



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DE INIBIDORES DE COLINESTERASES APLICANDO TÉCNICAS DE QSAR-2D (HQSAR) E *DOCKING* MOLECULAR

SIMONE DECEMBRINO DE SOUZA

**Orientadores:
Prof. Dr. CARLOS RANGEL RODRIGUES
Prof. Dr. LUCIO MENDES CABRAL**

Rio de Janeiro – 2012

SIMONE DECEMBRINO DE SOUZA

**ESTUDO DE INIBIDORES DE COLINESTERASES
APLICANDO TÉCNICAS DE QSAR-2D (HQSAR) E
DOCKING MOLECULAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Rio de Janeiro

2012

Ficha Catalográfica

Souza, Simone Decembrino

Estudo de inibidores de colinesterases aplicando técnicas de QSAR-2D (HQSAR) e docking molecular/ Simone Decembrino de Souza -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2012. **114p.**

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Farmácia / Rio de Janeiro, 2012.

1. Alzheimer. 2. Acetilcolinesterase. 3. Butirilcolinesterase 4. HQSAR. 5. Modelagem Comparativa. 6. Docking molecular - Tese. I. Rodrigues, Carlos Rangel. II. Cabral, Lucio Mendes. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia. IV. Título.

SIMONE DECEMBRINO DE SOUZA

**ESTUDO DE INIBIDORES DE COLINESTERASES APLICANDO TÉCNICAS
DE QSAR-2D (HQSAR) E *DOCKING* MOLECULAR.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ de _____ de 2012.

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues - Orientador
Faculdade de Farmácia – UFRJ (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Suzana Guimarães Leitão
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna
Instituto de Ciências Exatas – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Nuria Cirauqui Diaz
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Claudia Pinto Figueiredo
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Profa. Dra Yraima Moura Lopes Cordeiro
Faculdade de Farmácia – UFRJ

2012

A DEUS, meu companheiro de todas as horas, à minha família e aos meus avós, Wanda e Wilson (in memoriam), por todas as vezes que me incentivaram acreditando que o conhecimento era um bem precioso. Dedico-lhes esta conquista com gratidão.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo privilégio de sentir sua presença em minha vida e por todas as oportunidades de conquistas pessoais. A Ele, toda honra e glória.

À minha irmã, Cristina Lopes de Souza, que me ensinou o valor da paciência e do amor verdadeiro, sem ela, não seria o que sou hoje.

Ao meu esposo, Marcelo Santos de Souza, pela força, amor, compreensão e paciência durante todos os momentos da minha vida. Agradeço por me ensinar o valor da persistência e por não deixar que eu desistisse dos meus sonhos.

Aos meus filhos, Marcella e William, presentes de DEUS pra mim, meus melhores projetos de vida! Obrigada pela alegria que me dão a cada dia.

Ao Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues, meu orientador, pelo incentivo constante e por ter acreditado no meu potencial. Obrigada, por toda a atenção dedicada, por sua amizade e por tornar meu doutorado possível.

Ao Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral, por sempre estar disponível a ouvir, ajudar e contribuir com meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Alessandra Mendonça Teles de Souza, pela amizade, compreensão, paciência e sabedoria transmitida. Sua ajuda foi muito importante pra mim.

À Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Rennó Sodero, pela amizade, atenção e ensinamentos preciosos pra mim. Sempre presente, sempre disposta a ajudar. Pela ajuda com os *dockings* no Autodock. Meu muito obrigada por sua ajuda!

À aluna de doutorado Bárbara Abrahim Vieira, pela amizade, por sua colaboração preciosa no meu trabalho de doutorado. Obrigada por domar o Autodock!

Aos membros do laboratório ModMolQSAR pela amizade, ajuda e apoio. Todos foram importantes nesta conquista. Especialmente à Ana Carolina Corrêa, por sua sinceridade e carinho e à Riethe por sua ajuda técnica!!!

À Prof^a. Dr^a. Magaly Girão Albuquerque, por sua ajuda, amizade e conhecimento nos momentos importantes deste trabalho. Pelas preciosas correções, meu muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos necessários à minha formação.

À Banca Examinadora, pelo aceite e pelas contribuições valiosas para este trabalho.

A todas as pessoas que não citei, mas colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada, sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros fornecidos.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa associada à perda de neurônios colinérgicos no cérebro, que acomete mais de 30 milhões de pessoas por ano no mundo. A diminuição da transmissão colinérgica central está relacionada com esta patologia, portanto, o aumento desta transmissão pelo uso de inibidores de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), tem sido considerado como a melhor abordagem para a DA. Na primeira parte deste estudo, uma série de 36 derivados 4-[(dietilamino)-metil]-fenol com atividade inibitória sobre AChE e BChE, extraída da literatura, foi estudada por QSAR-2D, empregando análise de fragmentos estruturais HQSAR ("Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship"). Foram construídos e validados modelos de HQSAR para as duas atividades que mostraram resultados estatísticos significativos (AChE: $r^2 = 0,974$ e $q^2 = 0,897$; BChE: $r^2 = 0,945$ e $q^2 = 0,883$) e baixos valores residuais entre atividade experimental e calculada. O mapa de contribuição de atividade, mostrou que unidades estruturais contendo região aromática e um tamanho maior da cadeia lateral colaboram para o aumento da inibição. Na segunda parte do trabalho, foram realizados estudos de *docking* molecular dos inibidores nas enzimas AChE e BChE. Na ausência da estrutura 3D da BChE de cavalo, a mesma foi construída por modelagem comparativa usando o programa Modeller. O melhor modelo 3D foi utilizado nas simulações de *docking* molecular, empregando os programas AutoDock e Molegro Virtual Docker (MVD). Os resultados de *docking* molecular no sítio ativo da AChE indicaram um modo de ligação preferencial dos derivados de maior atividade inibitória, ocupando tanto a cavidade catalítica quanto o sítio aniônico periférico (PAS, do inglês *peripheral anionic site*). A análise do complexo do derivado com perfil mais ativo com a AChE revelou uma interação por ligação hidrogênio com o resíduo Tyr121 e duas interações *cation- π* com os resíduos Trp84 e Trp279. Este padrão não foi observado para os derivados de menor atividade, que apresentaram, de um modo geral, uma interação por empilhamento π - π com o resíduo Tyr334, com deslocamento no sítio PAS, devido à cadeia lateral mais curta, impedindo uma interação com Trp279, descrita na literatura como importante para a inibição. Os resultados de *docking* molecular no sítio ativo da BChE indicaram que os compostos de maior atividade apresentaram interações com os resíduos Trp79, Asp67, Tyr329 e Leu283. Os compostos de menor perfil inibitório não apresentam interações com o resíduo Leu283, devido à cadeia lateral mais curta. Esta interação parece ser importante para a atividade inibitória contra a BChE. A partir das informações obtidas nestes estudos, novos inibidores de AChE e BChE foram propostos e apresentaram um melhor perfil inibitório sobre BChE previsto pelo modelo de HQSAR, que foi corroborado por estudos de *docking* molecular, apresentando uma proximidade com a His435 da tríade catalítica.

Palavras-chave: Alzheimer; Acetilcolinesterase, Butirilcolinesterase, Modelagem Comparativa; *Docking* Molecular.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder associated with loss of cholinergic neurons in the brain, which affects over 30 million people per year worldwide. The decrease in central cholinergic transmission is related to this pathology, therefore, the increase of this transmission, through the use of inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), has been considered as best approach to AD. In the first part of this study, a series of 36 4 - [(diethylamino) methyl] phenol derivatives with potential inhibitory power against AChE and BChE, was taken from the literature and it's been analyzed through QSAR-2D, using HQSAR ("Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship") structural fragments. HQSAR models were constructed and validated to both studies that showed significant statistical results (AChE: $r^2 = 0.974$ and $q^2 = 0.897$; BChE: $r^2 = 0.945$ and $q^2 = 0.883$) and lower residual values between experimental and calculated activities. The activity contribution map generated by the study showed that the structural units containing the aromatic region and a larger side chain collaborate to increase inhibition. In the second part of the work were performed molecular docking studies of cholinesterase inhibitors. In the absence of 3D structure of BChE from horse, it was constructed by comparative modeling, using the Modeller program. The best 3D model was utilized in the simulations of docking molecular, using AutoDock and Molegro Virtual Docker (MVD) programs. The results of molecular docking in the active site of AChE indicated a preferred binding mode of derivatives that have higher inhibitory activity, occupying both the catalytic cavity as the anionic peripheral site (PAS). Analysis of AChE complex with the most active derivative revealed that it participates in a hydrogen bond with residue Tyr121, two cation- π interactions with residues Trp84 and Trp279. This profile was not observed for derivatives of lower activity, that showed, in general, a π - π stacking interaction with Tyr334 residue, which leads to a shift in the site of PAS, presumably due to the shorter side chain, preventing interaction with Trp279, which is reported in the literature as important for inhibition. The results of molecular docking in the active site of BChE indicated that compounds with higher activity performed interactions with residues Trp79, Asp67, Tyr329 and Leu283. Those compounds with low inhibitory profile showed no interaction with Leu283 residues, due to its shorter side chain, which seems to be important in the set of observed interactions to the inhibitory activity against BChE. From the information obtained in this study, new inhibitors of AChE and BChE were proposed and they presented a better inhibitory profile against BChE, predicted by HQSAR, corroborated by studies of molecular docking, close to the His435 catalytic triad.

Keywords: Alzheimer's; Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Comparative Modeling, Molecular Docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Prevalência da doença de Alzheimer – Aumento exponencial com a idade.....	2
Figura 2. Principais demências na terceira idade no Brasil (adaptado de HERRERA <i>et al.</i> , 2002).....	3
Figura 3. Clivagem da proteína precursora amiloide (PPA) (1) iniciado pelas enzimas β e γ secretases (2) gerando peptídeos da família β amilóide e suas isoformas A β 42 e A β 40 (3) (adaptado de WEINER <i>et al.</i> , 2012).	4
Figura 4. Formação de oligômeros de proteínas β amilóides (1), agregação dos oligômeros (2) e formação de placas amilóides com perda da capacidade de realizar sinapses (3) (adaptado de Kung, 2012)	5
Figura 5. Representação esquemática do sítio ativo da acetilcolinesterase (Araújo, 2010).....	9
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase (Araújo, 2010).	10
Figura 7. Estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento do Alzheimer	13
Figura 8. Estrutura geral dos derivados fenólicos (adaptado de Yu <i>et al.</i> , 2010)	13
Figura 9. Geração de um holograma molecular (Tong <i>et al.</i> , 1998).	18
Figura 10. Exemplo de representação das contribuições atômicas individuais.....	19
Figura 11. Etapas da construção de um modelo 3D por modelagem comparativa(Adaptado de Marti-Renom <i>et al.</i> , 2000).....	21
Figura 12. Gráfico de Ramachandran exemplificando a estereoquímica de acordo com a distribuição dos ângulos ϕ e ψ . Em vermelho, regiões mais favoráveis, em amarelo e creme, regiões permitidas; e em branco, regiões desfavoráveis.	24
Figura 13. Exemplo do gráfico de Z-score (A) e gráfico de energia (B) obtidos pelo programa PROSA.....	25
Figura 14. Estrutura 2D do ligante (íon decametônio, DME) extraído da estrutura 3D da AChE de <i>Torpedo californica</i> (PDB ID 1ACL).....	37
Figura 15. Resultado da análise conformacional. A) Estrutura do confômero de menor energia do composto de menor cadeia lateral (composto 1). B) Conformações estendida e dobrada do composto 23 . C) Seleção do confômero do composto mais ativo para inibição de AChE (composto 26) semelhante ao íon decametônio.	43
Figura 16. Distribuição dos valores de atividade biológica (pIC ₅₀ , M) dos compostos dos conjuntos de treinamento (A) e de teste (B) para AChE.	44

Figura 17. Distribuição dos valores de atividade biológica (pIC ₅₀ , M) dos compostos dos conjuntos de treinamento (A) e de teste (B) para BChE.....	44
Figura 18. Esquema dos diferentes parâmetros de distinção do fragmento.	45
Figura 19. Gráfico do valores de pIC ₅₀ experimental <i>versus</i> predito dos conjuntos de treinamento e teste dos inibidores de AChE e BChE.	49
Figura 20. Mapas de contribuição atômica dos compostos 26 (mais ativo) e 1 (menos ativo) para a inibição da AChE, e 24 (mais ativo) e 2 (menos ativo) para a inibição da BChE.....	50
Figura 21. Alinhamento entre as sequências de BChE cavalo e BChE humana. Alinhamento foi construído com ClustalW (LARKIN <i>et al.</i> , 2007), e a estrutura secundária foi atribuída pelo programa DSSP (KABSCH & SANDER, 1983). Em azul: folha β ; em vermelho: α hélice; em amarelo:hélice 3-10.	53
Figura 22. Gráfico de Ramachandran para os modelos (A) Swiss-model e (B) Modeller obtidos pelo programa ProCheck.	54
Figura 23. Em A) Gráfico de Z-score dos modelos avaliados. Modelo A gerado pelo SwissModel (Z-score = -10,63); Modelo B gerado pelo Modeller (Z-score = -10,70), modelo 1P0M (Z-score= -9,69). Em B) Gráfico scores de resíduos dos modelos gerados.	55
Figura 24. Representação do modelo de homologia para butirilcolinesterase cavalo (BChE) construído pelo programa Modeller (modelo B). Resíduos do sítio ativo (Glu194, Ser195 e His435) são mostrados em destaque.	56
Figura 25. Sobreposição do DME original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de <i>docking</i> (roxo) com RMSD= 1,26Å. Principais resíduos de aminoácidos do sítio catalítico em destaque.....	58
Figura 26. Sobreposição do DME original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de <i>docking</i> (roxo) com RMSD= 1,51Å. Principais resíduos de aminoácidos do sítio catalítico em destaque.....	59
Figura 27. Sobreposição do BUT original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de <i>docking</i> (roxo) com RMSD= 0,96 Å. Principais resíduos de aminoácidos do sítio catalítico em destaque.....	60
Figura 28. Sobreposição do BUT original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de <i>docking</i> (roxo) com RMSD= 1,47 Å. Principais resíduos de aminoácidos do sítio catalítico em destaque.....	61

- Figura 29. A) Representação da estrutura 2D e 3D do derivado **26**; B) Representação da pose de menor energia encontrada no *cluster* de maior população; C) *Clusters* obtidos no *docking* do derivado 26 e estrutura cristal 1ACL. 63
- Figura 30. Sobreposição das conformações de DME do cristal (amarelo) e derivado **26** (roxo) no sítio ativo de AChE. Principais resíduos do sítio ativo em destaque. Os átomos de nitrogênio e de oxigênio estão representados pelas cores azul e vermelho, respectivamente. 64
- Figura 31. A) Representação da estrutura 3D do derivado 26 na pose de menor valor de MolDock *score* (MVD); B) Representação da pose de menor valor de *Rerank-score* (azul) sobreposta ao DME do cristal original. 65
- Figura 32. Resultado de *docking* molecular do derivado **26** empregando o programa Pymol. A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (roxo) e MVD (azul); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 66
- Figura 33. Resultado de *docking* molecular do derivado **24** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (rosa) e MVD (azul); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 67
- Figura 34. Resultado de *docking* molecular do derivado **1** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (azul) e MVD (rosa); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 69
- Figura 35. Resultado de *docking* molecular do derivado **6** empregando o programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (amarelo) e MVD (roxo); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 70
- Figura 36. A) Representação da estrutura 3D do composto **24**; B) Representação da pose de menor energia encontrada no cluster de maior população; C) *Clusters* obtidos no *docking* do derivado **24** e estrutura cristal do modelo de BChE gerado por homologia. 73
- Figura 37. Resultado de *docking* molecular do derivado **24** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (cinza) e MVD (verde); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 74

- Figura 38. Resultado de *docking* molecular do derivado **26** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (amarelo) e MVD (rosa); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 75
- Figura 39. Resultado de *docking* molecular do derivado **2** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (vinho) e MVD (amarelo); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 77
- Figura 40. Resultado de *docking* molecular do derivado **1** empregando o programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (azul) e MVD (verde); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD. 78
- Figura 41. Esquema da proposição de novos candidatos a inibidores de colinesterases, baseado na estrutura geral dos compostos **24** e **26**. 80
- Figura 42. Resultado de *docking* molecular dos novos derivados e a AChE empregando programa Pymol. A) Principais interações com o derivado **24a**; B) Principais interações como derivado **24b**; C) Principais interações com o derivado **26a**; C) Principais interações com o derivado **26b**..... 84
- Figura 43. Resultado de *docking* molecular dos novos derivados e a BChE empregando programa Pymol. A) Principais interações com o **24a**; B) Principais interações como derivado **24b**; C) Principais interações com o derivado **26a**; C) Principais interações com o derivado **26b**..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química e atividade biológica (pIC_{50} , M) dose inibidores de AChE e BChE.	32
Tabela 2. Distâncias entre os átomos de nitrogênio protonados, dos compostos e do íon decametônio.....	42
Tabela 3. Resumo dos índices estatísticos de HQSAR para diversas distinções de fragmentos (DF), utilizando o tamanho padrão do fragmento (4-7) para os inibidores da AChE e da BChE.	46
Tabela 4. Resumo dos índices estatísticos de HQSAR na influência dos vários tamanhos de fragmentos (TF) utilizando os parâmetros de distinção fragmento B/C e A/B para inibidores de AChE e BChE, respectivamente.	47
Tabela 5. Valores experimentais, preditos e residuais ($pIC_{50}^{Exp} - pIC_{50}^{Pred}$) de pIC_{50} (M) de inibidores de AChE e BChE utilizando os melhores modelos de HQSAR.	48
Tabela 6. Atividade biológica estimada para os novos derivados fenólicos empregando modelos de HQSAR.	81

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DOENÇA DE ALZHEIMER	1
1.1.1 HISTÓRICO	1
1.1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	1
1.1.3 ETIOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	3
1.1.3.1 PLACAS SENIS	4
1.1.3.2 EMARANHADOS NEUROFIBRILARES	5
1.1.3.3 HIPÓTESE COLINÉRGICA	6
1.1.4 ACETILCOLINESTERASE	8
1.1.5 BUTIRILCOLINESTERASE	10
1.1.6 TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER	11
1.1.7 INIBIDORES DE SÍTIO DUAL DE COLINESTERASES	13
1.2. MODELAGEM MOLECULAR	14
1.2.1. CORRELAÇÃO QUANTITATIVA ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.	15
1.2.1.1. CORRELAÇÃO QUANTITATIVA ENTRE A ESTRUTURA QUÍMICA E A ATIVIDADE BIOLÓGICA UTILIZANDO FRAGMENTOS ESTRUTURAIS	16
1.3. MODELAGEM COMPARATIVA	19
1.4. DOCKING MOLECULAR	25
1.4.1 ALGORÍTMOS GENÉTICOS	27
1.4.2 AUTODOCK	27
1.4.2 MOLEGO VIRTUAL DOCKER	28
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MÉTODOS	31
4.1 CONSTRUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E ANÁLISE CONFORMACIONAL DA SÉRIE DE COMPOSTOS EM ESTUDO	31
4.2 QSAR 2D (HQSAR)	31
4.2.1. Banco de dados	31
4.2.2. Construção dos modelos de HQSAR para AChE e BChE	33
4.2.3 Parâmetros estatísticos usados para avaliar os modelos de QSAR	34
4.3 CONSTRUÇÃO DO MODELO DE BCHE POR MODELAGEM COMPARATIVA	34
4.3.1 Identificação e seleção de proteínas moldes	35

