Acetilcolina são fundamentais como mediadores químicos em sinapses no sistema nervoso central e periférico. (MARUCCI et al., 2021). A acetilcolina é sintetizada pela enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAt) a partir de acetil-coenzima A e Colina e então armazenada em vesículas sinápticas, para ser liberada por exocitose na fenda sináptica para interagir com os receptores colinérgicos. A ação da acetilcolina termina quando ela é hidrolisada em acetato e colina pela enzima Acetilcolinesterase (VENTURA et al., 2010) (figura 3).

Figura 3: Representação da síntese e hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina.

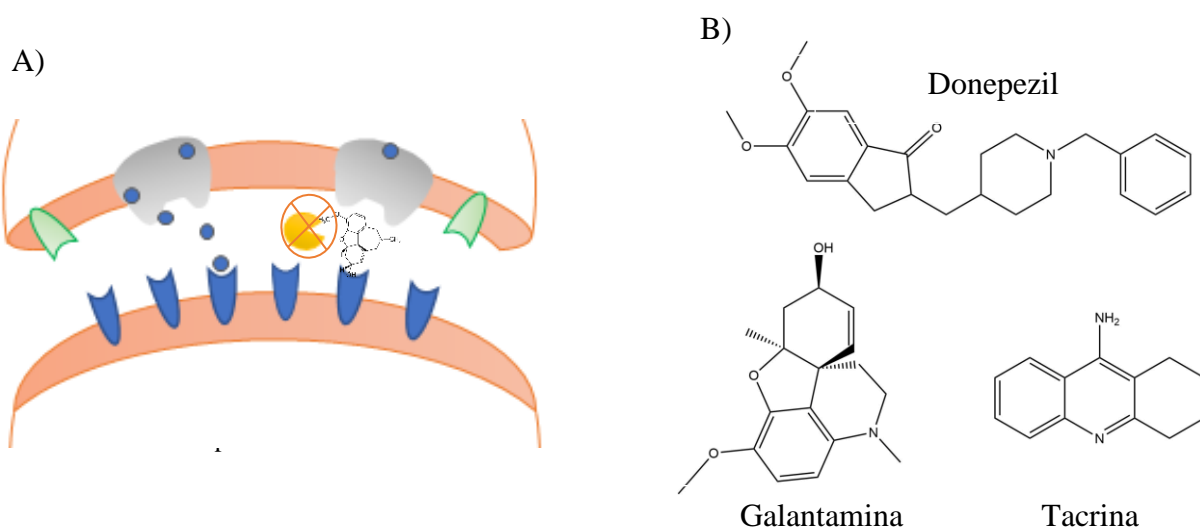


Fonte: Elaborado pelo autor

Como estratégia para recuperar a transmissão colinérgica, compostos denominados anticolinesterásicos são utilizados para diminuir a atividade catalítica da Acetilcolinesterase (figura 4-A) para que o neurotransmissor permaneça por mais tempo na fenda sináptica e diminuindo a progressão da doença.(ARYA et al., 2021). A pesquisa para o desenvolvimento de inibidores para o tratamento da AD, tem se intensificado ao longo dos anos. Entretanto a eficiência destes compostos está relacionada com sua propriedade farmacocinética adequada, sua ligação com o sítio ativo da enzima com uma afinidade satisfatória, além do requisito de ter lipofilicidade e tamanho necessário para permear a barreira hematoencefálica sem perder a potência inibitória (PRATI et al., 2018).

Os inibidores utilizados como fármacos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Agência federal dos Estados Unidos (FDA), Galantamina, Donepezil e Tacrina (figura 4-B) são utilizados como tratamento sintomático de condições do paciente como a perda de memória, mas são ineficientes para impedir o progresso e curar a doença (ZHANG et al., 2019). Como desvantagem esses fármacos apresentam efeitos colaterais aos pacientes, como hepatotoxicidade, vômitos e diarreia.(VENTURA et al., 2010)

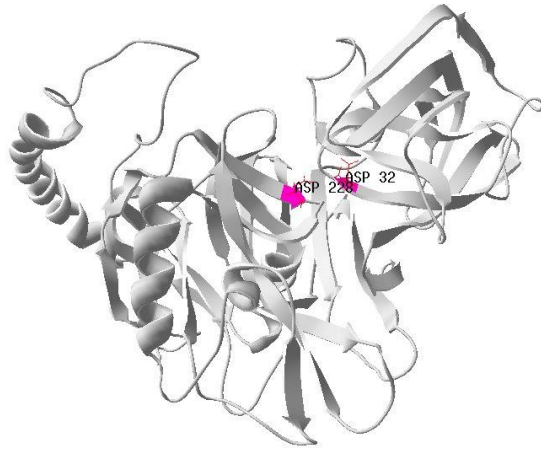
Figura 4: Estratégia utilizada para permanência prolongada do neurotransmissor ACh na fenda sináptica. **A)** Inibição da enzima e **B)** Compostos aprovados como inibidores da acetilcolinesterase.