4.3.2 Alinhamento das seqüências primárias	35
4.3.3 Construção do modelo 3D	35
4.3.4 Validação dos modelos e seleção do melhor modelo.	35
4.4 DOCKING MOLECULAR	36
4.4.1 Obtenção das estruturas 3D das enzimas alvo.....	36
4.4.1.1 Acetilcolinesterase.....	36
4.4.1.2 Butirilcolinesterase	37
4.4.2 AUTODOCK	37
4.4.3.1 Preparação das enzimas	37
4.4.3.2 Preparação dos ligantes	38
4.4.3.3 Parâmetros de <i>docking</i>	38
4.4.4 MOLEGRO VIRTUAL DOCKER	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Construção otimização e análise conformacional dos compostos.....	41
5.2 QSAR-2D (HQSAR)	43
5.3 MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA BChE	51
5.3.1 Identificação e seleção de proteínas moldes.....	52
5.3.3 Construção do modelo	53
5.3.4 Validação do modelo	54
5.4 DOCKING MOLECULAR.....	56
5.4.1 VALIDAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE <i>DOCKING</i> POR <i>RE-DOCKING</i>	56
5.4.1.1 ACETILCOLINESTERASE.....	57
5.4.1.1.1 AUTODOCK.....	57
5.4.1.1.2 MOLEGRO	58
5.4.1.2 BUTIRILCOLINESTERASE	59
5.4.1.2.1.AUTODOCK.....	59
5.4.1.2.2 MOLEGRO	60
5.4.2 DOCKING MOLECULAR DOS DERIVADOS FENÓLICOS.....	61
5.4.2.1 ACETILCOLINESTERASE	62
5.4.2.1.1. DOCKING MOLECULAR ENTRE OS DERIVADOS 26, 24, 1, 6 E ACHE	62
5.4.2.2 BUTIRILCOLINESTERASE	72
5.4.2.2.1. DOCKING MOLECULAR ENTRE OS DERIVADO 24, 26, 1, 2 E BCHE	72
5.5 PLANEJAMENTO RACIONAL DE NOVOS DERIVADOS FENÓLICOS.....	79
5.5.1 ESTUDOS DE QSAR-2D (HQSAR) DOS NOVOS DERIVADOS FENÓLICOS	81
5.5.2 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DOS NOVOS DERIVADOS FENÓLICOS	82

5.5.2.1 Acetilcolinesterase.....	82
5.5.2.2 BUTIRILCOLINESTERASE	84
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE ALZHEIMER

1.1.1 Histórico

Em 1907 o neuropatologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915) publicou o histórico clínico de uma mulher que apresentava alterações de comportamento e deterioração cognitiva progressiva, referente a um quadro de demência que não podia ser classificado em nenhuma doença conhecida na época. Após o falecimento da paciente, em exame anatomopatológico, Alzheimer detectou dois tipos de lesões no tecido cerebral, conhecidos, atualmente, como placas senis (PS) e emaranhados neurofibrilares (ENF). No ano seguinte, outro pesquisador chamado Kraepelin começou a referir-se a essa condição como doença de Alzheimer (DA), alcunha pela qual é conhecida até hoje (MESULAM, 2000).

Estudos neuropatológicos da década de 1970 mostraram que os substratos neuropatológicos da DA e da demência senil eram iguais e estas doenças passaram a ser consideradas formas do mesmo processo (TERRY, 1976)

O significado do termo DA, descrito pela primeira vez como um demência pré-senil, tem mudado ao longo dos anos, abrangendo, agora, demência pré-senil, demência senil, comprometimento cognitivo leve e DA pré-clínica; todos estes dentro do contexto da patologia relacionada à DA (FERRER, 2012).

Com o envelhecimento da população mundial, a DA passou de uma forma relativamente rara de demência para níveis epidêmicos, dando origem a uma enorme carga social e econômica, gerando interesse crescente tanto na população quanto a comunidade científica (NITRINI, 1999)

1.1.2 Aspectos Epidemiológicos

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, que causa perda de memória e altera as funções intelectuais superiores (ALCALA MDEL *et al.*, 2003), sendo a forma mais comum de demência em idosos, acometendo cerca de 50–60% de todos os casos entre as pessoas com mais de 65 anos de idade (MCDOWELL, 2001). A DA está associada a fatores de risco, como, idade avançada (BERTRAM *et al.*,

1998) diabetes (MARTINS *et al.*, 2006) hipertensão (KIVIPERTO *et al.*, 2002), elevados níveis de colesterol (KIVIPERTO & SOLOMON, 2006) e fumo (ANSTEY *et al.*, 2007). Geralmente, o quadro evolui para morte em torno de 8 a 10 anos após o início da doença (MOHS, 2005), onde a prevalência da DA cresce, exponencialmente, com o aumento da idade (Figura 1) (MEBANE-SIMS, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization; OMS, 2012), estima-se que existam, atualmente, cerca de 18 milhões de pessoas no mundo com DA e, numa projeção desse quadro para 2025, estima-se um aumento de 34 milhões casos. Grande parte deste aumento se dará nos países em desenvolvimento, devido ao envelhecimento da população. Atualmente, mais de 50% das pessoas com DA vivem em países em desenvolvimento e, em 2025, seria mais de 70%.

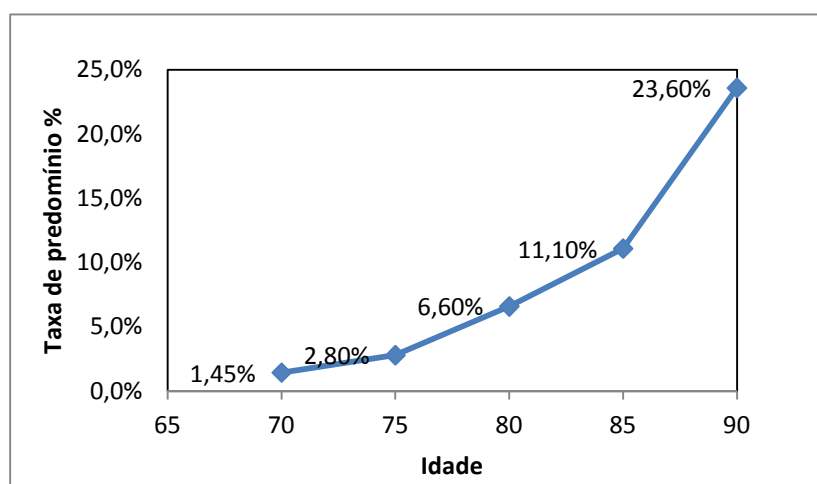


Figura 1. Prevalência da doença de Alzheimer – Aumento exponencial com a idade.

(WHO http://www.searo.who.int/Section1823_8066.htm, em 21 de outubro de 2012)

Aproximadamente 7,1% da população brasileira com 65 anos de idade ou mais tem alguma forma de demência (Figura 2), onde a DA é responsável por 55,1% dos casos; a demência vascular, por 9,3%, e a doença cérebro-vascular, por 14,4% (HERRERA *et al.*, 2002).

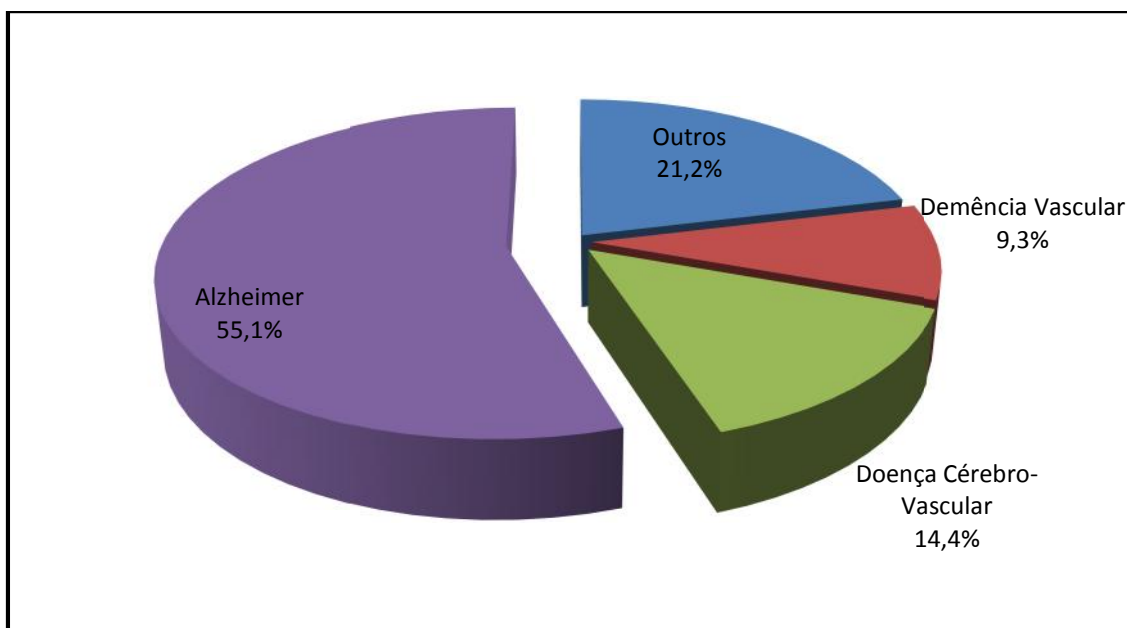


Figura 2. Principais demências na terceira idade no Brasil (adaptado de HERRERA *et al.*, 2002).

1.1.3 Etiopatogenia da doença de Alzheimer

Demência é um termo geral que descreve uma variedade de doenças e condições que se desenvolvem quando as células nervosas do cérebro morrem ou deixam de funcionar normalmente. A morte ou o mau funcionamento dos neurônios provoca mudanças na memória, no comportamento e na capacidade de pensar com clareza. Na DA, estas alterações cerebrais prejudicam a capacidade do paciente de realizar funções básicas, como andar e engolir (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION, 2012)

A DA é descrita como uma síndrome multifacetada que surge como consequência de danos neuronais causados por múltiplas e distintas alterações biológicas, que se apresentam como características histopatológicas. Estas alterações são a deposição de substância amilóide na forma de placas senis (PS) nos vasos cerebrais e a perda neuronal associada a acúmulo intracelular de emaranhados neurofibrilares (ENF) nos neurônios (CUTLER & SRAMEK, 2001; WINBLAD *et al.*, 2008). Além destas características, observa-se, também, a perda de sinapses e a depleção da inervação colinérgica cortical (CARAMELLI, 2000). As PS e os ENF podem estar presentes em cérebros normais senis, porém, em menor quantidade (RICHARD & AMOUYEL, 2001). Na DA, além dos ENF e das PS, pode-se observar perda de sinapses e depleção da inervação colinérgica cortical (CARAMELLI, 2000).

1.1.3.1 Placas Senis

As placas senis (PS), ou placas amilóides, são estruturas resultantes da deposição ou agregação que ocorre após a clivagem anormal da proteína precursora amiloide (PPA), uma glicoproteína com domínio extracelular extenso e domínio citoplasmático curto, encontrada em quase todas as células de mamíferos, presente em concentração elevada nos neurônios (ARAÚJO, 2010). As enzimas responsáveis pela clivagem da PPA são as α , β e γ secretases. Na DA, a PPA sofre clivagem amiloidogênica, dando origem a concentrações elevadas de uma família de peptídeos de folhas β (Figura 3). O principal componente proteico PS os peptídeos β amilóides (β A), porém, observa-se a presença freqüente das isoformas A β 42 e A β 40 (WEINER *et al.*, 2012).

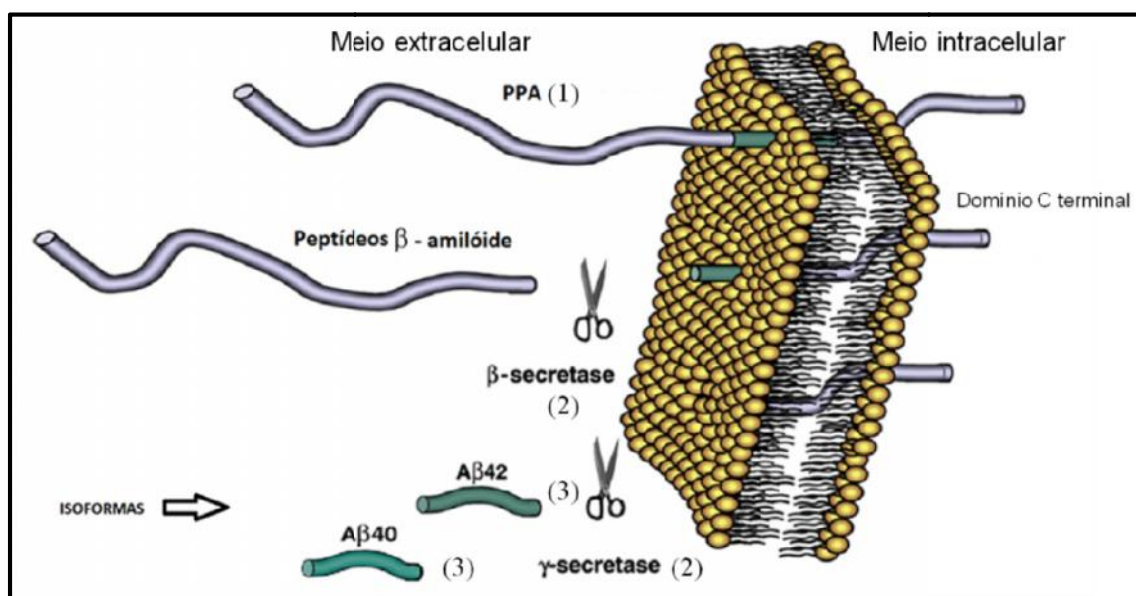


Figura 3. Clivagem da proteína precursora amiloide (PPA) (1) iniciado pelas enzimas β e γ secretases (2) gerando peptídeos da família β amiloide e suas isoformas A β 42 e A β 40 (3) (adaptado de WEINER *et al.*, 2012).

O acúmulo de proteínas β A promove a sua precipitação e agregação em forma de placas que provocam um processo inflamatório e/ou oxidativo que leva à perda da função neuronal (Figura 4) (CARAMELLI, 2000).

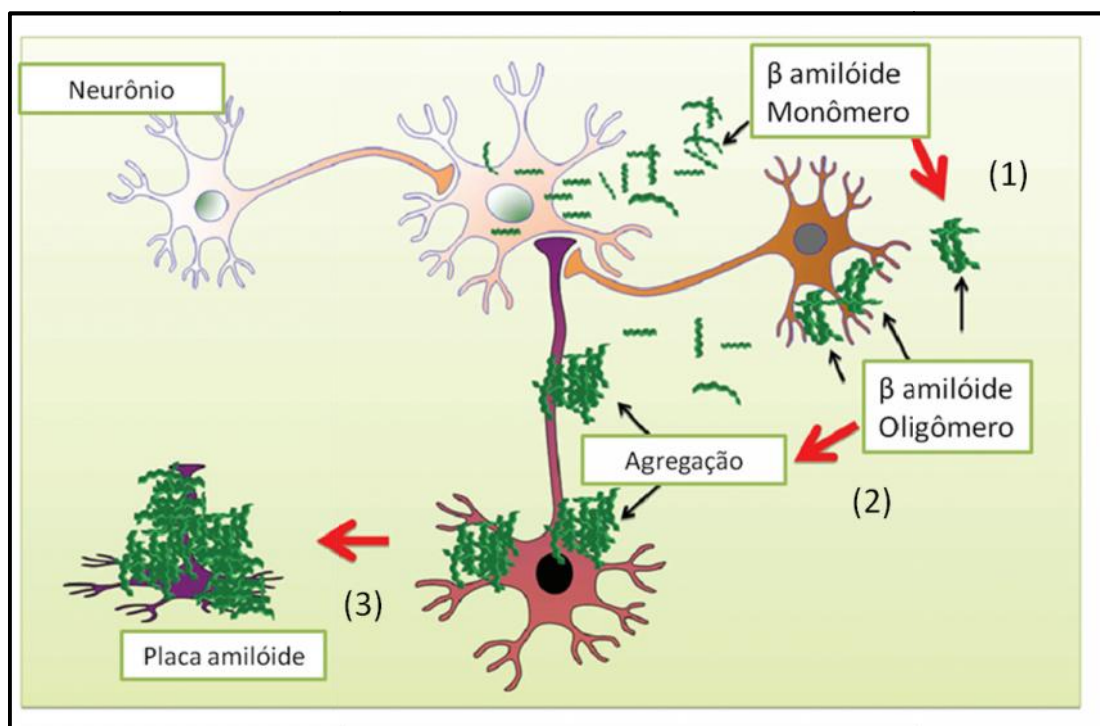


Figura 4. Formação de oligômeros de proteínas β amilóides (1), agregação dos oligômeros (2) e formação de placas amilóides com perda da capacidade de realizar sinapses (3) (adaptado de KUNG, 2012)

1.1.3.2 Emaranhados Neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares (ENF) são filamentos intraneuronais helicoidais de proteína *tau* que, normalmente, fazem parte do citoesqueleto e têm papel importante na manutenção da estabilidade dos microtúbulos, mas que são fosforilados de maneira anormal. O cérebro humano começa a produzir uma forma anormal da proteína *tau* fosforilada, que não se liga aos microtúbulos e encontra-se em concentrações elevadas no citosol. Sob tais condições, a proteína *tau* anormal tende a formar agregados não biodegradáveis. Não se sabe ainda o porquê das células não eliminarem o material anormal (BRAAK & DEL TREDICI, 2012). O acúmulo dos ENF no interior dos neurônios prejudica o transporte axoplasmático e leva à morte celular. Esses ENF estão presentes em todos os pacientes com DA. Contudo, isso não é uma característica distintiva da DA, uma vez que esses ENF também são encontrados em outras doenças, como síndrome de Down, paralisia supra nuclear progressiva e demência associada à doença de Parkinson (PETRELLA, COLEMAN & DORAISWAMY, 2003)

A primeira teoria para explicar completamente a formação de ambas as marcas patológicas (PS e ENF), formulada em 1992, foi a hipótese da cascata amilóide. No entanto, a remoção das placas amilóides não interrompe a progressão da

doença, indicando que esta hipótese isolada não é suficiente para explicar esta patologia (LUAN, ROSALES & LEE, 2012)

A causa da DA ainda é um tema controverso, e não existem tratamentos disponíveis que possam impedir a progressão desta doença. Os tratamentos atuais só ajudam a aliviar os sintomas (ROBICHAUD, 2006). Os processos neurodegenerativos com perda considerável de neurônios colinérgicos, resultando numa falha de transmissão central colinérgica, conduziram a formulação da “hipótese colinérgica” (PERRY, 1986) (SCHLIEBS & ARENDT, 2006).

1.1.3.3 Hipótese colinérgica

Diversos sistemas neurotransmissores como colinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico estão alterados na DA. Este fato chamou a atenção para a existência de algumas alterações bioquímicas em pacientes com DA, como a depleção de neurotransmissores (GUALTIERI *et al.*, 1995).

Apesar de muitos sistemas neurotransmissores estarem alterados na DA, o sistema colinérgico parece ser o mais comprometido, pois apresenta degeneração das projeções neuronais; perda dos terminais colinérgicos do córtex cerebral; redução da atividade da colina acetiltransferase e redução da síntese de acetilcolina; redução da recaptação de colina; aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE); redução do número de receptores muscarínicos M2; redução do número de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 42$ e $\alpha 7$ (GUALTIERI *et al.*, 1995).

A hipótese colinérgica, desenvolvida há pouco mais de 30 anos, pouco antes da hipótese amilóide, foi até então, o alicerce mais importante para o desenvolvimento de novos fármacos para a DA.

De acordo com esta hipótese, a degeneração dos neurônios colinérgicos é caracterizada pelo baixo nível de acetilcolina (ACh) no hipocampo e córtex (TERRY & BUCCAFUSCO, 2003), provocando declínio cognitivo e perda de memória (SCHLIEBS & ARENDT, 2006). A ACh desempenha um papel importante no comportamento e na memória, o que, conseqüentemente, destaca a importância das enzimas que hidrolisam este neurotransmissor, isto é, a acetilcolinesterase (ACh, EE.C. 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, E.Cr. 3.1.1.8) (SUSSMAN *et al.*, 1991)

No que diz respeito ao mecanismo da DA, ambas as hipóteses, cascata amilóide e colinérgica, são aceitas. Pesquisas recentes com evidências experimentais *in vitro* e *in vivo* indicam que estas duas hipóteses estão inter-relacionadas (GUPTA *et al.*, 2011).

Recentemente, a gênese das placas da proteína amilóide foi associada à algumas alterações de ambas as enzimas, AChE e BChE, uma vez que a utilização de inibidores de ChE (AChEI) levam à diminuição destas placas em pacientes com DA (GREIG, LAHIRI & GIACOBINI, 2005; MUSIAL, BAJDA & MALAWSKA, 2007). Adicionalmente, a atividade de AChE diminui progressivamente em certas regiões do cérebro em pacientes em estágio médio ou avançado de DA, alcançando 10–15% dos valores normais, enquanto a atividade de BChE está inalterada, ou ainda, com um aumento de 20%. Assim, o aumento da atividade de BChE é maior no hipocampo e no lobo temporal em pacientes com DA.

Os depósitos de material amilóide são observados muitos anos antes de ocorrer a degeneração neuronal e demência; isto sugere que algumas placas podem ser benignas. Ambas as enzimas, AChE e BChE, estão associadas à presença de material amilóide em pacientes idosos com ou sem alterações significativas da memória. É importante salientar que estes fatores podem contribuir para a transformação do amilóide benigno em patogênicas. Placas amilóides avançadas em cérebros de pacientes com DA tem 87% de reatividade para BChE, comparado com 20% de reatividade em estágios iniciais da doença, considerados ainda como depósitos benignos. É possível que a BChE desempenhe um papel importante na transformação de placas benignas em formas malignas associada à degeneração neuronal e demência clínica (BALLARD, 2002).

Assim, não é vantagem uma inibição seletiva da AChE; ao contrário, é desejável uma inibição equilibrada da AChE e da BChE, onde uma seletividade para BChE pode resultar em maior eficácia (GIACOBINI, E. , 2004; TUMIATTI *et al.*, 2010). O acúmulo da substância β amilóide é considerado como uma característica fundamental na patogênese da DA. No entanto, outras alterações moleculares e neuroquímicas também ocorrem, como disfunção colinérgica. A descoberta precoce neste campo foi importante, impulsionando estratégias nas abordagens de tratamento, com o uso de inibidores da AChE.

A abordagem terapêutica mais aceita, atualmente, é a inibição da AChE. Considera-se esta abordagem adequada, pois a inibição desta enzima, além de

aumentar a oferta de acetilcolina na fenda sináptica, também impede o surgimento de complexos neurotóxicos (RECANATINI & VALENTI, 2004)

1.1.4 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que pertence à classe das serino-hidrolases e pode se apresentar na forma solúvel ou ligada à membrana. A forma solúvel é encontrada nas terminações nervosas colinérgicas, onde regula a concentração de acetilcolina livre. Dessa forma, a concentração desse neurotransmissor permanece elevada nas sinapses, e os receptores nicotínicos e muscarínicos, responsáveis pela resposta cognitiva, podem ser ativados. A forma ligada à membrana ocorre em locais inesperados como o eritrócito (RANG, 2004).

A primeira estrutura tridimensional (3D) da AChE determinada, em 1991, é de *Torpedo californica* (SUSSMAN *et al.*, 1991) e desde então, muitas outras estruturas 3D de AChE livre ou em complexo com diversos inibidores, a partir de diferentes espécies, foram determinados e depositados no banco de dados PDB (do inglês, *Protein Data Bank*) do RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*).

A estrutura 3D da AChE de *T. californica* complexada com o íon decametônio, disponível no banco de dados PDB sob o código 1ACL (HAREL *et al.*, 1993), revela um aspecto estrutural interessante desta enzima, onde o sítio ativo está localizado no final de um canal profundo e estreito, com cerca de 20 Å de profundidade, chamado “garganta aromática”, assim denominada, pois mais de 50% de seus aminoácidos são resíduos aromáticos conservados (Phe120, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Trp84, Trp233, Trp279, Trp432, Tyr70, Tyr121, Try130, Try334 e Tyr442) (XU *et al.*, 2008). O sítio ativo consiste da tríade catalítica (Ser200, Glu327 e His440), do sítio catalítico aniônico (Trp84, Glu199 e Phe330), da cavidade do oxiânion (Gly118, Gly119 e Ala201) e da cavidade do grupo acila (Phe288 e Phe290). Esta enzima possui também um sítio aniônico periférico (PAS, do inglês *peripheral anionic site*, Asp72, Tyr70, Tyr121, Trp279 e Phe290), localizado na entrada da "garganta aromática" (KRYGER, SILMAN & SUSSMAN, 1998) (Figura 5).

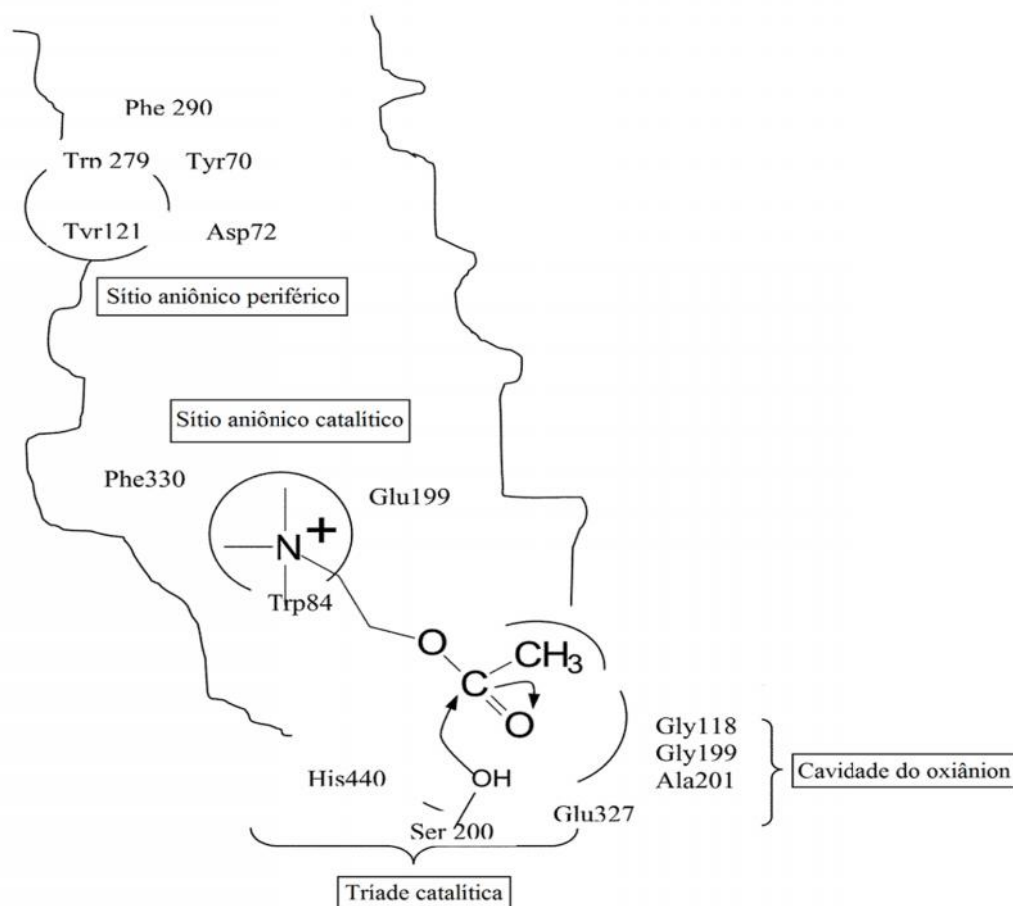


Figura 5. Representação esquemática do sítio ativo da acetilcolinesterase com a ACh (ARAÚJO, 2010).

Uma estratégia utilizada para aumentar a potência e a seletividade de um fármaco, quando existem múltiplos sítios de reconhecimento, como observado na AChE, é o desenvolvimento de compostos com ação dual, isto é, que permita ligação tanto no sítio ativo quanto no sítio aniônico periférico (CAMPS *et al.*, 2000). Neste sentido, tem se feito um grande esforço para desenvolver novos inibidores de AChE mais potentes e seletivos.

Uma melhor compreensão do sítio catalítico de AChE pode identificar novos mecanismos de inibição desta enzima que poderiam resultar em compostos terapeuticamente benéficos. Estudos cinéticos e termodinâmicos têm revelado que os inibidores podem interagir com um ou ambos os sítios de ligação de AChE (AULETTA, JOHNSON & ROSENBERRY, 2010). Esta é a abordagem de desenvolvimento empregada por YU e colaboradores (YU *et al.*, 2010).

Além disso, tem sido demonstrado que compostos capazes de interagir simultaneamente com os sítios ativo e periférico de AChE (isto é, um inibidor dual, como o íon decametônio) podem interferir, também, na agregação de β amilóides,

desempenhando, assim, uma atividade que vai além da atividade inibitória sobre a enzima.

O mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE (Figura 6) envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações hidrogênio, o que produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise da serina acetilada regenera o sítio catalítico da enzima (SILVA, 2002).

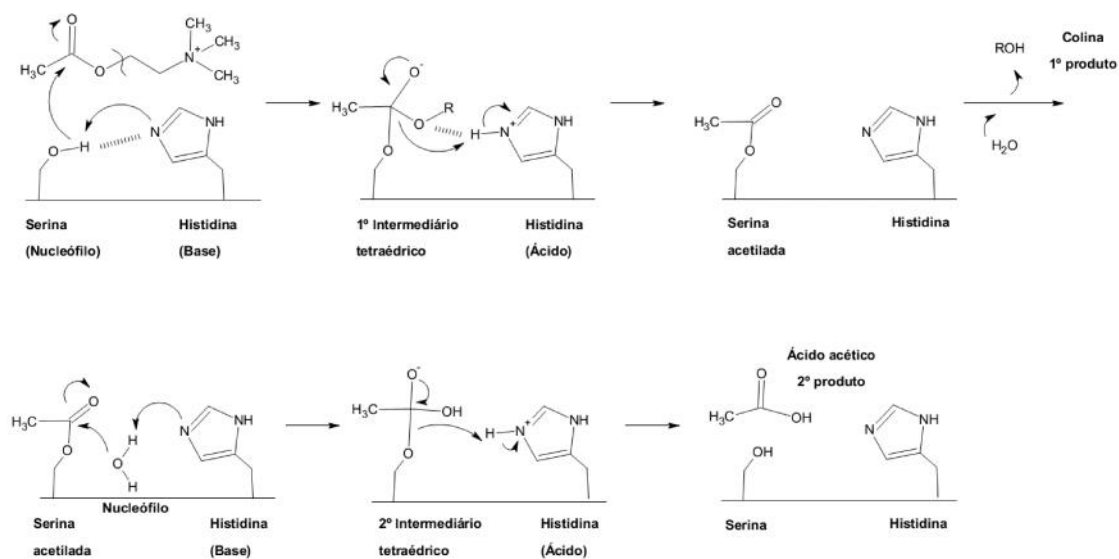


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase (ARAÚJO, 2010).

1.1.5 Butirilcolinesterase

Além da AChE, outro tipo de colinesterase é encontrado no sistema nervoso central, a butirilcolinesterase (BChE) ou pseudocolinesterase. A BChE possui ampla distribuição, sendo encontrada em tecidos como fígado, pele e músculo liso (RANG, 2004).

Ambas as enzimas são capazes de hidrolisar a acetilcolina (ACh), mas a AChE tem uma atividade hidrolítica 10^{13} vezes maior do que a da BChE, à mesma temperatura e pH. De fato, no cérebro normal, a atividade da AChE predomina sobre a da BChE. Além disso, é relatado que a AChE pode desempenhar um papel chave na aceleração da deposição de placas amilóides (PAN *et al.*, 2008).

Entretanto, evidências demonstram que a atividade da AChE diminui progressivamente em determinadas regiões do cérebro quando a DA chega ao estágio médio e avançado, alcançando apenas 10-15% dos valores normais, enquanto que a

atividade da BChE é inalterada ou, até mesmo, aumentada em 20% com a progressão da doença. Portanto, uma quantidade de BChE está disponível em neurônios e placas neuríticas (YU *et al.*, 2010).

As enzimas AChE e BChE humanas possuem 65% de similaridade na sequência primária de aminoácidos. A estrutura 3D da BChE, de modo geral, é semelhante a da AChE, incluindo tríade catalítica, sítio catalítico, aniônico e PAS (PAN *et al.*, 2008). A principal diferença reside na cavidade do grupo acila, onde três resíduos aromáticos presentes na AChE são substituídos por resíduos menos volumosos na BChE, o que resulta numa cavidade maior, permitindo a hidrólise de grupos mais volumosos.

A estrutura 3D da BChE de *Homo sapiens* complexada com o ácido butanóico, disponível no PDB sob o código 1P0I (NICOLET *et al.*, 2003), evidencia que o sítio ativo também está localizado no final de um canal profundo e estreito. O sítio ativo consiste da tríade catalítica (Ser198, Glu325 e His438), da cavidade do grupo acila (Leu286 e Val288). O sítio aniônico periférico (PAS) desta enzima é composto e está localizado na entrada da garganta aromática e pode ter uma função de "guardião eletrostático". Os resíduos deste sítio PAS são Asp70 e Tyr332 (NAWAZ *et al.*, 2011) que parecem ser responsáveis pela interação eletrostática inicial com os substratos de carga positiva e modificam a arquitetura do sítio ativo da BChE.

Algumas evidências sugerem que a inibição da BChE no cérebro pode representar uma estratégia terapêutica para a DA. É relatado, ainda, que a BChE desempenha um papel fundamental, que pode, em parte, compensar a ação da AChE. Por isso, um bom equilíbrio entre os perfis de inibição da AChE e BChE pode resultar em melhor efeito, na cognição, nas atividades da vida diária e na função global em pacientes com DA de grau leve a moderado (GIACOBINI, E., 2004).

1.1.6 Tratamento da doença de Alzheimer

Ainda não existe cura para a DA, entretanto, as opções de tratamento disponíveis aliviam os sintomas e trazem benefícios significativos para os pacientes e suas famílias.

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs) foram os primeiros medicamentos aprovados e utilizados no tratamento dos sintomas dos pacientes com DA (SMALL & BULLOCK, 2011). Os AChEIs têm demonstrado eficácia em três grandes domínios: atividades do cotidiano, comportamento, e função cognitiva. Eles provocam o acúmulo

de acetilcolina nos receptores colinérgicos, produzindo efeitos equivalentes aos da estimulação excessiva dos receptores colinérgicos nos sistemas nervoso central e periférico.

Historicamente a fisostigmina foi descrita como a primeira substância inibidora de colinesterase capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica sendo muito útil em neurologia. A fisostigmina é um alcalóide obtido a partir da fava de Calabar uma planta perene escalada em tropical da África Ocidental. Esta substância restaura a transmissão colinérgica no cérebro aliviando os sintomas clínicos de disfunção colinérgica central, é utilizada no tratamento de glaucoma, em anestésias e em intoxicação por atropina, escopolamina e outras drogas anticolinérgicas (DWORACEK & RUPREHT, 2002). Embora tenha demonstrado melhoras significativas da cognição em estudos clínicos controlados, mostrou efeitos adversos importantes, como a elevação de enzimas hepáticas (demandando controles periódicos de TGO e TGP), além de requerer várias tomadas ao dia.

A tacrina foi o primeiro AChEI introduzido na terapia para o tratamento contra a DA (TUMIATTI *et al.*, 2010). Dentre os AChEIs aprovados para uso na DA, donepezil e galantamina inibem seletivamente a AChE, enquanto que tacrina e rivastigmina inibem tanto a AChE quanto a BChE (Figura 7) (MUSIAL, BAJDA & MALAWSKA, 2007).

A segunda geração de inibidores da acetilcolinesterase, mostrou ter bem menos toxicidade hepática e maior facilidade posológica. Os efeitos colaterais são, em geral, gastrointestinais, tipo náuseas, vômitos e diarreia, podendo também afetar o sono. Com isso o planejamento de novos compostos que possam inibir ambas as colinesterases, interagindo em ambos os sítios (catalítico e PAS) e que apresentem menos reações adversas representa uma estratégia inovadora para o tratamento de pacientes com DA (TUMIATTI *et al.*, 2010).

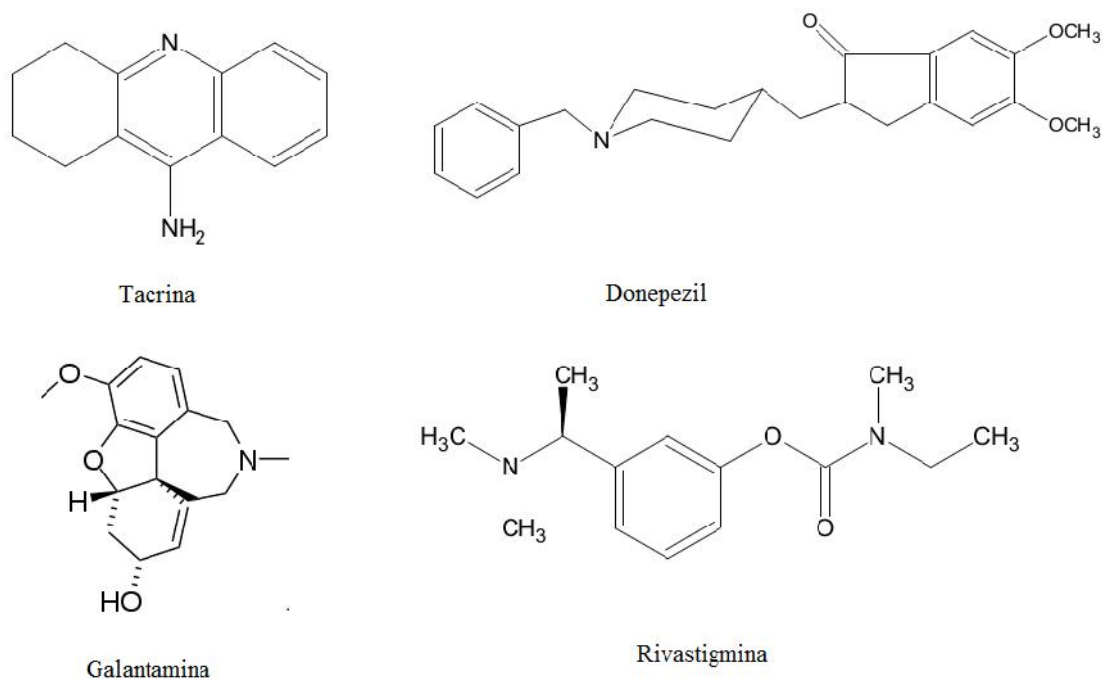


Figura 7. Estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer.