2.3. Beta-secretase e a hipótese amilóide.

A Beta-Secretase1 (BACE1) é uma enzima aspartil protease integral de membrana(Figura 5) presente em invertebrados que participa da clivagem de uma proteína precursora amilóide(APP) (VENUGOPAL et al., 2008). A APP é expressa em neurônios e encontrada nas fendas sinápticas. Sua função está relacionada à neurotransmissão, equilíbrio entre excitação e inibição e manutenção dos dendritos e plasticidade sináptica.

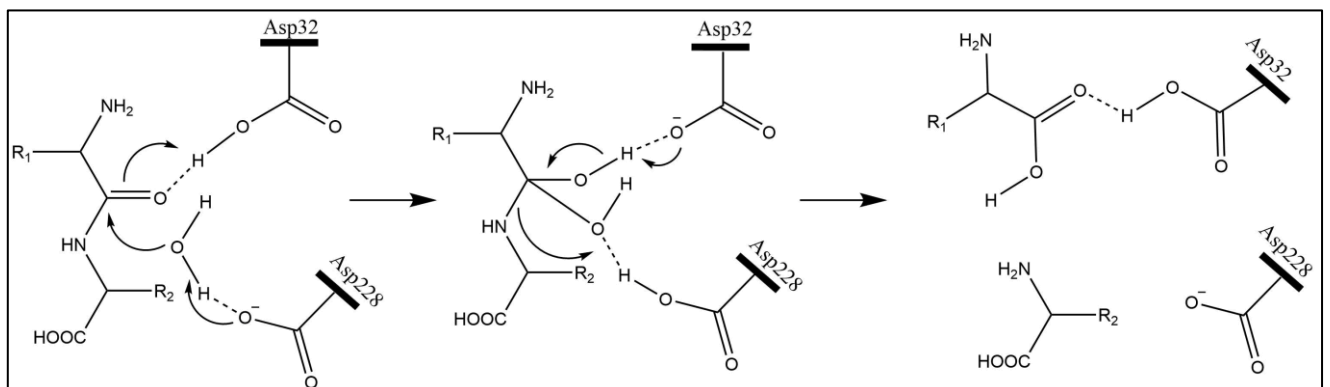
Figura 5: Estrutura tridimensional da BACE1.



Fonte: Modelagem da estrutura tridimensional: PHYRE 2.0. Análise da estrutura tridimensional: Swiss-PdbViewer.

O sítio ativo da BACE contém dois resíduos de aspartato (Asp32, Asp228) que são fundamentais para a catálise pelo mecanismo ácido base (Figura 6). No mecanismo proposto para a hidrólise do peptídeo em A, o aspartato 228 desprotonado age como uma base abstraindo um próton da água originando um íon hidroxila que em seguida fará um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila., enquanto o Asp32 protonado age como ácido doando o próton ao oxigênio para gerar um intermediário tetraédrico. Em B, o Asp228 age como ácido doando um próton para o nitrogênio da amida presente no peptídeo e simultaneamente o Asp32 que agora age como base abstrai o próton da hidroxila do intermediário levando a clivagem da ligação do peptídeo gerando o N-terminal e C-terminal (BARMAN; PRABHAKAR, 2013).

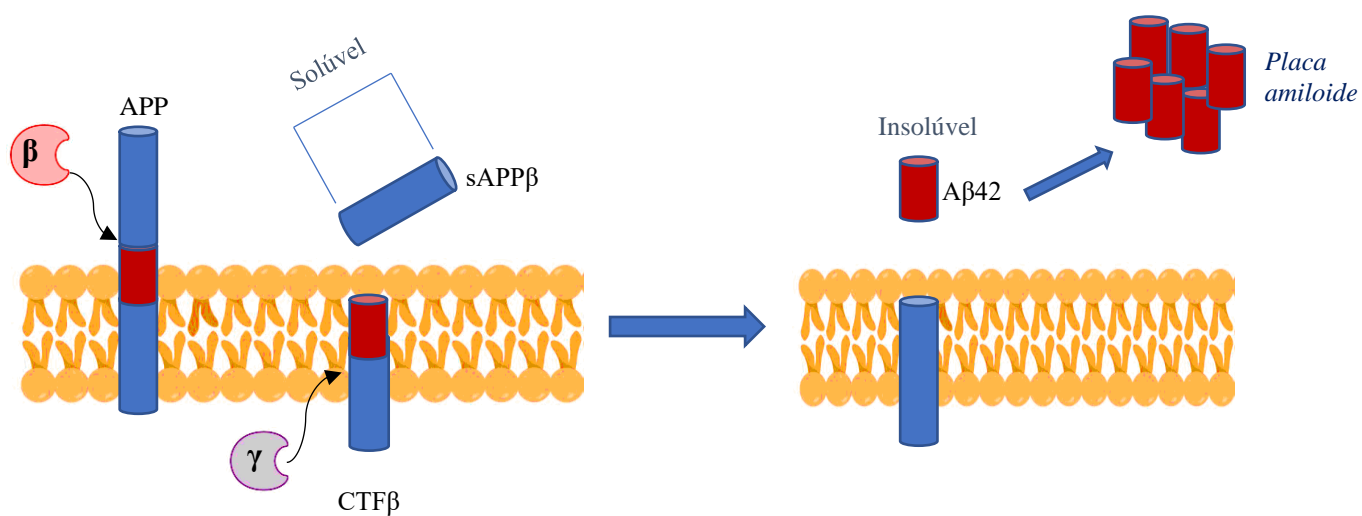
Figura 6: Mecanismo proposto da catálise do peptídeo no sítio ativo da BACE1.