1.1.7 Inibidores de sítio dual de colinesterases

Com base na estrutura 3D da AChE, uma série de derivados 4-[(dietilamino)-metil]-fenóxi-alkil-amina (Figura 8) foi planejada e avaliada, mostrando potente atividade inibitória frente às enzimas AChE e BChE (YU *et al.*, 2010). Esta série foi desenvolvida baseada no processo de otimização de compostos anteriormente desenvolvidos por este grupo que indicaram a existência de uma boa atividade, devido a forte interação com o sítio ativo. Além disso, também descreveram que a introdução de um segundo grupamento com o grupo amina melhorava a inibição de AChE devido a interações eletrostáticas com o PAS da enzima, o que é desejável para uma melhor inibição (YU *et al.*, 2010).

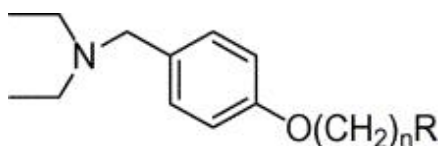


Figura 8. Estrutura geral dos derivados fenólicos (adaptado de Yu *et al.*, 2010)

Os compostos sintetizados por Yu e colaboradores (2010) (Tabela 1), foram testados contra as enzimas AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) e BChE de soro de cavalo (*Equus caballus*), empregando o ensaio de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961).

A série desenvolvida por Yu e colaboradores foi escolhida para o presente estudo baseando-se nas características descritas anteriormente e por apresentarem uma boa quantidade de compostos com boa distribuição de atividade.

1.2. Modelagem Molecular

O processo de descoberta de novos fármacos é dispendioso, tanto em relação a tempo quanto aos recursos empregados. Em geral, para que um novo fármaco seja lançado no mercado, são necessários de 12 a 24 anos de desenvolvimento, com um gasto estimado entre 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares (GELDENHUYS *et al.*, 2006). Dessa forma, é necessária a utilização de técnicas que otimizem o planejamento de novas entidades químicas que possam atuar como fármacos, com o intuito de minimizar custo e tempo (MEEK *et al.*, 2006).

O planejamento de novos fármacos auxiliado por computador (*Computer-Aided Drug Design*, CADD) pode ser empregado para melhorar a eficiência do processo de descoberta, podendo reduzir em até 50% o custo da pesquisa por um novo agente terapêutico (GELDENHUYS *et al.*, 2006).

A modelagem molecular reúne um conjunto de técnicas computacionais que possibilita a construção e geração de modelos moleculares 3D, permitindo a análise de variações estruturais que auxiliam na interpretação de dados entre a estrutura de uma série de compostos com a variação da atividade biológica, sendo de grande importância no planejamento de fármacos (MAGALHÃES, 2009). A modelagem molecular utiliza química computacional e técnicas de visualização gráfica para a investigação de estruturas e de propriedades moleculares, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002)

Estas técnicas computacionais podem ser aplicadas utilizando duas estratégias conhecidas como planejamento "indireto" e "direto". O primeiro não depende estrutura 3D do receptor e é denominado, também, como "planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante" (LBDD, do inglês "Ligand-Based Drug Design") (SODERO,

2011). O segundo depende da estrutura 3D do complexo ligante-receptor é conhecido, também, como "planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor" (SBDD, do inglês "Structure-Based Drug Design") (KONTOYIANNI, MCCLELLAN & SOKOL, 2004). A escolha da melhor estratégia depende das informações disponíveis relacionadas ao conhecimento das estruturas dos ligantes e do alvo (OOMS, 2000).

A modelagem indireta pode usar métodos estatísticos para relacionar aspectos estruturais de moléculas pequenas (ligantes) com os valores de atividade biológica obtidos experimentalmente, identificando características específicas que são necessárias para interagir com o alvo (SODERO, 2011). De posse dessas informações, um modelo poderá ser gerado para delinear o planejamento de novos candidatos a fármacos (JORGENSEN, 2004).

Na abordagem direta, a estrutura 3D do alvo (enzima, DNA ou receptor) é conhecida. Em geral, as estruturas 3D são obtidas por métodos experimentais, como difração de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN) (ACHARYA & LLOYD, 2005), ou por métodos teóricos como modelagem comparativa, possibilitando um melhor entendimento sobre o modo de interação do ligante (KONTOYIANNI, MCCLELLAN & SOKOL, 2004). Estes dados permitem propor modificações no ligante para melhorar a afinidade e especificidade com o alvo.

1.2.1. Correlação Quantitativa entre Estrutura Química e Atividade Biológica.

Na década de 1960, Hansch e Fujita propuseram que a variação da atividade biológica de uma série de moléculas poderia ser correlacionada, quantitativamente, com a variação de parâmetros físico-químicos obtidos para estas moléculas. Essa relação ficou conhecida como "Equação de Hansch" (HANSCH & FUJITA, 1964). Estes estudos estabeleceram, pela primeira vez, a metodologia conhecida como "Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade" (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR).

Nessa mesma época, Free e Wilson correlacionaram variáveis com a atividade biológica, atribuindo o valor de 1 (um) à presença de um determinado substituinte (ou característica estrutural) e o valor de 0 (zero) a sua ausência (FREE & WILSON, 1964).

Didaticamente, a metodologia de QSAR pode apresentar de 1 até 6 dimensões. De acordo com as dimensões dos descritores moleculares, a metodologia de QSAR pode ser classificada em: i) QSAR-1D ou QSAR clássico ou análise de Hansch (HANSCH & FUJITA, 1964), onde a atividade biológica é correlacionada com propriedades de descritores globais, como parâmetros físico-químico (LogP e pKa); ii) QSAR-2D, onde a estrutura do ligante é representada por padrões estruturais bidimensionais, surgindo os descritores topológicos, como índice de conectividade (VEDANI & DOBLER, 2002); iii) QSAR-3D que emprega descritores que consideram a estrutura 3D do ligante (HOPFINGER, 1980; CRAMER, PATTERSON & BUNCE, 1988; DEBNATH, 2001); iv) QSAR-4D, em que os ligantes são representados por um conjunto de conformações em função do tempo de simulação por dinâmica molecular (HOPFINGER *et al.*, 1997); v) QSAR-5D, onde há a representação de diferentes modelos de encaixe induzido (ligante-receptor); e vi) QSAR-6D, com a representação de diferentes cenários de solvatação (LILL, 2007).

Os métodos de QSAR consistem de duas etapas básicas: i) Cálculos de descritores moleculares; e ii) Geração estatística do modelo de QSAR.

1.2.1.1. Correlação quantitativa entre a estrutura química e a atividade biológica utilizando fragmentos estruturais

O método de QSAR baseado em hologramas (HQSAR, do inglês *Hologram Quantitative Structure Activity Relationship*) emprega hologramas moleculares gerados por fragmentação da estrutura 2D. Os hologramas definem a quantidade de tipos diferentes de fragmentos que dão origem aos descritores. Os descritores 2D codificam a estrutura química que compõem um banco de dados de forma a permitir que a similaridade molecular possa ser investigada e correlacionada com a atividade biológica correspondente. Assim, a conectividade 2D das estruturas químicas é codificada em um arranjo numérico binário, onde cada número é expresso pelo uso de apenas dois dígitos, 0 e 1. A designação desse modo de representar as estruturas químicas é comumente conhecido como “mapeamento dos fragmentos” (do inglês, *fingerprint*) de uma molécula e é um dos métodos mais conhecidos de medir a similaridade química (BROWN & MARTIN, 1996). O princípio básico desta metodologia é determinar a presença ou não de determinadas características estruturais de acordo com a notação descrita a seguir,

$$X_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{característica } i \text{ está} \\ & \text{presente no composto } j \\ 0, & \text{característica } i \text{ não está} \\ & \text{presente no composto } j \end{cases}$$

Nesta notação, X_{ij} é o descritor 2D com a característica i presente ou não no composto (FRANK, HUEBEL & STREICH, 1985). Muitos esquemas de notação linear, como SLN (sigla do inglês, *Sybyl Line Notation*) (ASH *et al.*, 1997) são usados.

No método de QSAR por análise de fragmentos (HQSAR, do inglês *Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship*), apenas as estruturas 2D e a atividade biológica são usadas como dados de entrada (HURST & HERITAGE, 1997). Diferente dos métodos de QSAR- 3D, o HQSAR, como qualquer outro método de QSAR-2D, não necessita da geração de conformações bioativas nem de alinhamento molecular. Porém, informações 3D, como hibridização e quiralidade, estão incorporadas de modo codificado nos hologramas.

Os fragmentos gerados da quebra de estruturas químicas de um banco de dados são correlacionados aos dados de atividade biológica, utilizando o método estatístico dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) associado à validação cruzada (YE & DAWSON, 2009). Os fragmentos são então, mapeados e codificados por um número inteiro único, numa faixa de 0 a 2^{31} , usando um algoritmo específico (CRC, do inglês *cyclic redundancy check*). Cada número é usado para marcar um fragmento específico que é alocado em uma região específica e numerada de forma ordenada e de tamanho pré-determinado (holograma molecular) (Figura 8) (YAN *et al.*, 2009).

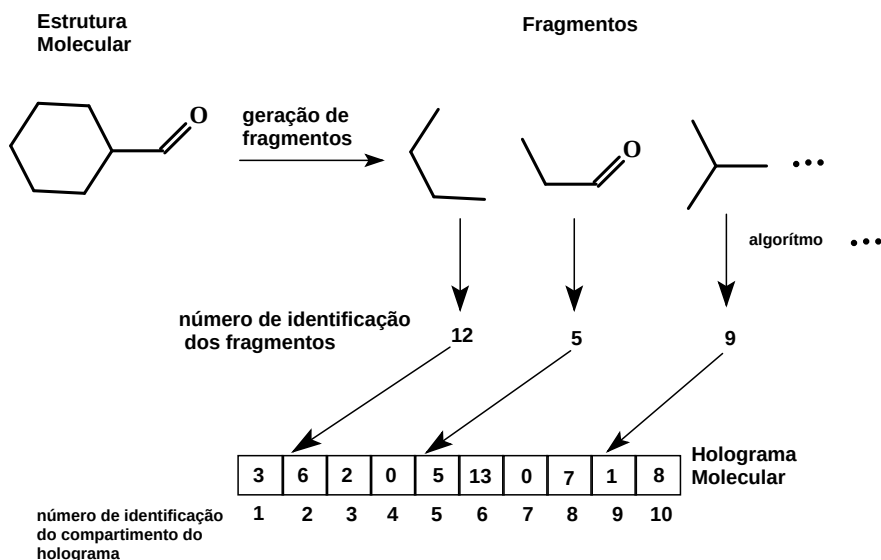


Figura 9. Geração de um holograma molecular (TONG *et al.*, 1998).

O modelo obtido por HQSAR depende do tamanho do holograma e da informação contida nos fragmentos gerados. A natureza particular dos fragmentos estruturais gerados por HQSAR e, conseqüentemente, a informação contida no holograma molecular podem ser alteradas por dois tipos de parâmetros: Tamanho do fragmento e distinção do fragmento. O tamanho do fragmento é fixado por valores mínimo e máximo de átomos que um fragmento específico pode conter. A distinção do fragmento descreve as informações contidas nos fragmentos a partir da molécula original em termos de *átomos*, *ligações*, *conectividade*, *átomos de hidrogênio* e *quiralidade*.

Uma análise completa de HQSAR envolve a investigação de fragmentos moleculares diretamente relacionados com a variação da atividade biológica de modo a que se possa propor modificações estruturais. Assim, os modelos de HQSAR podem ser representados graficamente como diagramas de códigos de cores. Onde cada cor de cada átomo reflete a sua contribuição para a variação de potência. As extremidades vermelha e verde do espectro refletem as contribuições negativas e positivas, respectivamente, enquanto que átomos com contribuições intermediários são de cor branca (Figura 10).

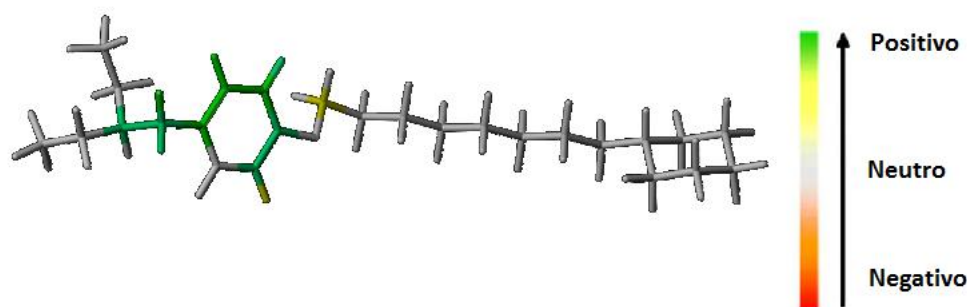


Figura 10. Exemplo de representação das contribuições atômicas individuais

1.3. Modelagem comparativa

As estruturas 3D de novos alvos moleculares, principalmente proteínas, enzimas e receptores são de grande importância para a compreensão dos fenômenos biológicos a nível molecular. Neste contexto, esforços têm sido feitos no sentido de elucidar o maior número possível de estruturas 3D (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

O número de estruturas resolvidas experimentalmente aumenta lentamente quando comparado ao número de novas seqüências primárias depositadas em bancos de dados, apesar das técnicas de determinação experimental de estrutura 3D de proteínas estar avançando rapidamente (CAVASOTTO & PHATAK, 2009). A ausência de estruturas experimentais faz com que a modelagem molecular de proteínas seja a ferramenta mais bem sucedida para a predição da estrutura 3D (SILVA & SILVA, 2007).

A modelagem comparativa, ou por homologia, é uma metodologia utilizada para criar modelos de estrutura 3D de uma proteína, baseando-se no conceito de evolução molecular, onde parte-se do princípio que proteínas com seqüências primárias semelhantes apresentam estruturas tridimensionais similares (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003; SODERO, 2011). Esta técnica baseia-se nos padrões estruturais conservados que são observados em proteínas com estruturas primárias similares, geralmente membros da mesma família (CAVASOTTO & PHATAK, 2009).

Em resumo, os padrões gerais que têm sido observados, em nível molecular, no processo de evolução biológica são: (i) homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (ii) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas; (iii) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças

(“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundária (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

Nesse momento, se faz necessário definir alguns termos, como homologia, similaridade e identidade. Homologia é o termo usado quando duas ou mais seqüências primárias de proteínas derivam da mesma seqüência ancestral. O termo similaridade refere-se à presença aminoácidos semelhantes na mesma posição em seqüências alinhadas. Identidade refere-se à presença do mesmo aminoácido na mesma posição em duas seqüência alinhadas (GIBAS & JAMBECK, 2001).

O processo de modelagem comparativa consiste, basicamente, em quatro etapas (Figura 11) (CAVASOTTO & PHATAK, 2009; RAYAN, 2009): (1) Identificação e seleção de proteínas-molde; (2) Alinhamento das seqüências primárias das proteínas; (3) Construção do modelo; e (4) Validação do modelo.

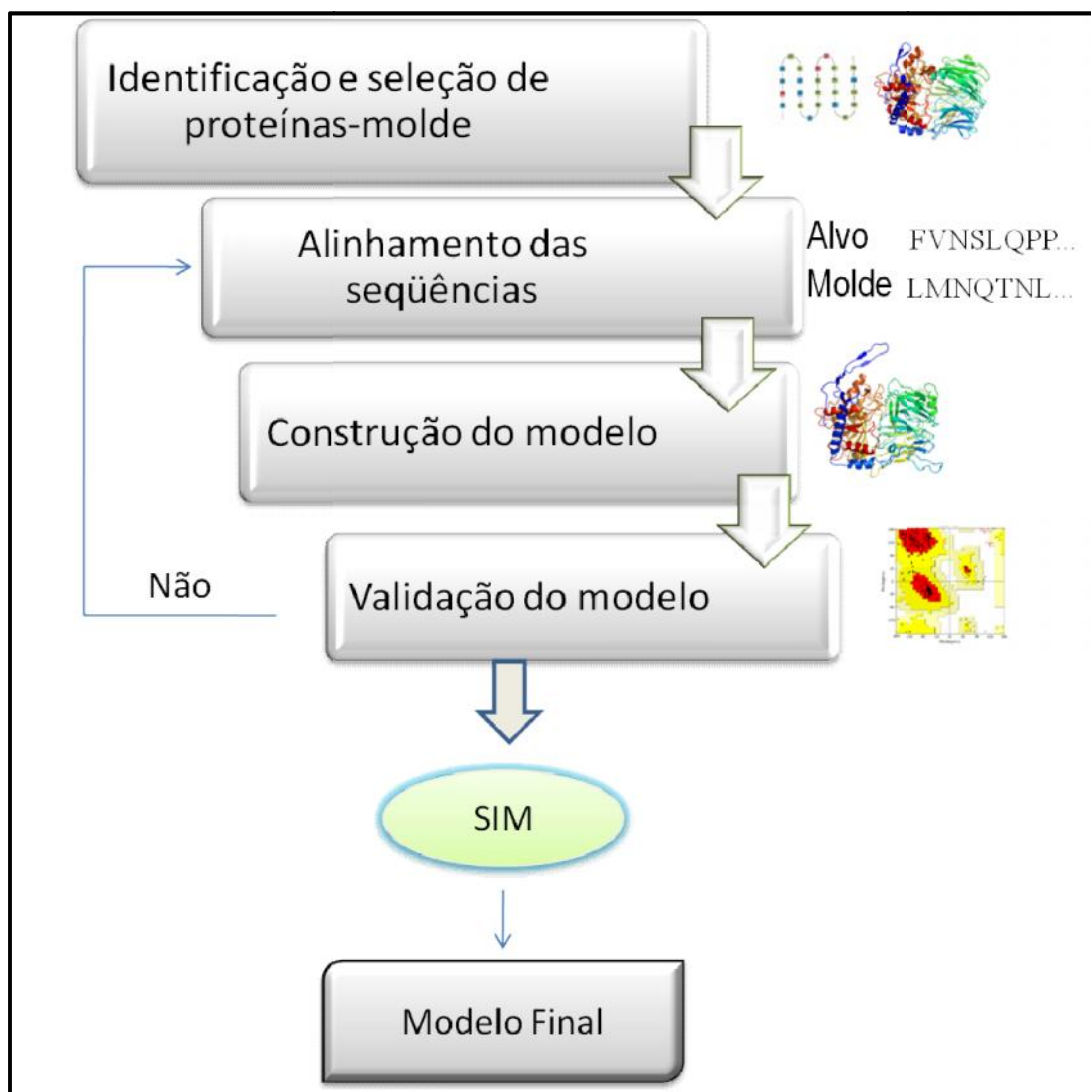


Figura 11. Etapas da construção de um modelo 3D por modelagem comparativa(Adaptado de MARTI-RENOM *et al*, 2000).

(1) Identificação e seleção de proteínas-molde

Esta etapa envolve a identificação de uma (ou mais) proteína de estrutura 3D conhecida, que servirá de molde (*template*) para a determinação da estrutura 3D da proteína-problema. Em geral, modelos confiáveis podem ser obtidos a partir de proteínas de referência que apresente 30% (ou mais) de identidade (RAYAN, 2009).

(2) Alinhamento das seqüências primárias das proteínas:

A etapa de alinhamento é crucial, pois erros na identificação de domínios geram modelos de baixa qualidade. O objetivo do alinhamento é alinhar resíduos estruturalmente equivalentes levando em conta características estruturais comuns, como elementos de estrutura secundária e resíduos catalíticos (SANTOS FILHO &

ALENCASTRO, 2003). Abordagens computacionais para o alinhamento de sequência dividem-se, em geral, em duas categorias: locais e globais.