Fonte: Adaptado de (BARMAN; PRABHAKAR, 2013)

Na hipótese amiloide a clivagem da APP libera o N-terminal, enquanto o C-terminal (CTF—beta) permanece na membrana e em sequência é clivado pela enzima gama-secretase (BACE2) liberando o peptídeo hidrofóbico de 42 aminoácidos amiloide-beta ($A\beta_{42}$) na região extracelular (Figura 7). O $A\beta_{42}$ se agrega formando placas que podem prejudicar o processo de sinalização dos neurônios, causar uma resposta imune levando à inflamação e danificação dos neurônios, além de causar angiopatia ao se depositar nas artérias levando-a a ruptura e posterior hemorragia (ASHRAFIAN; ZADEH; KHAN, 2021). Assim como para a acetilcolinesterase, a estratégia utilizada é o desenvolvimento de inibidores visando a diminuição da produção do peptídeo, entretanto os inibidores em fase de triagem para testes em humanos foram descontinuados por razões de segurança relacionadas à toxicidade e por esse motivo tem se intensificado a descoberta por novos ligantes para ambas as enzimas (HAMPEL et al., 2021).

Figura 7: Formação do peptídeo amiloide após clivagem pelas enzimas BACE1 e BACE2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.4. Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas consiste na fixação da enzima em um suporte sólido, tornando-a mais resistente a mudanças de temperatura, pressão e pH quando comparadas com enzimas livres em solução, possibilitando múltiplas reutilizações. Os métodos de imobilização utilizam interações físicas (adsorção física) e químicas (ligação covalente, Adsorção iônica,

aprisionamento e ligação cruzada) entre a enzima alvo e o suporte escolhido (Homaei A et al., 2013; CARDOSO et al., 2009; A. SASSOLAS et al., 2012) (Figura 8).

A imobilização por adsorção física consiste na retenção da enzima no suporte por interações intermoleculares do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A adsorção iônica consiste na ligação eletroestática entre as cargas contrárias da enzima e do suporte. Esses métodos por adsorção têm como vantagem a reutilização do suporte usado durante a imobilização devido à reversibilidade da ligação. Como desvantagem, há a possibilidade da enzima se desprender do suporte por conta da fraca interação entre ambos, e por variações nas condições de temperatura e pH (Homaei A et al., 2013; CARDOSO et al., 2009; A. SASSOLAS et al., 2012).

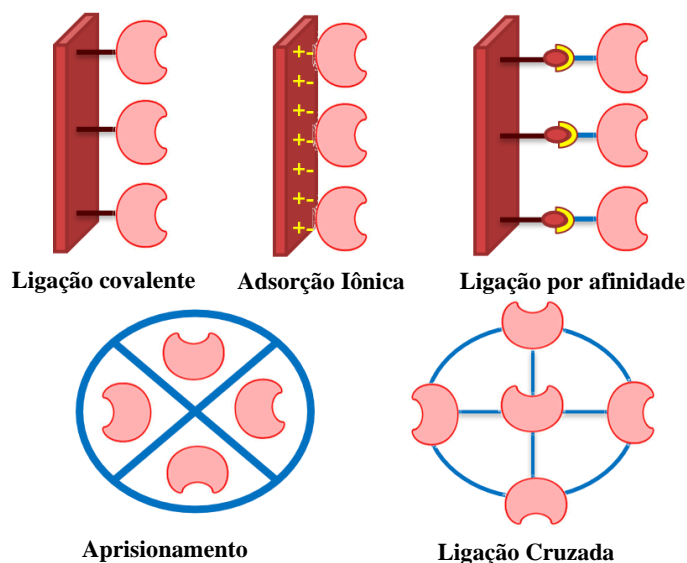
No método de imobilização covalente, uma ligação forte é feita entre resíduos de aminoácidos da enzima (arginina, lisina, ácido glutâmico, etc...) e os grupos funcionais ativos presentes no suporte. Uma ligação eficiente por esse método é feita com a funcionalização do suporte e/ou ativação dos resíduos da enzima. Por conta da força da ligação covalente formada entre o suporte e o alvo imobilizado, o método tem como vantagem a não dessorção da enzima da superfície do suporte, aumento da rigidez da conformação da enzima em função de ligações multipontos, além de permitir uma melhora na atividade, na seletividade e na estabilidade em variações de temperatura, além do aumento do tempo de vida útil da enzima. Entretanto, como desvantagem pode ocorrer modificações na estrutura terciária da enzima durante o processo de imobilização prejudicando sua função catalítica afetando o valor observado de atividade (Homaei A et al., 2013; CARDOSO et al., 2009; A. SASSOLAS et al., 2012).

No método de imobilização por aprisionamento as enzimas estão envolvidas fisicamente ou quimicamente em uma matrix, como por exemplo um gel. Esse método tem como vantagem a adaptação das propriedades geométricas de acordo com as possibilidades das formas de aprisionamento e variações da matrix (filmes, fibras, partículas, polímeros, gel) possibilitando acomodações de biomoléculas com tamanhos distintos.

A imobilização por afinidade consiste na imobilização da biomolécula por um grupo específico (*affinity tag*) de uma sequência da proteína, como resíduos de carboidratos, histidinas e o suporte ativado. Esse método geralmente requer a presença de grupos específicos na enzima e por este motivo modificações por engenharia genética, modificação pós-transcricional, mutação sítio dirigidas são utilizadas nesse método de imobilização para inclusão do grupo tag (Homaei A et al., 2013; CARDOSO et al., 2009; A. SASSOLAS et al., 2012)..

A imobilização por ligação cruzada é um método de imobilização onde ocorre a ligação que pode ser covalente entre as enzimas, na ausência de um suporte durante a imobilização, gerando uma grande estrutura que pode ter como desvantagem a baixa reprodutibilidade e estabilidade mecânica e problemas com a atividade enzimática (Homaei A et al., 2013; CARDOSO et al., 2009; A. SASSOLAS et al., 2012).

Figura 8: Métodos para imobilização de Enzimas em suportes sólidos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

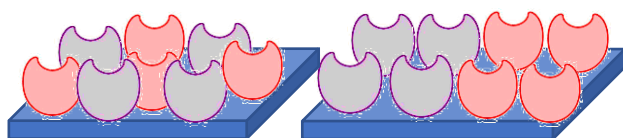
2.5. Co-imobilização

A co-imobilização de enzimas consiste na retenção de duas ou mais enzimas em um mesmo suporte. Um dos grandes desafios da co-imobilização enzimática é a preservação da atividade de ambas enzimas quando comparada com as atividades de ambas individualmente em solução. Isso se deve especialmente pelas diferenças entre as classes da enzima, que podem ser distintas, uma pode ser transferase e a outra uma hidrolase, por exemplo. As estruturas terciárias e de seus respectivos sítios ativos serem diferentes resultando em pH ótimo e estabilidade térmica também variadas, o que leva condições operacionais ideais também diversas. Outro fator a ser considerado é se uma enzima catalisa o produto da enzima anterior, e, portanto, requer um planejamento mais cuidadoso de como será feita esta imobilização, o tipo de suporte e o tipo de ligação a fim de evitar possíveis aleatoriedades para que uma enzima não ocupe predominantemente os espaços do suporte em detrimento da outra, ou uma cause

impedimento estérico em seus respectivos sítios ativos. Caso essas reações enzimáticas sejam em cascata, o substrato inicial pode sofrer problemas difusionais para chegar na primeira enzima e liberar o primeiro produto que será o substrato da segunda enzima (REN et al., 2019).

A co-imobilização pode ser feita de modo randômico, onde as enzimas são homogeneizadas em uma solução e imobilizadas de forma aleatória sobre o suporte, onde os resíduos de aminoácidos da superfície de ambas enzimas possuem a mesma possibilidade de ligação com o suporte(Figura 9-A), ou pode ser feita de forma sequencial, onde a ordem de ligação das enzimas pode ser selecionada no processo de imobilização(Figura 9-b)(SCHOFFELEN; VAN HEST, 2013)

Figura 9: Processo de Co-imobilização A) Randômica e em B) Sequencial.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os sistemas co-imobilizados têm aplicações em diagnósticos de doenças através da estratégia multi-alvo. Um exemplo é o desenvolvimento de um complexo multi-enzimático que possui boa sensibilidade e limite de detecção para avaliação de colesterol em alimentos como por exemplo margarina e óleo de peixe. O sistema possui 3 enzimas co-imobilizadas, colesterol oxidase, colesterol esterase e uma peroxidase, utilizadas para medir o colesterol total(AHMADALINEZHAD; CHEN et al., 2011). Encontram-se também aplicações em biosensores, que consistem em um dispositivo para detectar e monitorar espécies químicas. Como o desenvolvido por M. Stredansky *et al.*, que construíram um biosensor utilizando a co-imobilização de glicose desidrogenase FAD dependente com uma invertase- para monitoramento de sacarose em campos de café (STREDANSKY et al., 2018).