O alinhamento local é usado para comparar apenas algumas regiões de duas sequências primárias (geralmente as regiões mais conservadas) de proteínas similares. O algoritmo mais empregado na busca por sequências similares em banco de dados é o BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O alinhamento global é usado para comparar toda a extensão de duas sequências primárias de proteínas resultando em apenas a um alinhamento (GIBAS & JAMBECK, 2001).

A qualidade de um alinhamento é determinada pela soma dos pontos obtidos pela unidade pareada (*match*) menos as penalidades pela introdução de espaçamentos (*gaps*) e posições não pareadas (*mismatch*). Existem vários programas que realizam esta tarefa de alinhamento de sequências (SOUZA, 2011), além, da inspeção visual.

(3) Construção do modelo

A construção da parte interna da proteína-alvo (regiões conservadas), fundamenta-se na idéia de que a conformação da cadeia principal da estrutura-molde pode ser transferida. Posteriormente, as conformações das alças são avaliadas, seguida da adição das cadeias laterais (RAYAN, 2009). Existem muitos métodos de modelagem das regiões conservadas. Os mais importantes são: a) modelagem por restrição espacial e b) modelagem por corpos rígidos (DAGA, PATEL & DOERKSEN, 2010).

A modelagem por restrição espacial assume que diversas características geométricas são conservadas em proteínas homólogas, ao comparar as posições equivalentes. O programa Modeller é o mais utilizado, atualmente, para a modelagem estrutural de proteínas pelo método de restrições espaciais (DAGA, PATEL & DOERKSEN, 2010). Na modelagem por corpos rígidos, o modelo é construído por partes, utilizando as regiões estruturalmente conservadas das proteínas homólogas. O servidor SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org/>) do Instituto Suíço de Bioinformática utiliza o método de corpos rígidos para a construção de modelos de modo automatizado (SOUZA, 2011).

(4) Validação do modelo

A etapa final da modelagem comparativa consiste em avaliar a qualidade do modelo, considerando diferentes níveis de organização estrutural.

Na validação da qualidade estereoquímica da estrutura, o programa mais utilizado é o Procheck que lista diversos parâmetros estereoquímicos, como ângulos torsionais da cadeia principal (Φ e Ψ), ângulos torsionais das cadeias laterais, impedimentos estéricos entre pares de átomos não ligados, além de, fornecer gráficos, como o de Ramachandran (RAMACHANDRAN & SASISEKHARAN, 1968).

A análise do gráfico de Ramachandran (Figura 12) é particularmente útil, uma vez que é possível localizar os resíduos que se encontram em regiões de energia favoráveis e desfavoráveis. Para um modelo considerado de boa qualidade, espera-se que mais de 90% dos resíduos de aminoácidos estejam nas regiões mais favoráveis (SODERO, 2011).

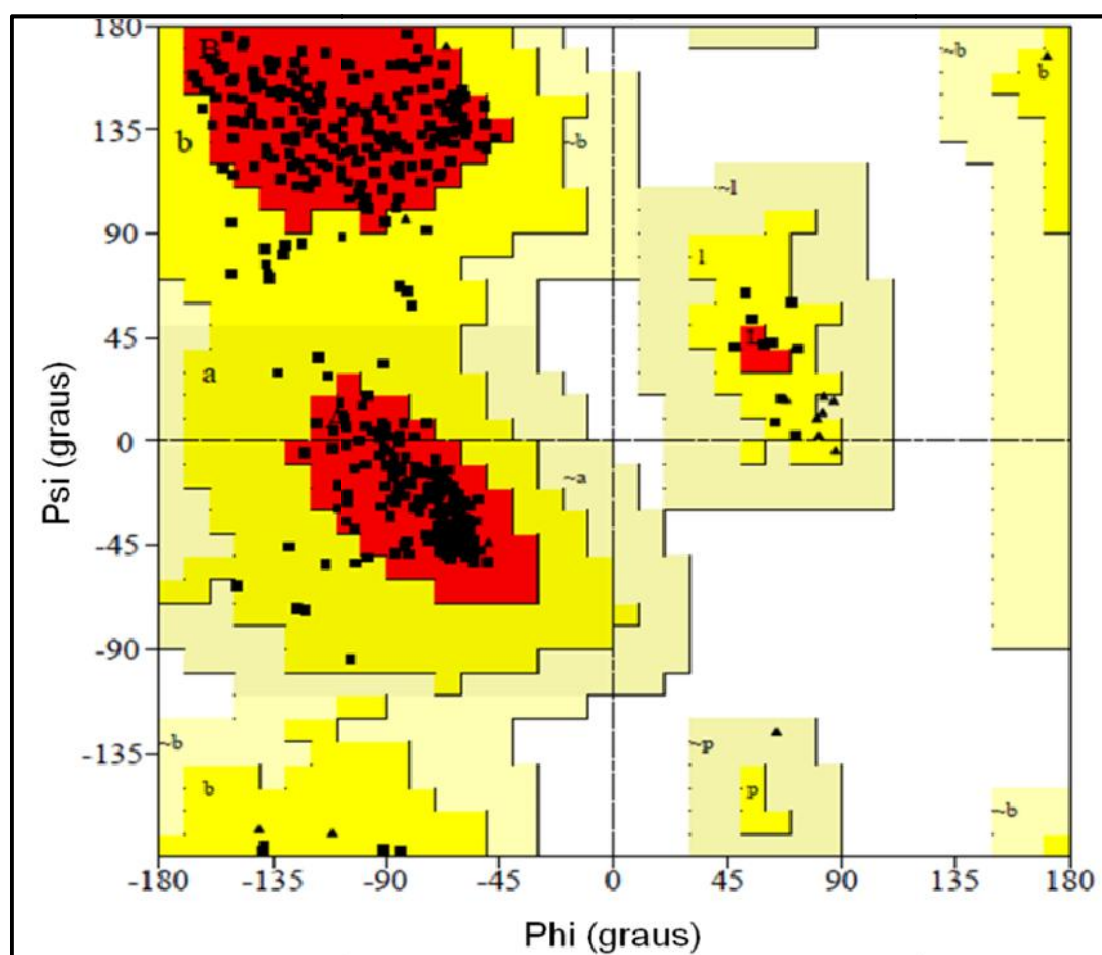


Figura 12. Gráfico de Ramachandran exemplificando a estereoquímica de acordo com a distribuição dos ângulos ϕ e ψ . Em vermelho, regiões mais favoráveis, em amarelo e creme, regiões permitidas; e em branco, regiões desfavoráveis.

A qualidade de um modelo também deve ser avaliada pela verificação do ambiente em torno de cada resíduo na proteína e análise da compatibilidade entre a estrutura 3D da proteína modelada e a sua sequência primária. O programa Verify3D exerce esta função.

O programa PROSA (do inglês, *Protein Structure Analysis*) também avalia a proteína modelada, tendo como referência o ambiente de proteínas análogas de alta resolução. Os resultados do PROSA são exibidos por um sistema de pontuação chamado Z-score e por um gráfico de energia de resíduos. O Z-score indica a qualidade geral do modelo. Seu valor é indicado em um gráfico que contém o Z-score de todas as proteínas determinadas experimentalmente depositadas no banco de dados de proteínas (PDB). Dessa forma, pode-se verificar se o Z-score da estrutura em estudo está dentro da faixa de scores tipicamente encontradas para proteínas nativas de tamanhos similares (SOUZA, 2011) (Figura 13A).

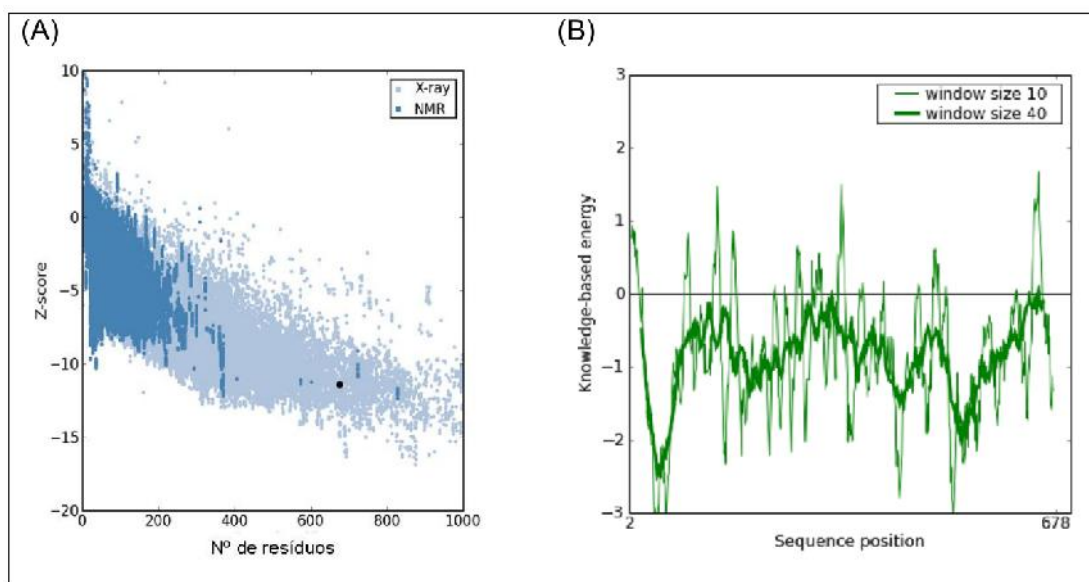


Figura 13. Exemplo do gráfico de Z-score (A) e gráfico de energia (B) obtidos pelo programa PProSA.

Uma vez pronto e validado, o modelo escolhido pode ser utilizado para estudos de interação ligante-receptor, chamados de *docking* molecular.

1.4. Docking Molecular

O *docking* molecular é uma técnica de modelagem molecular que objetiva prever a estrutura do complexo formado entre duas ou mais moléculas (LEACH, 2003) através de uma modelagem estrutural mais próxima da precisão gerando uma estimativa da atividade de um ligante (KITCHEN *et al.*, 2004)

O reconhecimento molecular de um ligante no sítio receptor de um alvo ocorre por complementaridade química entre as estruturas em estudo. Este é um processo que envolve fatores entálpicos e entrópicos considerando a flexibilidade do ligante e da proteína, o efeito do ambiente protéico na distribuição de cargas do ligante, e possíveis interações com moléculas de água presentes no meio (ALONSO, BLIZNYUK & GREARY, 2006).

A estrutura do complexo formado entre o ligante e a macromolécula fornece informações importantes sobre as interações que podem ocorrer no sítio ativo (ERICKSON *et al.*, 2004), tais como, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações hidrogênio entre outras.

Os programas de *docking* molecular geralmente são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca (orientação e conformação) e uma função de pontuação (VERDONK *et al.*, 2003)

O algoritmo de busca é empregado na pesquisa de possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína, a fim de se alcançar uma complementaridade estérica e eletrostática. O algoritmo de busca deve pesquisar detalhadamente a energia potencial para que se obtenha o mínimo global.

A função de pontuação é aplicada para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação (VERDONK *et al.*, 2003).

Como descrito acima, o *docking* molecular consiste em duas etapas principais: gerar todos os complexos possíveis e analisar cada complexo, identificando aquele que corresponde à melhor solução (SOUZA, 2011). Entre esses dois componentes, a maior limitação é referente à função de pontuação, que pode apresentar simplificações que negligenciam muitos termos, como contribuições de solvatação e entropia (SODERO, 2011). Entretanto, ela deve reconhecer soluções que apresentem boa complementaridade estérica e eletrostática entre ligante e receptor, assim como, classificar corretamente os compostos mais potentes.

Esta limitação tem motivado o desenvolvimento de métodos computacionais que sejam capazes de prever as interações entre o ligante e a proteína que estejam mais próximo possível do modo de ligação (WANG, LU & WANG, 2003). Diversos programas de *docking* molecular utilizam diferentes algoritmos de busca para geração dos complexos e diferentes funções de pontuação (*score*) para identificação do melhor complexo.

Atualmente, existem inúmeros programas de *docking* comerciais e gratuitos sendo amplamente empregados, como GOLD, FlexX, AutoDock, Glide e Molegro Virtual Docker (SOUZA, 2011). Neste trabalho foram empregados os programas de *docking*: AutoDock e Molegro Virtual Docker.

1.4.1 Algoritmos Genéticos

Algoritmos genéticos (AGs) são ferramentas para solução de problemas inspirados na teoria da evolução das espécies proposta por Darwin. Na teoria de Darwin, os indivíduos mais “adaptados” ao meio ambiente têm maior chance de sobreviver do que os menos adaptados. Como consequência, os mais adaptados têm maior chance de procriar e deixar descendentes, que perpetuaria seus genes nas gerações posteriores. Estas adaptações ocasionam mudanças nas características das populações dos organismos que transcendem o período de vida de um único indivíduo (DA COSTA & POPPI, 1999).

Os AGs consistem de três estruturas principais: i) população inicial, geralmente composta de 50 a 500 indivíduos, onde cada indivíduo é considerado como uma solução do problema; ii) função de pontuação, que atribui um valor para cada solução problema; e iii) operadores genéticos como recombinação e mutação (ZOETE, GROSDIDIER & MICHIELIN, 2009).

A recombinação (ou *crossover*) combina duas melhores soluções em uma nova solução garantindo a perpetuação das melhores características. A mutação altera aleatoriamente uma solução, gerando uma nova solução, garantindo assim, a diversidade das soluções (ZOETE, GROSDIDIER & MICHIELIN, 2009).

1.4.2 Autodock

O AutoDock é um programa que realiza *docking* molecular de um ligante com o sítio receptor de uma macromolécula. Este programa utiliza um algoritmo genético Lamarckiano (LGA), que é um AG tradicional implementado com um algoritmo de busca local, como método de busca conformacional (HALPERIN *et al.*, 2002). Cada busca conformacional consiste na geração de uma população de indivíduos. O método de busca local utilizado é baseado no algoritmo de otimização de Solis & Wets (1981), que é utilizado para a minimização de energia do melhor indivíduo em cada geração. Cada indivíduo (solução) representa um possível modo de ligação (conformação e orientação) do ligante com a proteína. Assim, cada solução é representada por um

cromossomo, constituído por genes, que representam os graus de liberdade translacional, de orientação e conformação (SODERO, 2011).

A avaliação de cada solução no *docking* é feita pela energia de interação do complexo ligante-proteína e pela energia intramolecular do ligante. Em seguida, as soluções são classificadas e as de melhor pontuação serão submetidas a processos de recombinação e mutação para gerar novas soluções.

A aplicação do método de elitismo após a formação de uma nova população, tem como objetivo preservar os melhores indivíduos de uma geração na geração seguinte, evitando que a nova população se torne pior do que a população atual (SODERO, 2011).

Ao final do processo as soluções semelhantes são agrupadas em conjuntos (*clusters*) e os conjuntos são ordenados de acordo com energia de cada grupo. A diferença entre as soluções é medida pelo valor de RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*, ou seja, Desvio Quadrático Médio das Distâncias), em angstroms (Å).

O AutoDock tem sido aplicado com sucesso na predição de modos de ligação de complexos inibidor-enzima, peptídeo-anticorpo e proteína-proteína. Ultimamente, os maiores desafios são referentes à otimização das funções de pontuação dos métodos de *docking* (ARAÚJO, 2010).

1.4.2 Molegro Virtual Docker

O Molegro Virtual Docker (MVD) ou MolDock é um programa de *docking* que emprega um método de busca heurístico, que combina algoritmos de evolução diferencial e de predição de cavidade (STORN & PRICE, 1997)

A evolução diferencial (STORN & PRICE, 1997) tem sido aplicada com sucesso nos problemas de *docking* (THOMSEN, 2003), diferenciando-se de outras técnicas baseadas em AGs por selecionar e modificar soluções candidatas de modo aleatório. A predição de cavidade é útil na identificação rápida e precisa de potenciais sítios de ligação durante o processo de busca.

A avaliação de cada solução de *docking* é realizada pela função de pontuação MolDock, que usa um potencial linear composto (PLP, *piecewise linear potential*) (GEHLHAAR *et al.*, 1995), que considera a direcionalidade da ligação hidrogênio.

Este programa possui uma função de pontuação adicional, denominada *Re-Rank*, que reclassifica as melhores soluções de *docking* (poses), aumentando a eficácia do resultado. A função de pontuação *Re-Rank* identifica as soluções mais promissoras entre as obtidas pela função de pontuação padrão MolDock, aplicando um potencial 12-6 de *Lennard-Jones* e considerando um termo de torção sp^2-sp^2 .

Estudos de *docking* mostraram que o uso da função de pontuação MolDock, seguida por um procedimento de reclassificação, é um esquema adequado para a identificação dos “melhores” modos de ligação, no lugar de esquemas de pontuação mais avançados (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

O aumento da expectativa de vida reflete o número de casos da doença de Alzheimer em todo o mundo. Até o momento, a terapia para o tratamento sintomático da DA conta apenas com inibidores das enzimas AChE e BChE que apresentam reações adversas importantes e que atrapalham a sua adesão. Assim, é essencial que novas pesquisas nessa área sejam desenvolvidas com o intuito de buscar novos fármacos para a DA.

3. OBJETIVOS

Tendo em vista o potencial inibitório, observado nos derivados fenólicos extraídos da literatura, contra as enzimas AChE e BChE, esse trabalho consiste de dois estudos de modelagem molecular que foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, o objetivo foi gerar um modelo de QSAR empregando análise de fragmentos estruturais (HQSAR), que possa ser capaz de prever a atividade biológica de novos inibidores, para ambas as enzimas. Na segunda etapa, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis interações entre as enzimas e os derivados fenólicos, empregando técnicas de modelagem comparativa e de *docking* molecular. Estes estudos visam o planejamento e o desenvolvimento de novos inibidores enzimáticos mais potentes e seletivos para BChE.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir, otimizar e analisar conformacionalmente a série de compostos em estudo, utilizando o método de mecânica molecular e o método semi-empírico RM1.
- Construir e validar modelos de QSAR-2D, empregando análise de fragmentos estruturais, HQSAR (*Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship*) para a série de 36 derivados 4-[(dietilamino)-metil]-fenóxi-alkil-amina retirados da literatura;
- Construir um modelo 3D por modelagem comparativa da BChE de soro de cavalo;
- Simulação de *docking* molecular da série de compostos em estudo na AChE;
- Simulação de *docking* molecular da série de compostos em estudo no modelo da BChE;
- Com base nos resultados dos estudos de QSAR-2D e de *docking* molecular, propor novos derivados candidatos a inibidores das enzimas AChE e BChE.

4. MÉTODOS

4.1 Construção, otimização e análise conformacional da série de (1-36).

As estruturas 3D dos compostos (YU *et al.*, 2010) foram construídas e otimizadas no programa Spartan'10 (HEHRE, 2003), versão para Windows XP, usando campo de força MMFF. Cada estrutura foi submetida à análise conformacional sistemática, MMFFaq, que adiciona um termo de energia de solvatação em água. Em seguida, a estrutura do confômero de menor energia foi otimizada pelo método semi-empírico Recife Model 1 (RM1) (ROCHA *et al.*, 2006), para obtenção das cargas atômicas parciais.

A construção dos compostos levou em consideração o estado de protonação da molécula em meio biológico (pH=7,4) utilizando o programa Chemicalize (Marvin 5.5.1.0., 2011), disponível pelo site <http://www.chemicalize.org/>.