A co-imobilização das enzimas proteases- pectinases, e celulasas a fim de facilitar a hidrólise em aplicações em conversão de biomassas, como a lignocelulose que tem estrutura e estabilidades complicadas e exibem resistência à ação de enzimas para sua desconstrução em oligossacarídeos e em monossacarídeos. Essas biomassas estão envolvidas da produção de biocombustíveis como o etanol e o butanol. (FUKUDA et al., 2009).

O sistema com as enzimas co-imobilizadas também tem aplicações em estratégias para tratamento de doenças, e na triagem e estudos de compostos multi-alvo. Neste contexto, surgem estudos para o desenvolvimento desses compostos, que demonstram capacidade inibitória para mais de uma enzima, tornando-se estrategicamente mais viáveis no desenvolvimento de novas metodologias que visam a terapia de doenças multifuncionais como o Alzheimer. (ZHANG et al., 2019).

Trabalhos recentes demonstram a importância da capacidade modulatória de substâncias com atividade biológica multi-alvo em tratamento de doenças, e a necessidade do desenvolvimento de ensaios de alta eficiência para triagem desses compostos. Podemos citar alguns exemplos. Estudos *on-line* em matriz complexa através de dois receptores acoplados à proteína G, alfa1-adrenoceptor(α_{1a} -AR) e beta2-adrenoceptor(β_2 -AR), ambos alvos para o tratamento de doenças cardiovasculares e respiratórias, foram purificados e immobilizados na superfície do gel de sílica a fim de criar um sistema automatizado para a triagem de compostos bioativos de produtos naturais que sejam alvos para ambos os receptores. Com essa finalidade, as colunas preparadas com os receptores immobilizados foram conectadas a um sistema LC-MS (ZHAO et al., 2012). Ambas as colunas com os receptores immobilizados demonstraram capacidade de reconhecer e separar fármacos padrões utilizados em tratamentos de hipertensão, específicas para cada receptor, sendo os fármacos prazosina e terazosina para o receptor α , salbutamol e terbutalina para o receptor β . A adrenalina foi utilizada como ligante duplo-alvo para confirmar a aplicação do sistema para o monitoramento em ensaios multi-alvo, além de aplicar o sistema para o extrato aquoso da planta *Coptis chinensis*, da qual foi possível monitorar três compostos bioativos que são alvos para ambos os receptores.

Chen *et al.*, descreveram uma nova estratégia para a triagem de compostos duplo-alvo de componentes bioativos de medicamentos tradicionais chineses (TCMs) no qual fibras ocas de baixo custo foram preenchidas com as enzimas α -Glicosidase e Angiotensina-convertase, ambas são alvos para tratamento de diabetes. Neste método as enzimas ficam aderidas nas superfícies internas das fibras, e a solução enzimática fica protegida dentro da fibra, evitando a penetração de outras moléculas presentes na matriz. Tais fibras foram usadas para “pescar” os ligantes dos extratos de TCM usados como prescrição para tratamento de diabetes, composto por *Rhizoma zingiberis*, *Rhizoma coptidis*, *Radix Scutellariae* e *Radix Ginseng*. Os ligantes dissociados dos complexos alvo-ligante foram identificados por LC-MS/MS. Três compostos foram identificados durante a triagem, sendo eles a coptisina e baicalina ambos constituintes da *Rhizoma coptidis*, e o composto berberina proveniente da *Radix Scutellariae*. O método

desenvolvido permitiu identificar que o ligante berberina é duplo-alvo para ambas as enzimas em estudo. (CHEN, Liang et al., 2017)