4.2 QSAR 2D (HQSAR)

4.2.1. Banco de dados

O banco de dados utilizado para a realização do estudo de HQSAR contém 36 derivados 4-[(dietilamino) metil]-fenóxi-alkil-amina (1-36). O perfil de atividade biológica desses compostos foi avaliado em ensaios *in vitro* frente a enzimas AChE e BChE de soro de cavalo (YU *et al.*, 2010). As concentrações inibitórias expressas em IC₅₀ (μM) foram transformadas em pIC₅₀, que corresponde ao logaritmo do inverso da concentração mínima capaz de inibir 50% da atividade enzimática (-LogIC₅₀) (Tabela 1).

Este banco de dados foi dividido em um conjunto de treinamento, contendo 30 moléculas, e um conjunto de teste, contendo 6 moléculas (aproximadamente 20% do total) (KUBINYI, 1993) para ambos os estudos (AChE e BChE). As moléculas do conjunto teste foram escolhidas considerando que neste grupo deve conter compostos de alta, média e baixa atividade. Foi levado em consideração uma boa diversidade estrutural entre estes compostos, evitando possíveis problemas durante a validação do modelo de HQSAR.

Tabela 1. Estrutura química e atividade biológica (pIC₅₀, M) dos inibidores de AChE e BChE.

$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ — C_6H_4 — $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{R}$

a	n	R	pIC ₅₀ ^b		a	n	R	pIC ₅₀ ^b	
			AChE	BChE				AChE	BChE
1	2		4,86	4,99	19	6		5,79	5,66
2	2		4,94	4,69	20	6		6,02	5,77
3	4		5,47	5,85	21	6		5,67	5,87
4	4		5,17	6,14	22*	6		6,17	6,64
5	4		5,25	5,01	23	8		7,08	7,82
6*	4		4,97	5,56	24	8		7,04	8,13
7	4		4,86	4,93	25	8		6,68	7,96
8	4		4,99	5,60	26	8		7,11	7,85
9	5		6,30	5,81	27*	8		6,85	7,31
10	5		5,37	6,17	28	8		6,77	8,04
11*	5		5,61	5,03	29	8		6,85	7,77
12	5		5,75	5,51	30*	10		6,52	7,17
13	5		5,08	5,35	31	10		6,22	7,11
14	5		5,25	5,75	32	10		6,27	7,48
15	5		5,61	5,72	33*	10		5,24	6,72
16	6		6,36	5,89	34	10		6,51	7,57
17	6		6,05	5,86	35	10		6,47	7,58
18	6		5,74	5,42	36	10		6,59	7,82

a) Compostos conjunto teste*; b) Yu *et al.*, Bioorg Med Chem Lett 2010, 20: 3254-3258

4.2.2. Construção dos modelos de HQSAR para AChE e BChE

A etapa de construção dos modelos de HQSAR foi realizada no programa Sybyl 8.0 (Tripos, 2008). A estrutura química de cada composto foi gerada no programa Spartan'10, conforme descrito anteriormente.

O estudo de HQSAR possui três passos principais: a geração de fragmentos de cada molécula do conjunto de treinamento, a codificação destes fragmentos em hologramas e a correlação com os dados biológicos (DODDAREDDY *et al.*, 2004). Parâmetros que estão associados com a geração de hologramas, como comprimento do holograma (HL), tamanho do fragmento e distinção do fragmento, podem afetar o modelo de HQSAR. Assim, diferentes combinações destes parâmetros foram consideradas durante o estudo de HQSAR.

Inicialmente, as estruturas dos compostos do conjunto de treinamento, foram convertidas em fragmentos estruturais, utilizando um número mínimo de quatro e número máximo de sete átomos por fragmento. Todos os fragmentos produzidos foram alocados em tamanhos pré-definidos (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401 *bins*) de holograma molecular, e a distinção dos fragmentos foi realizada considerando uma combinação de dois ou mais dos seguintes parâmetros: átomos (A), ligações (B), conectividade (C), átomos de hidrogênio (H), quiralidade (Ch) e átomos doadores e aceptores de ligação hidrogênio (DA).

A influência do tamanho do fragmento sobre os parâmetros estatísticos foi avaliada utilizando o melhor resultado encontrado dentre as combinações das distinções dos fragmentos. A avaliação do tamanho do fragmento foi feita em intervalos pré-definidos (2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9, 7-10, 8-11 e 9-12), com o objetivo de gerar modelos mais preditivos (i.e., maior valor de q^2).

Todos os modelos de HQSAR foram gerados usando análise de regressão múltipla pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS). A validação interna foi realizada por validação cruzada (LOO, *leave-one-out*) (q^2). A validação externa foi realizada com os compostos do conjunto de teste, que não fizeram parte do desenvolvimento dos modelos de HQSAR.

O procedimento foi usado para geração de modelos para ambas as enzimas, AChE e BChE.

4.2.3 Parâmetros estatísticos usados para avaliar os modelos de QSAR

A qualidade dos modelos de QSAR pode ser avaliada em termos de vários parâmetros estatísticos. O coeficiente de correlação ao quadrado (r^2) e o coeficiente de correlação cruzada (“*leave-one-out cross-validation*”, q^2) são os parâmetros normalmente utilizados. Em muitos estudos de QSAR, usa-se $r^2 \geq 0,9$ como critério para decidir se um modelo é auto-consistente internamente. Contudo, deve-se notar que r^2 não determina, por si só, a precisão ou a acurácia dos dados. O critério $q^2 \geq 0,5$ é, normalmente, adotado em muitos estudos de QSAR. O valor de q^2 pode ser considerado como uma medida da capacidade preditiva do modelo gerado com base nos compostos do conjunto de treinamento usados (RODRIGUES, 1999). Outra informação importante é o cálculo da atividade biológica predita e sua comparação com a atividade observada pela avaliação dos valores residuais. Quanto menor o valor residual, maior é a proximidade entre a atividade calculada e aquela obtida experimentalmente. Essa análise também permite avaliar se existem compostos *outliers*.

Os compostos *outliers* são aqueles que não foram bem preditos pelo modelo de QSAR, sendo identificados a partir dos valores residuais calculados para os conjuntos de treinamento e de teste. Como eles influenciam a reta de regressão, a identificação e análise desses compostos auxiliam na compreensão dos resultados e detectam os limites de aplicação do método empregado (KUBINYI, 1993).

Nesse trabalho, foram considerados como *outliers* todos os compostos dos conjuntos de treinamento e de teste com o valor residual modular maior do que o dobro do desvio padrão da estimativa (JAISWAL & TRIVEDI, 2006).

4.3 Construção do Modelo de BChE por modelagem comparativa

Os perfis de atividade para esta enzima foram avaliados quanto a atividade inibitória da BChE utilizando metodologia que emprega o plasma de cavalo (YU *et al.*, 2010). A butirilcolinesterase (BChE) de cavalo não tem estrutura 3D determinada experimentalmente. Dessa forma, utilizou-se o método de modelagem comparativo para gerar um modelo 3D para o estudo de *docking* molecular.

Para construir o modelo de BChE de cavalo, a sequência primária desta proteína foi obtida no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot sob o código de acesso Q9N1N9.

4.3.1 Identificação e seleção de proteínas moldes

A primeira etapa consistiu na identificação de proteínas semelhantes à BChE de cavalo, com estrutura 3D determinada experimentalmente que será utilizada como molde para a construção do modelo.

Esta identificação foi feita pela pesquisa de proteínas moldes, baseada nas semelhanças de sequência primária e funcional, utilizando o programa BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), que realiza o alinhamento entre a sequência alvo e as sequências depositadas no banco de dados de proteínas PDB.

Para a construção do modelo, foi selecionada como proteína-molde a estrutura 3D de BChE humana (NICOLET *et al.*, 2003) (código PDB 1P0M, resolução de 2,38Å).

4.3.2 Alinhamento das sequências primárias

Definido o molde, foi realizado o alinhamento das sequências primárias das proteína utilizando o servidor ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007).

4.3.3 Construção do modelo 3D

A fim de escolher um modelo de BChE adequado, dois programas de modelagem comparativa foram utilizados. O servidor Swiss-Model (GUEx & PEITSCH, 1997) foi usado para construir o primeiro modelo (modelo A), seguido de otimização de geometria, usando o campo de forças Gromos96 disponível no Swiss-PDB Viewer 4.0 (GUEx & PEITSCH, 1997). Esta otimização de geometria foi realizada para remover contatos de alta energia. O programa Modeller9v10 (SALI & BLUNDELL, 1993) gerou um conjunto de 50 modelos. Os modelos com maior pontuação foram selecionados para validação, gerando o segundo modelo (modelo B).

4.3.4 Validação dos modelos e seleção do melhor modelo.

A validação dos modelos A (Swiss-Model) e B (Modeller) foi realizada para selecionar o melhor modelo. Os fatores qualidade estereoquímica e estrutural global

foram empregados para escolher o melhor modelo. O primeiro critério para seleção do melhor modelo foi baseado na análise da qualidade do gráfico de Ramachandran gerado pelo programa ProCheck (A *et al.*, 1993). Informações adicionais a respeito da qualidade dos modelos foram verificadas utilizando os programas Verify-3D (LUTHY, BOWIE & EISENBERG, 1992), e Prosa-Web (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007) (Z-score e distribuição), além dos valores de RMSD calculados em relação ao molde. Um único modelo foi escolhido para análise adicional e usado na simulação de *docking* molecular.

4.4 Docking molecular

O *docking* molecular dos compostos nos sítios ativos das enzimas AChE e da BChE foi realizado utilizando os programas AutoDock (versão 4.2) (MORRIS, G. M.; *ET AL.*, 1998) e Molegro Virtual Docker (MVD) (versão 2008.2.4) (Molegro ApS) (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006). Visando comparar os resultados de ambos os protocolos de *docking*, as ligações rotacionáveis dos ligantes foram mantidas livres e a enzima foi tratada como um corpo rígido. As estruturas 3D dos compostos em estudo (YU *et al.*, 2010) foram preparados conforme descrito anteriormente no estudo de HQSAR e foram utilizadas como estruturas de partida para o *docking* nos sítios ativos das enzimas AChE e BChE.

4.4.1 Obtenção das estruturas 3D das enzimas alvo

4.4.1.1 Acetilcolinesterase

Embora existam três estruturas 3D de enguia elétrica depositadas no banco de dados PDB estas apresentam baixa resolução (acima de 4 Å). Assim, foi escolhida a estrutura da arraia elétrica do pacífico. A escolha da estrutura depositada no PDB (*Protein Data Bank*) sob o código 1ACL (HAREL *et al.*, 1993), foi feita considerando-se a melhor resolução (R) da estrutura experimental (R=2,80Å) e a presença da estrutura de um ligante (íon decametônio, DME) (Figura 14) com alguma semelhança estrutural com os compostos em estudo. No caso, o DME possui dois grupos catiônicos terminais, em analogia aos compostos em estudo que possuem dois grupos amina terciária que podem estar protonados no meio biológico. Estas estruturas foram alinhadas para saber

se os resíduos em torno do DME estão em posição equivalente nas duas enzimas, visto que, como o *docking* é rígido, não será necessário construir um modelo.

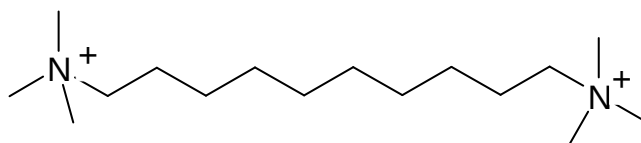


Figura 14. Estrutura 2D do ligante (íon decametônio, DME) extraído da estrutura 3D da AChE de *Torpedo californica* (PDB ID 1ACL).

4.4.1.2 Butirilcolinesterase

A estrutura 3D da BChE de cavalo (*Equus caballus*) utilizada para o estudo de *docking* molecular foi obtida por modelagem comparativa, como descrito anteriormente. A etapa de validação de metodologia conhecida como *redocking* utilizou a estrutura tridimensional depositada no banco de dados PDB sob o código 1P0I de *Homo sapiens* e foi escolhida por sua resolução ($R = 2,00\text{\AA}$). e esta possui como ligante o ácido butanóico (BUT).

4.4.2 Autodock

O Autodock 4.2 é um conjunto de programas que permite a predição do modo de interação ligante-macromolécula, utilizando *docking* parcialmente flexível (MORRIS *et al.*, 2009). Foi usada para a manipulação dos arquivos a interface gráfica Autodock Tools (ADT).

Nesse trabalho, o algoritmo de busca utilizado foi o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS, G.M.; *et al.*, 1998) que apresenta os melhores resultados na busca do mínimo global.

4.4.3.1 Preparação das enzimas

Os ligantes (DME na AChE e BUT na BChE), as moléculas de solvente e os cofatores foram removidos. Os átomos de hidrogênio polares foram adicionados nas estruturas 3D das enzimas e os átomos de hidrogênio não-polares foram mesclados com

os respectivos átomos de carbono. Cargas atômicas parciais Gasteiger foram atribuídas.

4.4.3.2 Preparação dos ligantes

Os átomos de hidrogênio foram adicionados utilizando o programa Sybyl (Tripos Inc., St. Louis, MO) e as cargas atômicas Gasteiger foram assinaladas pelo AutoDock Tools.

4.4.3.3 Parâmetros de *docking*

A fim de validar o protocolo de *docking* foi feito o *redocking* dos ligantes DME e BUT nos receptores sítios de ligação das colinesterases. Os protocolos foram avaliados com base na capacidade do programa em reproduzir os modos de ligação destes ligantes como observado nas correspondentes estruturas 3D dos complexos de raios-X.

O programa auxiliar Autogrid4 gerou os mapas de grade (ou *grids*) que são calculados considerando-se cada tipo de átomo do ligante e um mapa para as interações eletrostáticas. O tamanho dos *grids* foi corrigido para incluir o sítio ativo de cada enzima (AChE ou BChE), visto que os ligantes têm tamanhos diferentes. As dimensões da caixa do *grid* foram 60 x 60 x 60 Å ao redor do sítio ativo e o espaçamento foi de 0,375 Å.

As simulações de *docking* foram realizadas usando a função de energia livre empírica junto com o algoritmo genético lamarckiano (LGA) (MASHHADI, SHANECHI & LUCAS, 2003) com a busca de 50 poses para cada ligante. No protocolo LGA, foi usado um tamanho de população de 150 indivíduos, enquanto que foram usadas 250000 avaliações de energia para cada 100 corridas LGA. Além disso, o número máximo de interações foi ajustado para 27000; a probabilidade de mutação, para 0,02; a probabilidade de *crossover*, para 0,8.

As análises de histograma foram feitas após as buscas de *docking*. Séries de 50 soluções foram agrupadas em grupos com não mais do que 1,0 Å de desvio da raiz média quadrada (RMSD). As melhores soluções foram escolhidas a partir das soluções com menores valores de energia de *docking* no cluster que tinha o maior número de soluções.

Os parâmetros utilizados foram os mesmos tanto para o estudo de *docking* no sítio de ligação da AChE quanto no sítio de ligação da BChE.

As melhores soluções (poses) dos complexos obtidos por *docking* foram analisadas de acordo com as interações intermoleculares (enzima-ligante), tais como ligação de hidrogênio, van der Waals, hidrofóbicas e empilhamento π - π , empregando o programa AutoDock.

4.4.4 Molegro Virtual Docker

O Molegro Virtual Docker (MVD) ou MolDock é um programa de *docking* baseado num método de busca heurístico, que combina algoritmos de evolução diferencial e de predição de cavidade.

Os tipos de átomos e as ordens de ligação foram corrigidos para as estruturas dos ligantes e das proteínas, usando um módulo de preparação automatizado do MVD. Para cada complexo, átomos de hidrogênio foram adicionados e cargas atômicas parciais padrões do MVD foram assinaladas. As ligações rotacionáveis dos ligantes foram mantidas flexíveis. Durante os experimentos de *docking*, moléculas de água, cofatores e íons foram excluídos.

Potenciais sítios de ligação (cavidades) foram detectados usando o algoritmo de predição de cavidade baseado em *grid*. O tamanho da população, o número máximo de interações e a probabilidade de *crossover* foram ajustados para 200, 2000 e 0,90, respectivamente. Estes parâmetros foram ajustados após pesquisa realizada para encontrar o melhor conjunto neste sistema. Para cada complexo, foram executadas 40 corridas independentes com o algoritmo MolDock *optimizer*, retornando 15 soluções (*poses*).

A solução com maior pontuação foi comparada com a estrutura experimental conhecida (DME, para AChE e BUT, para BChE) em termos de RMSD e as poses similares foram agrupadas dentro de um RMSD de 1,00 Å. A função de classificação MolDock, com uma resolução de *grid* de 0,4 Å, foi usada para pré-calcular as pontuações de *grid* para uma avaliação rápida de *docking*.

Os parâmetros utilizados foram os mesmos tanto para o estudo de *docking* no sítio de ligação da AChE quanto no sítio de ligação da BChE.

Similarmente ao AutoDock, as melhores soluções dos complexos obtidos por *docking* foram analisadas de acordo com as interações intermoleculares (enzima-ligante), como ligação de hidrogênio, van der Waals, hidrofóbicas e π - π *stacking*, empregando o programa MVD.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção otimização e análise conformacional dos compostos

Os compostos foram construídos e otimizados utilizando o programa Spartan'10 (Wavefunction, Inc.). A distribuição de confôrmeros para cada composto foi calculada por mecânica molecular, utilizando o campo de força MMFFaq em meio aquoso.

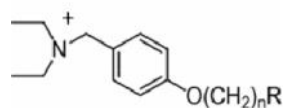
O estado de protonação da molécula em meio biológico (pH=7,4) foi avaliado empregando Chemicalize (Marvin 5.5.1.0., 2011), disponível pelo site <http://www.chemicalize.org/>.

Inicialmente, o resultado da análise conformacional mostrou numa mesma faixa de energia estruturas estendidas e dobradas (Figura 14B), o que dificultava a escolha de um confôrmero. Isto foi observado principalmente nos compostos com *n* maior ou igual a 6 (Tabela 2).

Na seleção da conformação de menor energia, comparou-se a estrutura 3D do íon decametônio (DME), obtida no PDB sob o código 1ACL (HAREL *et al.*, 1993), com as estruturas da análise conformacional dos compostos. Nesta comparação, considerou-se a distância entre os átomos de nitrogênio protonados do DME e dos compostos (Tabela 2).

Após a comparação, o confôrmero selecionado passou para a etapa de otimização de geometria, aplicando-se o método semi-empírico RM1 (ROCHA *et al.*, 2006), para obtenção das cargas atômicas parciais. O resultado desta seleção pode ser observado na Figura 15C.

Tabela 2. Distâncias entre os átomos de nitrogênio protonados, dos compostos e do íon decametônio.

[illegible]

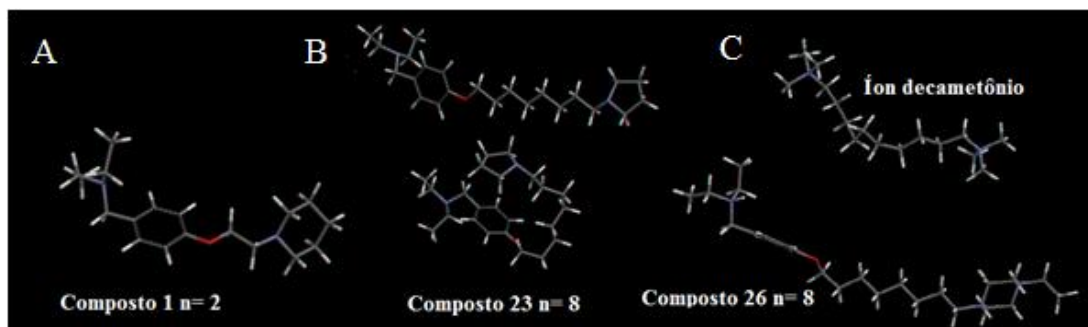


Figura 15. Resultado da análise conformacional. A) Estrutura do conformero de menor energia do composto de menor cadeia lateral (composto **1**). B) Conformações estendida e dobrada do composto **23**. C) Seleção do conformero do composto mais ativo para inibição de AChE (composto **26**) semelhante ao íon decametônio.

5.2 Modelos de QSAR-2D (HQSAR)

O estudo de HQSAR foi realizado utilizando um conjunto de dados de 36 derivados 4 - [(dietilamino) metil]-fenóxi-alkil-amina desenvolvido por Yu e colaboradores (2010). Os compostos foram divididos em conjunto de treinamento (N=6) e conjunto de teste (N=30) (* Tabela 3). A diferença entre os conjuntos reside no fato de que os compostos do conjunto treinamento fazem parte da construção do modelo de HQSAR e os compostos do conjunto de teste são utilizados na validação externa do modelo.

Esta divisão de compostos, nos referidos conjuntos, foi utilizada tanto para o estudo de inibidores de AChE, quanto para os de BChE. Os valores de IC_{50} , expressos em concentração μM , foram convertidos para unidade M e transformados em $-\log IC_{50}$ (pIC_{50}) (Tabela 1).

Como pode ser observado nas Figuras 16 e 17, os valores de pIC_{50} desses 36 compostos estão regularmente distribuídos num intervalo de aproximadamente 3 unidades logarítmicas.

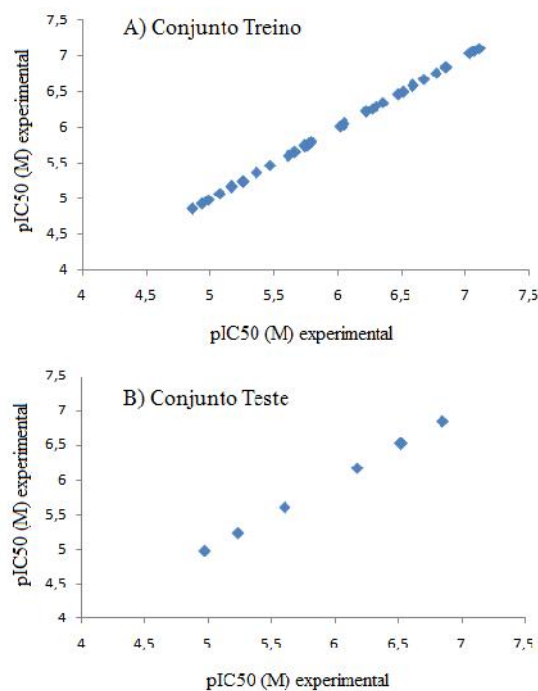


Figura 16. Distribuição dos valores de atividade biológica (pIC₅₀, M) dos compostos dos conjuntos de treinamento (A) e de teste (B) para AChE.

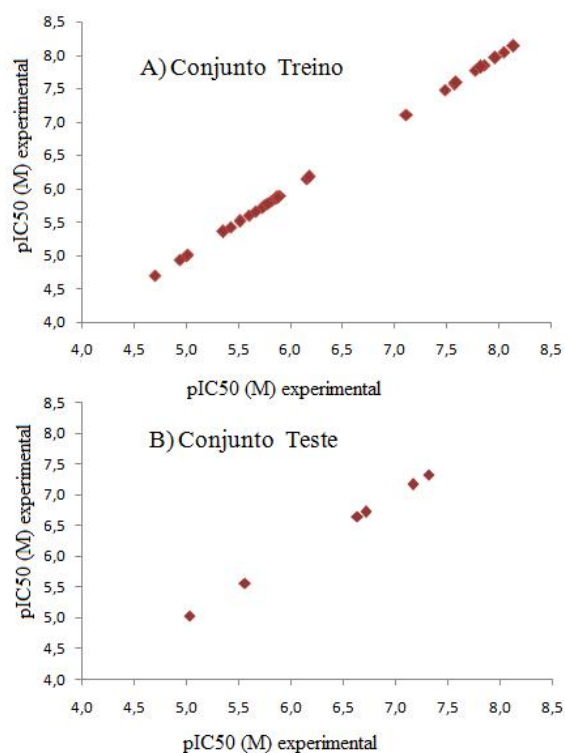


Figura 17. Distribuição dos valores de atividade biológica (pIC₅₀, M) dos compostos dos conjuntos de treinamento (A) e de teste (B) para BChE.

O HQSAR por ser um método de QSAR-2D não necessita da estrutura 3D dos compostos, geralmente, baseada em hipóteses de conformações bioativas, assim como a utilização de regras de alinhamento. Os derivados fenólicos estudados possuem

estrutura muito flexível, o que dificulta o emprego de regras de alinhamento tornando esta metodologia atraente para a geração de modelos que sejam capazes de predizer a atividade biológica permitindo a proposição de novos compostos mais ativos.

Durante a geração do modelo de HQSAR, alguns parâmetros afetam diretamente a qualidade do modelo, tais como comprimento do holograma, distinção e tamanho do fragmento. O Comprimento do holograma determina o padrão de ocupação específico dos fragmentos. O tamanho do fragmento é fixado por um valor mínimo e máximo de átomos e a distinção descreve as informações mantidas nos hologramas a partir da molécula original em termos de átomos, ligações, conectividade, hidrogênio e quiralidade (Figura 8). Este ultimo é parâmetro ajustável e de fundamental importância (JAMES & WEININGER, 1995).

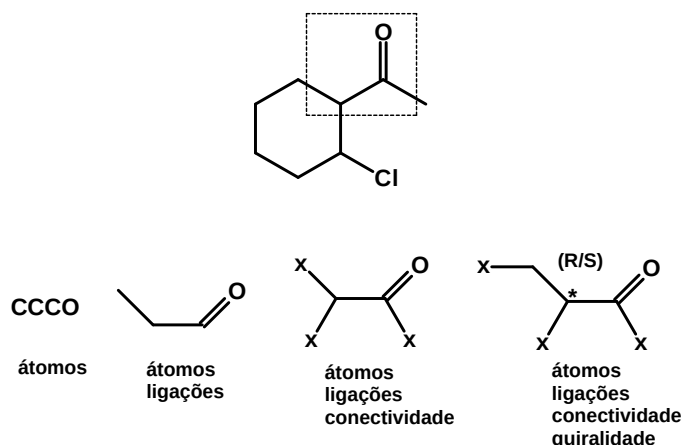


Figura 18. Esquema dos diferentes parâmetros de distinção do fragmento.

A distinção entre átomos permite que os fragmentos possam ser diferenciados com base nos tipos de *átomos*. Por exemplo, o fragmento NH_3 pode ser distinguido de PH_3 . As ligações podem ser distinguidas com base nas ordens de ligação. Por exemplo, a ausência de átomos de hidrogênio permite que o butano possa ser distinguido do 2-buteno. As conectividades fornecem uma medida dos estados de hibridização atômica, permitindo avaliar quantas conexões estão presentes entre os átomos dos fragmentos e a ordem de ligação destas conexões. Os átomos de hidrogênios são usualmente ignorados durante o processo de geração dos fragmentos, mas podem ser incluídos se necessário. A quiralidade permite que isômeros geométricos e enantiômeros R e S possam ser distinguidos (RODRIGUES, 1999).

As estruturas dos derivados fenólicos que compõem o conjunto de treinamento foram convertidas em fragmentos estruturais utilizando inicialmente número mínimo e máximo de 4 e 7 átomos por fragmentos, respectivamente. Todos os fragmentos gerados foram alocados em holograma molecular de tamanho definido (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401) e foi realizada análise de distinção dos fragmentos em termos de: átomos (A), ligações (B), conectividade (C), átomos de hidrogênio (H), quiralidade (Ch), e átomos doadores/aceptores (DA). Após a análise de PLS, vários modelos de QSAR foram gerados para cada distinção de fragmentos (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo dos índices estatísticos de HQSAR para diversas distinções de fragmentos (DF), utilizando o tamanho padrão do fragmento (4-7) para os inibidores da AChE e da BChE.

DF	Parâmetros estatísticos AChE ^a						Parâmetros estatísticos BChE ^a					
	q ²	r ²	EP	EPvc	NC	HL	q ²	r ²	EP	EPvc	NC	HL
A/B	0,660	0,833	0,328	0,468	6	59	0,706	0,780	0,545	0,630	2	61
A/C	0,642	0,833	0,328	0,480	6	307	0,696	0,777	0,549	0,640	2	199
A/H	0,635	0,785	0,364	0,475	5	53	0,704	0,754	0,566	0,621	1	97
A/DA	0,655	0,826	0,321	0,452	4	71	0,656	0,761	0,568	0,682	2	401
B/C	0,674	0,787	0,348	0,431	3	307	0,636	0,753	0,588	0,715	3	307
B/H	0,657	0,732	0,383	0,434	2	59	0,656	0,733	0,600	0,682	2	307
C/H	0,672	0,783	0,358	0,456	3	307	0,637	0,750	0,592	0,713	3	53
C/DA	0,638	0,811	0,335	0,463	4	97	0,676	0,792	0,530	0,661	2	59
A/B/C	0,643	0,830	0,324	0,469	5	401	0,690	0,777	0,548	0,647	2	199
A/C/H	0,624	0,782	0,367	0,482	5	257	0,694	0,744	0,578	0,631	1	61
A/B/C/H	0,619	0,781	0,368	0,485	5	257	0,693	0,743	0,578	0,632	1	61

a) q², coeficiente de correlação após validação cruzada; r², coeficiente de correlação ao quadrado; EPvc, erro padrão após validação cruzada; EP, erro padrão; NC, número de componentes ótimo; HL, tamanho do holograma. **DF** Parâmetros de distinção de fragmentos: átomos (A), ligações (B), conectividade (C), átomos de hidrogênio (H), e átomos doadores/ aceptores (DA).

A utilização de fragmentos com o número mínimo e máximo de 4 e 7 átomos, respectivamente, forneceu o melhor modelo quando se utilizam, ligações (B) e conectividade (C) como distinção de fragmentos para AChE (Tabela 3 q²=0,674 e EP=0,348) e átomos (A) e ligações (B) para BChE (Tabela 3 q²=0,706 e EP=0,545). Estes modelos foram escolhidos por apresentarem maior valor de q². Em seguida, foi investigada a influência do tamanho do fragmento (2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9, 7-10, 8-11, e 9-12), sobre os parâmetros de distinção desses modelos que apresentaram os melhores parâmetros estatísticos (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo dos índices estatísticos de HQSAR na influência dos vários tamanhos de fragmentos (TF) utilizando os parâmetros de distinção fragmento B/C e A/B para inibidores de AChE e BChE, respectivamente.

TF	Parâmetros estatísticos AChE ^a						Parâmetros estatísticos BChE ^a					
	q ²	r ²	EP	EP _{cv}	NC	HL	q ²	r ²	EP	EP _{cv}	NC	HL
2-5	0,598	0,764	0,390	0,509	6	353	0,703	0,768	0,560	0,633	2	53
3-6	0,605	0,758	0,379	0,484	4	307	0,705	0,775	0,557	0,631	2	53
4-7	0,674	0,787	0,348	0,431	3	307	0,706	0,780	0,545	0,630	2	61
5-8	0,695	0,810	0,329	0,417	3	61	0,862	0,957	0,272	0,489	8	401
6-9	0,698	0,815	0,324	0,415	3	97	0,880	0,959	0,268	0,456	8	61
7-10	0,693	0,813	0,326	0,418	3	59	0,894	0,966	0,244	0,430	8	199
8-11	0,782	0,940	0,202	0,383	7	307	0,893	0,961	0,250	0,412	6	151
9-12	0,787	0,965	0,156	0,388	8	151	0,904	0,952	0,265	0,373	4	151

a) q², coeficiente de correlação após validação cruzada; r², coeficiente de correlação ao quadrado; EP_{cv}, erro padrão após validação cruzada; EP, erro padrão; NC, número de componentes ótimo; HL, tamanho do holograma. b) Parâmetros de distinção de fragmentos: átomos (A), ligações (B), conectividade (C), átomos de hidrogênio (H), e átomos doadores/ aceptores (DA).

O melhor modelo de HQSAR para o estudo de inibidores da AChE foi gerado utilizando como parâmetro de distinção: ligações (B) e conectividade (C), e tamanho de fragmento 9-12, fornecendo q² = 0,787 e r² = 0,965 (Tabela 4). Para os inibidores da BChE, o melhor modelo de HQSAR foi desenvolvido utilizando átomos (A) e ligações (B), e tamanho de fragmento 9-12, fornecendo q² = 0,904 e r² = 0,952 (Tabela 4). É interessante notar que o melhor modelo de cada conjunto de dados (inibidores de AChE e BChE) foi gerado com os maiores tamanhos de fragmentos (isto é, 9-12 de AChE e BChE). Notavelmente, existe uma relação direta entre o comprimento da cadeia lateral e a atividade inibitória. O comprimento de oito unidades metilênicas parece ser o tamanho ótimo para a atividade (YU *et al.*, 2010). Portanto, a geração de modelos com maior tamanho de fragmento não foi inesperado.

Em HQSAR, a estrutura codificada dentro de uma impressão digital 2D pode ser diretamente relacionada com a variação da atividade biológica. O teste mais importante na avaliação de um modelo de QSAR é a capacidade preditiva do valor da atividade de compostos que não estavam no banco de treinamento. A validação externa dos modelos de HQSAR gerados foi baseada na capacidade de prever as atividades biológicas dos compostos do conjunto de teste.

Os valores de pIC₅₀ experimental, predito e residual (pIC₅₀Exp - pIC₅₀Pred) dos inibidores de AChE e BChE obtidos pelo melhor modelo de HQSAR para cada conjunto de dados estão demonstrados na Tabela 5. Os gráficos comparativos entre as

atividades experimentais e preditas tanto do conjunto de treinamento quanto do conjunto teste para os inibidores da AChE e BChE, utilizando os melhores modelos HQSAR, estão na Figura 19.

Tabela 5. Valores experimentais, preditos e residuais ($pIC_{50}Exp - pIC_{50}Pred$) de pIC_{50} (M) de inibidores de AChE e BChE utilizando os melhores modelos de HQSAR.

#	AChE pIC_{50}		Residual	BChE pIC_{50}		Residual
	Exp. ^a	Pred.		Exp. ^a	Pred.	
1*	4,86	4,8	0,06	4,99	4,99	0,00
2	4,94	4,94	0,00	4,69	4,69	0,00
3	5,47	5,41	0,06	5,85	5,62	0,23
4	5,17	5,18	-0,01	6,15	5,86	0,29
5	5,25	5,37	-0,12	5,01	5,02	-0,01
6*	4,97	5,05	-0,08	5,56	5,52	0,04
7	4,86	4,75	0,11	4,93	5,16	-0,23
8	4,99	5,06	-0,07	5,60	5,64	-0,04
9	6,3	6,02	0,28	5,81	5,76	0,05
10	5,35	5,53	-0,18	6,17	5,83	0,34
11*	5,60	5,33	0,27	5,03	5,35	-0,32
12	5,75	5,65	0,10	5,51	5,38	0,13
13	5,07	5,22	-0,15	5,35	5,70	-0,35
14	5,25	5,14	0,11	5,75	5,75	0,00
15	5,61	5,58	0,03	5,72	5,83	-0,11
16	6,36	6,5	-0,14	5,89	5,72	0,17
17	6,05	6,06	-0,01	5,86	5,82	0,04
18	5,74	5,62	0,12	5,42	5,66	-0,24
19	5,79	5,94	-0,15	5,66	5,66	0,00
20	6,02	5,86	0,16	5,78	5,58	0,20
21	5,67	5,93	-0,26	5,87	5,72	0,15
22*	6,17	6,14	0,03	6,64	5,98	0,66
23	7,07	7,14	-0,07	7,82	7,80	0,02
24	7,04	6,77	0,27	8,14	7,89	0,25
25	6,68	6,7	-0,02	7,96	7,76	0,20
26	7,11	7,02	0,09	7,85	7,77	0,08
27*	6,85	6,67	0,18	7,32	7,70	-0,38
28	6,77	6,79	-0,02	8,04	7,72	0,32
29	6,85	6,96	-0,11	7,77	7,90	-0,13
30*	6,52	6,80	-0,28	7,17	7,57	-0,40
31	6,22	6,29	-0,07	7,11	7,48	-0,37
32	6,27	6,32	-0,05	7,48	7,65	-0,17
33*	6,72	6,77	-0,05	6,72	7,38	-0,66
34	6,47	6,41	0,06	7,57	7,46	0,11
35	6,58	6,55	0,03	7,59	7,61	-0,02
36	4,86	4,8	0,06	7,82	7,79	0,03

a) Yu *et al.*, Bioorg Med Chem Lett 2010, 20:3254. * **Conjunto teste.**

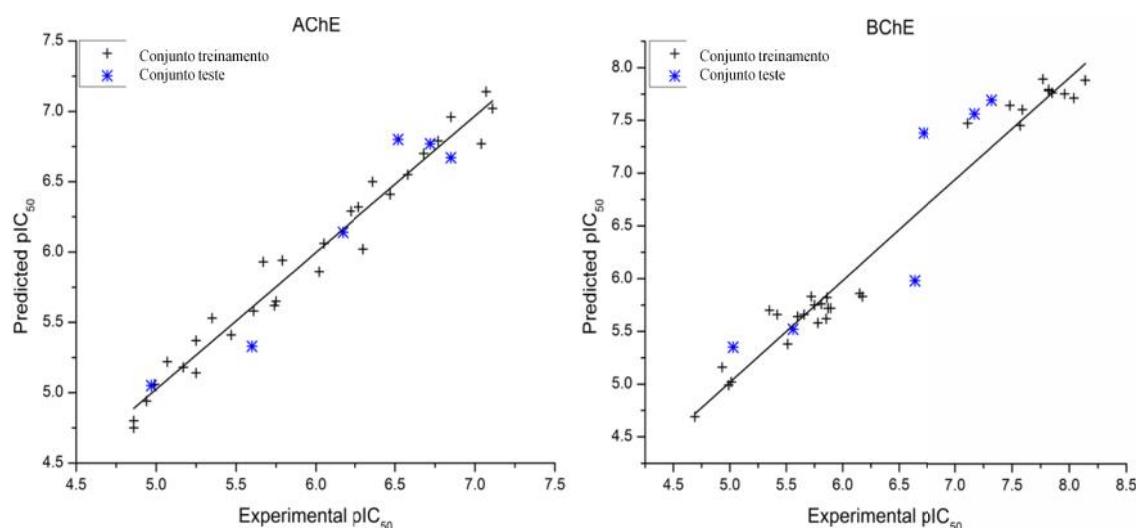


Figura 19. Gráfico do valores de pIC_{50} experimental *versus* predito dos conjuntos de treinamento e teste dos inibidores de AChE e BChE.