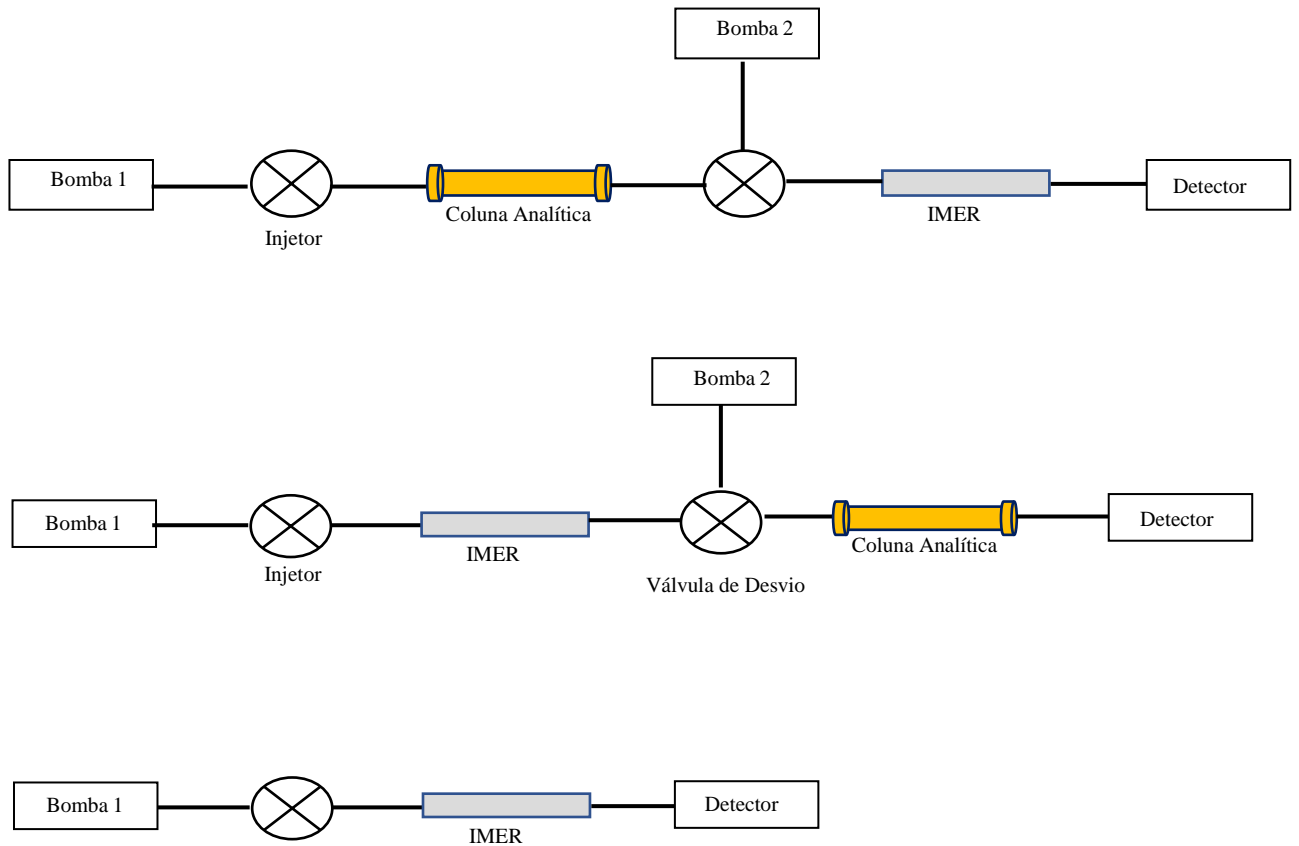
Moustafa et al., fizeram estudo *in silico* utilizando modelagem molecular para investigar a interação dual de novos compostos com as enzimas AChE e BACE1. No estudo, análogos do inibidor padrão Donezepil foram sintetizados. Um dos compostos exibiu maior atividade inibitória para a AChE e BACE1 do que o inibidor Donepezil. Os valores de concentração de inibidor necessária para diminuir a atividade da enzima para 50% (IC₅₀) foram menores. Juntamente com esse estudo experimental, o estudo teórico molecular *docking* a partir das estruturas de raio x de ambas as enzimas foi realizado para confirmar a capacidade dual de inibição. Foi confirmada a ligação de hidrogênio envolvendo o resíduo Phe295 da AChE com a amida do composto. Para a BACE1 as ligações de hidrogênio com os resíduos com o sítio catalítico da enzima, Asp228, Thr232 e Thr72 foram confirmadas. Em comparação com o donezepil, a ligação de hidrogênio não ocorre com o resíduo Asp228, demonstrando ser a chave para maximizar a potência do composto *in vitro* (GABR et al., 2018).

Os exemplos citados acima realçam à demanda de compostos que atuem como multi-alvo, tal como a triagem destes através de metodologias robustas.

2.6. Enzimas imobilizadas em ensaios para triagem de ligantes.

Após a imobilização da enzima em um suporte sólido tem-se um biorreator chamado de IMER (do inglês Immobilized Enzyme Reactor). O IMER pode ser conectado ao HPLC, e podem ser utilizados sequencialmente à coluna após a válvula de desvio (Figura 10). Em A, os analitos são separados primeiramente através do uso de uma coluna cromatográfica e posteriormente são percolados pelo IMER onde é possível monitorar o produto da reação e determinar constantes cinéticas como Km, Vmax, constante de inibição e realizar triagem de ligantes. Em B, o IMER é utilizado antes da coluna analítica, e o produto formado pela catálise enzimática pode ser transferido com a utilização de válvulas de desvio para uma coluna analítica que permita uma análise com solventes orgânicos evitando o contato com a enzima que causaria sua desnaturação. Em C, o IMER é conectado diretamente a um detector permitindo uma triagem dos analitos e seleção de inibidores com base na modulação do produto da reação. (CARDOSO et al., 2009)

Figura 10: Configurações para a análise cromatográfica utilizando o IMER.



Fonte: Adaptado de (CARDOSO et al ;, 2009)

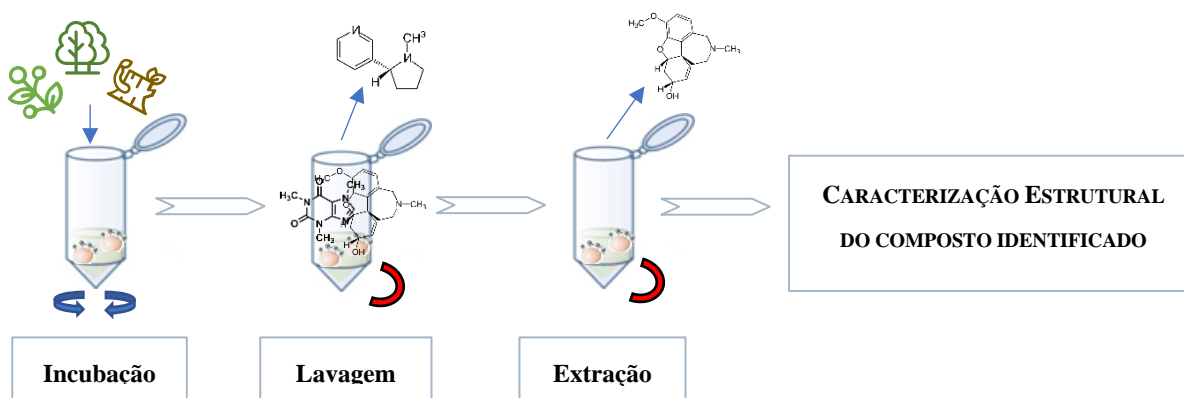
Além da triagem de ligantes pelo monitoramento da capacidade deste em modular a atividade da enzima, pode-se monitorar a biofinidade do ligante pela biomolécula imobilizada pelo ensaio de pesca de ligantes (DENG; SANYAL, 2006).

2.7. Ensaio de biofinidade por pesca de ligantes

O ensaio de biofinidade por pesca de ligantes é uma ferramenta utilizada na seleção de compostos bioativos em misturas complexas como em extratos brutos de produtos naturais. Estas amostras complexas possuem uma variedade de compostos que possuem estruturas e estereoquímica diferentes, tais como cumarinas, alcalóides, ácidos fenólicos. A separação acontece pela retenção dos compostos na proteína devido à afinidade.

Uma das abordagens da técnica consiste na imersão da enzima imobilizada diretamente matriz contendo a amostra (Figura 11), desta forma os compostos que possuem afinidade pela enzima ficarão retidos, enquanto os que não possuem permanecem no sobrenadante da solução. É realizada uma etapa de lavagem onde serão removidos os ligantes que possuem uma afinidade fraca. E por fim, na última etapa é realizada uma extração, onde a enzima é mantida em contato com uma solução extratora que pode ser composta por solvente orgânico e um tampão com pH diferente da solução de incubação, a fim de provocar mudanças em sua conformação e como consequência o desligamento dos ligantes que possuem afinidade moderada/forte pela proteína. Após a dissociação dos ligantes, estes são caracterizados por técnicas espectrométricas e espectroscópicas (TRINDADE XIMENES et al., 2021).

Figura 11: Etapas do ensaio de bioafinidade por Pesca de ligantes



Fonte: Elaborado pelo autor

Conclusões Parte-I

Com as curvas de obtidas e os parâmetros cinéticos determinados foi possível observar que o processo de co-imobilização não acarretou mudanças significativas na interação entre enzima e substrato e demonstrou que o sistema é capaz de reconhecer o inibidor padrão e pode ser utilizado para triagem de novos ligantes. Após a triagem de ligantes sintéticos, foi possível notar diferenças dos valores obtidos com as enzimas imobilizadas individualmente e co-imobilizada, o que demonstra que o ligante pode estar interagindo com ambas as enzimas em

um sistema que mimetiza com maior fidelidade os sistemas enzimáticos no sistema nervoso central, onde o fármaco não irá interagir apenas com uma enzima como no sistema com a enzima imobilizada individualmente. Novos estudos precisam ser feitos para determinação da constante de inibição para se obter mais detalhes da interação ligante-enzima.

Conclusões parte-II

As enzimas AChEhu e BACE1 foram co-imobilizadas de forma inédita em partículas magnéticas sem prejudicar sua função catalítica. Foi possível desenvolver um método de pesca de ligantes com duas enzimas imobilizadas, expandindo a possibilidade de ensaios para ligantes multi-alvo. O ensaio utiliza baixa porcentagem de solvente para aplicação em amostras complexas como extratos naturais que possibilita a reutilização da enzima sem desnaturá-la. Os compostos pescados serão analisados em espectrômetro de massas de alta resolução para posterior identificação da estrutura.

Referências

- AHMADALINEZHAD, A. et al. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4508-4513, 15 jul. 2011.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 11 nov. 2016.
- ARYA, A. et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 350, 25 fev. 2021.
- BARMAN, A. et al. Elucidating the catalytic mechanism of β -secretase (BACE1): A quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 40, p. 1-9, mar. 2013.
- BETANCOR, L. et al. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 95-114, 2010.
- CALIL, F. A. et al. Immobilization of NTPDase-1 from *Trypanosoma cruzi* and development of an online label-free assay. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2016 ID 9846731, p. 1-9, 14 dez. 2016.
- CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design**. John Wiley & Sons, 2006.

CAO, Y. et al. A method for screening active components from Chinese herbs by cell membrane chromatography-offline-high performance liquid chromatography/mass spectrometry and an online statistical tool for data processing. **Journal of Chromatography A**, v. 1540, p. 68-76, 9 mar. 2018.

CARDOSO, C.L. et al. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009.

CHEN, L. et al. Dual-target screening of bioactive components from traditional Chinese medicines by hollow fiber-based ligand fishing combined with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 269-276, 5 set. 2017.

DARVESH, S. et al. Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 17, n. 2, p. 117-126, abr-jun. 2003.

DE LIMA, J.M. et al. Micro-and nano-sized amine-terminated magnetic beads in a ligand fishing assay. **Analytical Methods**, v. 12, n. 33, p. 4116-4122, 2020.

DE MORAES, M. C. et al. New trends in LC protein ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 155-166, jan. 2014.

DE MORAES, M. C. et al. Targeting anti-cancer active compounds: affinity-based chromatographic assays. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 39, p. 5976-5987, 2016.

DENG, G. et al. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 528-538, 24 fev. 2006.

DENG, Yin-Hua et al. Multi-target screening and experimental validation of natural products from selaginella plants against Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 539, 25 ago. 2017.

FUKUDA, H. et al. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 2-12, abr. 2009.

GUO, J. et al. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 182-197, 20 fev. 2019.

HAMPEL, H. et al. The β -secretase BACE1 in Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 89, n. 8, p. 745-756, 15 abr. 2021.

HERGENROTHER, P.J. Obtaining and screening compound collections: a user's guide and a call to chemists. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 213-218, jun. 2006.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185-205, 29 ago. 2013.

HOUSTON, J.G. et al. The chemical-biological interface: developments in automated and

miniaturised screening technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 734-740, dez. 1997.

KIM, H. S. et al. Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC). **Journal of Chromatography B**, v. 870, n. 1, p. 22-26, 1 jul. 2008.

KOOL, J. et al. Studying protein–protein affinity and immobilized ligand–protein affinity interactions using MS-based methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 4, p. 1109-1125, 14 jul. 2011.

LI, P. et al. α -Glucosidase immobilization on polydopamine-coated cellulose filter paper and enzyme inhibitor screening. **Analytical Biochemistry**, v. 605, p. 113832, 15 set. 2020.

MA, H. et al. Screening bioactive compounds from natural product and its preparations using capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 39, n. 1, p. 260-274, jan. 2018.

MARUCCI, G. et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 190, p. 108352, 1 jun. 2021.

RAGHAVENDRA, N. M. et al. Dual or multi-targeting inhibitors: The next generation anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1277-1300, 1 jan. 2018.

REN, S. et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 373, p. 1254-1278, 1 out. 2019.

SARRIA, A. L. F. et al. Copper (II) and zinc (II) complexes with flavanone derivatives: Identification of potential cholinesterase inhibitors by on-flow assays. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 164, p. 141-149, nov. 2016.

SASSOLAS, A. et al. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, maio-jun. 2012.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505-517, jul. 2016.

SCHOFFELEN, S. et al. Chemical approaches for the construction of multi-enzyme reaction systems. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 4, p. 613-621, ago. 2013.

SEIDL, C. et al. A novel on-flow mass spectrometry-based dual enzyme assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 1072, p. 81-86, 23 set. 2019.

STREDANSKY, M. et al. Rapid sucrose monitoring in green coffee samples using multienzymatic biosensor. **Food Chemistry**, v. 254, p. 8-12, 15 jul. 2018.

VANZOLINI, K. L. et al. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: a new tool for plant extract ligand screening. **Talanta**, v. 116, p. 647-652, 15 nov. 2013.

VENTURA, A. L. M et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, n.2, p. 66-72, jun. 2010.

VENUGOPAL, C. et al. Beta-secretase: structure, function, and evolution. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 278-294, jun. 2008.

VILELA, A.F.L. CARDOSO, C.L. An on-flow assay for screening of β -secretase ligands by immobilised capillary reactor-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, n. 14, p. 2189-2196, 2017.

VILELA, A.F.L.; NARCISO DOS REIS, VE.; CARDOSO, C. L. Co-immobilized capillary enzyme reactor based on beta-secretase1 and acetylcholinesterase: A model for dual-ligand screening. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, n. 14, p. 708374, 2021.

VILELA, A.F.L. **Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e β -secretase1 : estudo de condições para triagem de ligantes**. 2018, 129 p. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponível em <https://repositorio.usp.br/item/002889731>.

XIMENES, I. A. T. et al. Magnetic particles for enzyme immobilization: a versatile support for ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, p. 114286, 10 set. 2021.

YE, Li-Hong.; ZHANG, R.; CAO, J. Screening of β -secretase inhibitors from *Dendrobii Caulis* by covalently enzyme-immobilized magnetic beads coupled with ultra-high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, p. 113845, 20 fev. 2021.

ZHANG, P. et al. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 228-247, 15 ago. 2019.