Neste trabalho, foram considerados como outliers todos os compostos dos conjuntos de treinamento e de teste, onde o valor residual excedia duas vezes o erro padrão de estimativa do modelo (do inglês, Standard Error of Estimate, SEE) (JAISWAL, KARTHIKEYAN & TRIVEDI, 2006) (AChE, $2 * EP = 0,30$; BChE, $2 * EP = 0,52$). De acordo com este critério, existem dois compostos identificados como outliers para o modelo da BChE, que apresentaram os mais elevados valores residuais. São eles o composto 33, (valor residual = -0,66), e composto 22 (valor residual = 0,66), porém nenhum deles apresentou valores de resíduo superiores a uma unidade logarítmica. Os compostos 33 e 22 pertencem ao conjunto de teste e não fizeram parte do processo de construção do modelo. O *outlier* 33 é análogo ao 26 (o mais ativo inibidor de AChE e o quarto mais ativo inibidor de BChE), e ambos possuem o mesmo grupamento (R) etilpiperazina, diferindo apenas no comprimento da cadeia lateral (Tabela 3). O modelo de HQSAR superestimou a atividade biológica de 33, provavelmente devido à relação direta entre o número de unidades espaçadoras de metileno na cadeia lateral e a potência inibidora da série, como discutido anteriormente. No entanto, para esta série em particular, existe um tamanho de cadeia lateral máxima de oito unidades de metileno, em vez de 10 unidades, como no composto 33. O *outlier* 22 é análogo ao composto 21, e ambos possuem o mesmo comprimento de cadeia lateral, mas diferem no número de unidades de metileno no seu grupamento (R). O modelo de HQSAR gerado subestimou a atividade biológica de 22, pois este derivado possui duas unidades de metileno a mais do que o composto 21, o que resulta numa estimativa de potência mais próxima do valor de 21 (Tabela 3).

Uma análise completa de um modelo de HQSAR envolve a identificação de fragmentos moleculares importantes que estejam diretamente relacionados com a variação da atividade biológica de modo que se possa propor modificações estruturais. Assim, os modelos de HQSAR podem ser representados graficamente como diagramas de códigos de cores onde cada cor, de cada átomo, reflete a sua contribuição para a variação da atividade. Nestes gráficos, as extremidades vermelha e verde do espectro refletem as contribuições positivas e negativas, respectivamente, enquanto que átomos com contribuição neutra são representados pela cor branca (TRIPOS, 2005). As contribuições atômicas individuais dos inibidores de maior (26 e 24) e de menor atividade (1 e 2) da AChE e da BChE, respectivamente, de acordo com os melhores modelos de HQSAR gerados, são mostrados na Figura 20.

Os mapas de contribuição atômica dos inibidores de AChE e BChE mostraram que o fragmento estrutural contendo sub-unidades aromáticas aumenta a potência inibitória dos derivados, reforçando a importância do sistema aromático em estabelecer interações π - π stacking com os resíduos aromáticos presentes em ambas as enzimas, corroborando com o descrito na literatura (CAMPS *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2010). Além disso, o mapa obtido a partir do estudo da BChE revelou, também, a importância do átomo de nitrogênio protonado da amina. Este grupamento é importante, uma vez que está envolvido em interações eletrostáticas com resíduos da enzima (YU *et al.*, 2010).

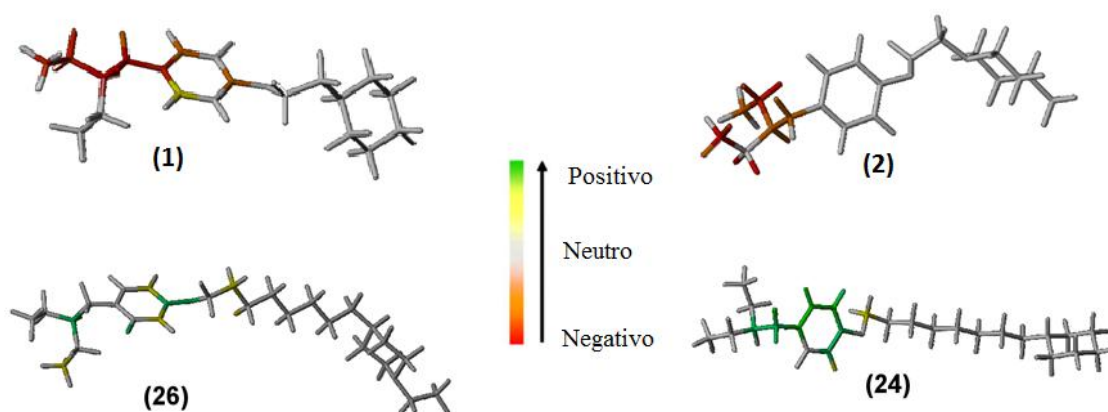


Figura 20. Mapas de contribuição atômica dos compostos 26 (mais ativo) e 1 (menos ativo) para a inibição da AChE, e 24 (mais ativo) e 2 (menos ativo) para a inibição da BChE

Os compostos desta série foram desenvolvidos para se comportarem como inibidores duais, ou seja, ligando-se simultaneamente no sítio catalítico aniônico (CAS) e o sítio aniônico periférico (PAS) (YU *et al.*, 2010). Para os inibidores da AChE, o comprimento da cadeia lateral foi outra característica em destaque no mapa de contribuição atômica, enfatizando a necessidade de um longo fragmento de cadeia lateral. De fato, a estrutura cristal de AChE de *Torpedo californica* mostra que o CAS está localizado no final de um profundo e estreito canal composto por 14 resíduos aromáticos, e o PAS está localizado na entrada deste canal a uma distância de ~ 20 Å (NASCIMENTO *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010). Além disso, a distância estimada entre CAS-PAS é ~ 14 Å (GUPTA *et al.*, 2011).

Surpreendentemente, uma comparação entre os mapas de contribuição dos compostos de maior (26) e menor atividade (1) para inibidores de AChE revelou que as contribuições positivas e negativas para a atividade biológica provêm do fragmento que é comum a ambos os compostos (Figura 21). O mesmo comportamento pode ser observado para os derivados de maior (24) e menor atividade (2) para inibição da BChE. Uma possível explicação para este achado é que os compostos com um grupo espaçador maior pode atingir tanto CAS e o PAS simultaneamente, aumentando a força de interação. Por outro lado, os compostos com espaçadores menores não podem alcançar ambos os sítios de ligação e, assim, podem se ligar fracamente a eles, e ser prontamente deslocado por moléculas de água (DE SOUZA *et al.*, 2012).

5.3 Modelo 3D da BChE obtido por modelagem comparativa

Um bom modelo por modelagem comparativa depende 1) do alinhamento adequado das estruturas primárias do molde e do problema; 2) da avaliação da qualidade do modelo; 3) da comparação das características da estrutura secundária dentro da estrutura 3D predita; e 4) da comparação entre as características funcionais e estruturais já descritas (SOUZA, 2011).

Na construção do modelo 3D de BChE de cavalo, a sequência primária foi obtida no banco de dados UniProtKB / Swiss-Prot sob o código de acesso Q9N1N9.

5.3.1 Identificação e seleção de proteínas moldes

O programa BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para comparar as estruturas primárias da sequência alvo com sequências de estruturas 3D disponíveis no PDB.

A estrutura selecionada como molde corresponde a estrutura 3D da BChE humana sob o código PDB 1P0M, resolvida por difração de raios-X, com resolução de 2,38 Å (NICOLET *et al.*, 2003), que apresenta 90% de identidade (475 aminoácidos idênticos em 529 aminoácidos alinhados).

5.3.2 Alinhamento das sequências de resíduos

Definido o molde, foi realizado o alinhamento das sequências das proteína molde e alvo, utilizando o servidor ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007). A Figura 21 mostra o alinhamento realizado entre as sequências da proteína de BChE de cavalo (código Q9N1N9) e humana (molde) (código PDB 1P0M).

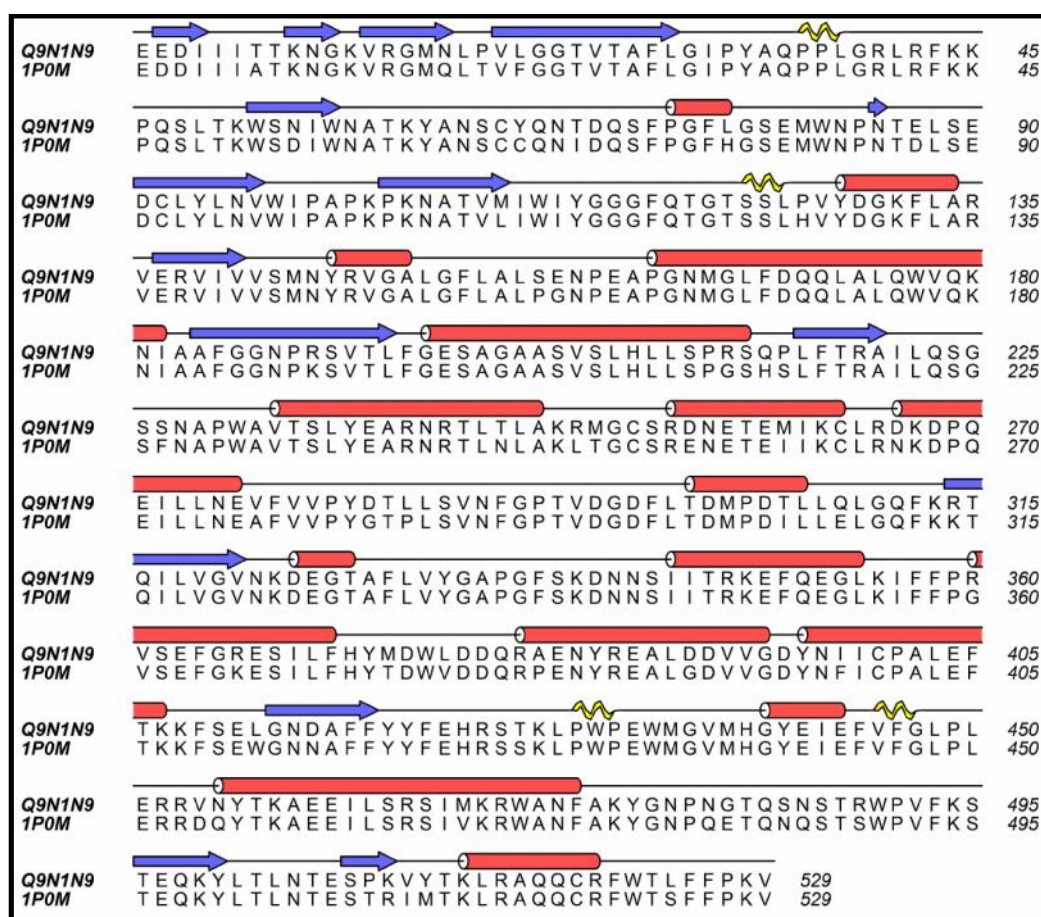


Figura 21. Alinhamento entre as seqüências primárias de BChE de cavalo (Q9N1N9) e humana (1P0M) obtido com o programa ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007). A estrutura secundária foi atribuída pelo programa DSSP (KABSCH & SANDER, 1983). Em azul: folha β ; em vermelho: α hélice; em amarelo: hélice 3-10.

5.3.3 Construção do modelo

A fim de escolher um modelo adequado de BChE, dois programas de modelagem comparativa foram utilizados.

Usando o servidor Swiss-Model, o primeiro modelo foi construído (modelo A) e submetido a otimização de geometria para remover contatos de alta energia, usando campo de força Gromos96, disponível no programa Swiss-PDB Viewer 4.0 (GUEX & PEITSCH, 1997).

Usando o programa Modeller9v10 (SALI & BLUNDELL, 1993), 50 modelos foram gerados e aqueles com menor valor de função objetiva foram selecionados para posterior validação, apenas um sendo selecionado (modelo B).

5.3.4 Validação do modelo

Os modelos gerados pelo Swiss-Model (Modelo A) e Modeller (Modelo B) foram avaliados quanto à qualidade estereoquímica e estrutural global. O primeiro critério de seleção para escolha do melhor modelo foi baseado na qualidade estereoquímica pela análise do gráfico de Ramachandran, usando o ProCheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

A análise do gráfico de Ramachandran (Figura 22) mostra que para nos dois modelos, mais do que 85% dos resíduos estão localizados nas regiões mais favoráveis e que menos de 1% não permitida. No entanto, o modelo B apresentou 90% de resíduos nas regiões favoráveis e não mostrou resíduos em regiões não permitidas.

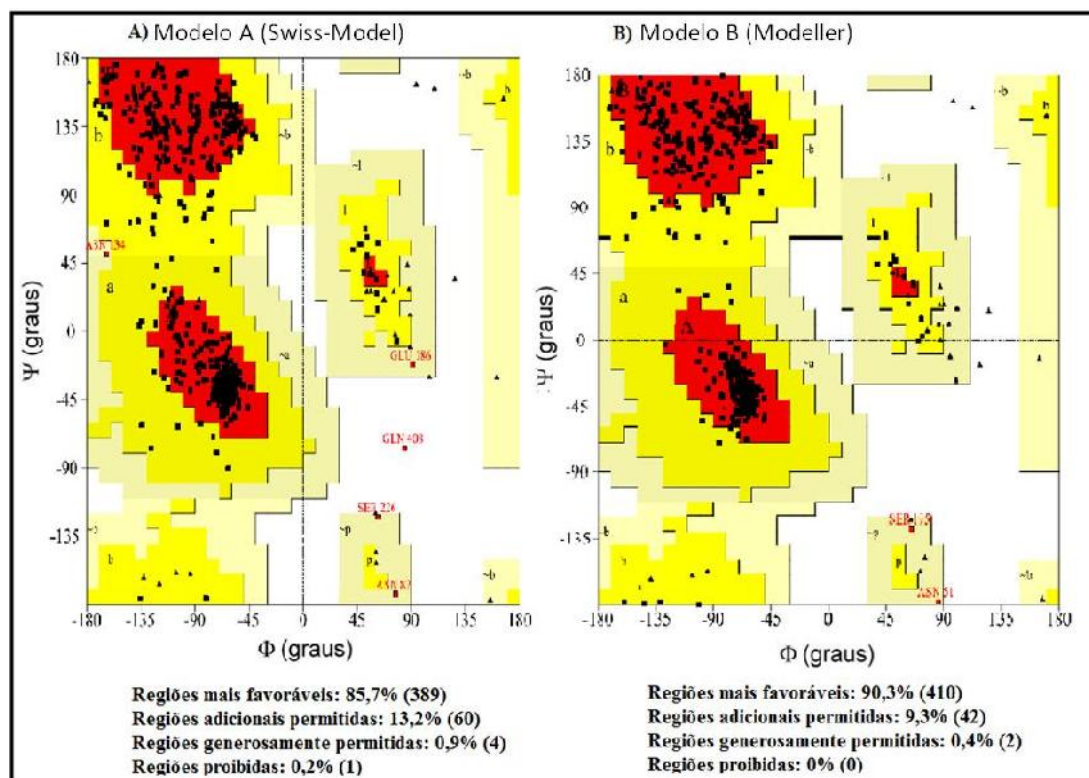


Figura 22. Gráficos de Ramachandran dos modelos A (Swiss-Model) e B (Modeller) fornecidos pelo programa ProCheck.

Os modelos foram submetidos ao programa Verify3D, que avalia a compatibilidade entre a estrutura 3D de uma proteína e a sua própria estrutura primária, estabelecendo um valor de pontuação (*score*) total relacionado à qualidade do modelo

(SOUZA, 2011). Os modelos A e B apresentaram uma relação de compatibilidade de aceitáveis 94 e 93% , respectivamente, entre os aminoácidos com a estrutura 3D.

Os modelos foram, ainda, submetidos ao programa ProSA que analisa a qualidade global e local do modelo, tendo como referência estruturas de proteínas de alta resolução, pela avaliação das coordenadas e das energias em função das distâncias entre os resíduos. A qualidade global é dada pelos valores de Z-score, o modelo A (SwissModel) apresentou Z-score de -10,63 e o modelo B (Modeller) apresentou Z-score de -10,7, ambos mais negativos do que o do próprio modelo (-9.69) (Figura 23). O gráfico de energia do programa ProSA fornece a qualidade local do modelo em função da posição do aminoácido na sequência protéica. Em geral, valores positivos correspondem a regiões do modelo que estão erradas ou com problemas. A avaliação dos gráficos obtidos para ambos os modelos mostra que a maioria dos resíduos está na região negativa, indicando qualidade local satisfatória (Figura 23).

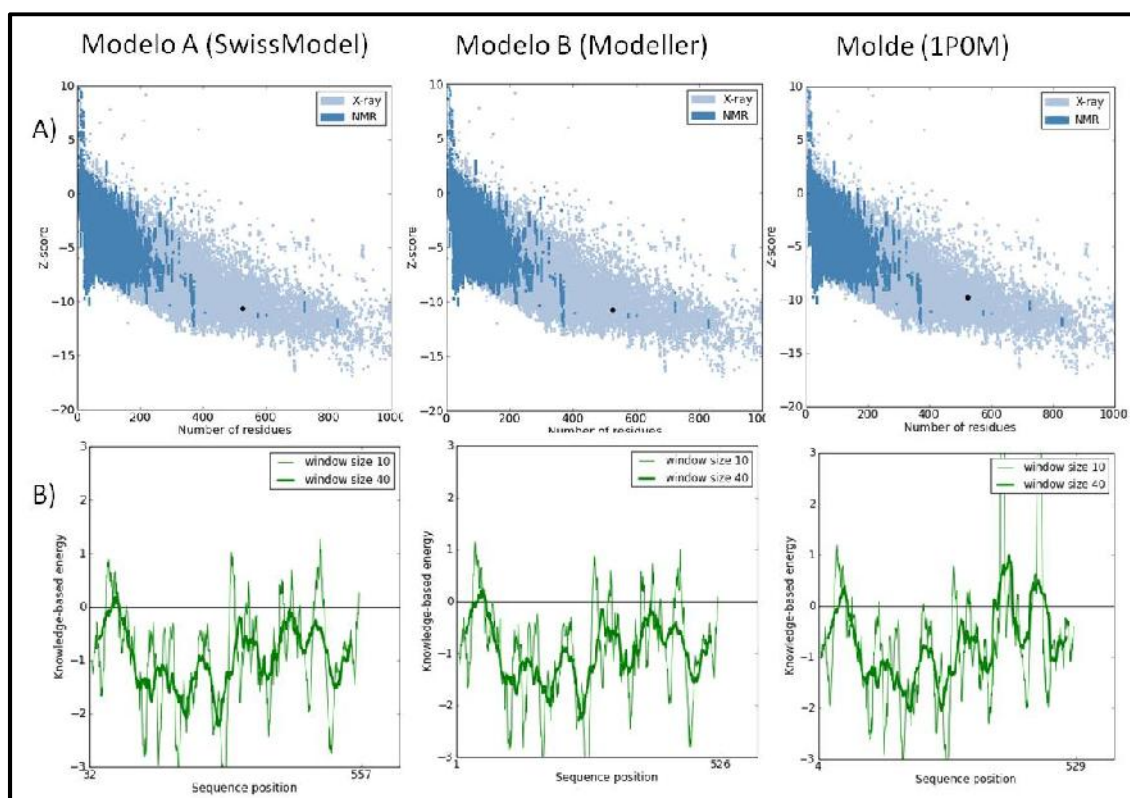


Figura 23. Gráficos de qualidade global (z-score) e local (score) dos modelos A e B de BChE. Em **A)** Gráfico de Z-score dos modelos avaliados. Modelo A (SwissModel) (Z-score = -10,63); Modelo B (Modeller) (Z-score = -10,70), molde (1P0M) (Z-score= -9,69). Em **B)** Gráfico scores de resíduos dos modelos gerados.

Nos dois modelos (A e B) foram identificadas a mesma disposição da tríade catalítica e, ainda, a disposição das ligações dissulfeto conservadas na família (Cys62 e

Cys89, Cys249 e Cys260, Cys397 e Cys516 - Modeller). Considerando os resultados de validação, o modelo B (Modeller) foi selecionado para estudos de *docking* molecular (Figura 24).

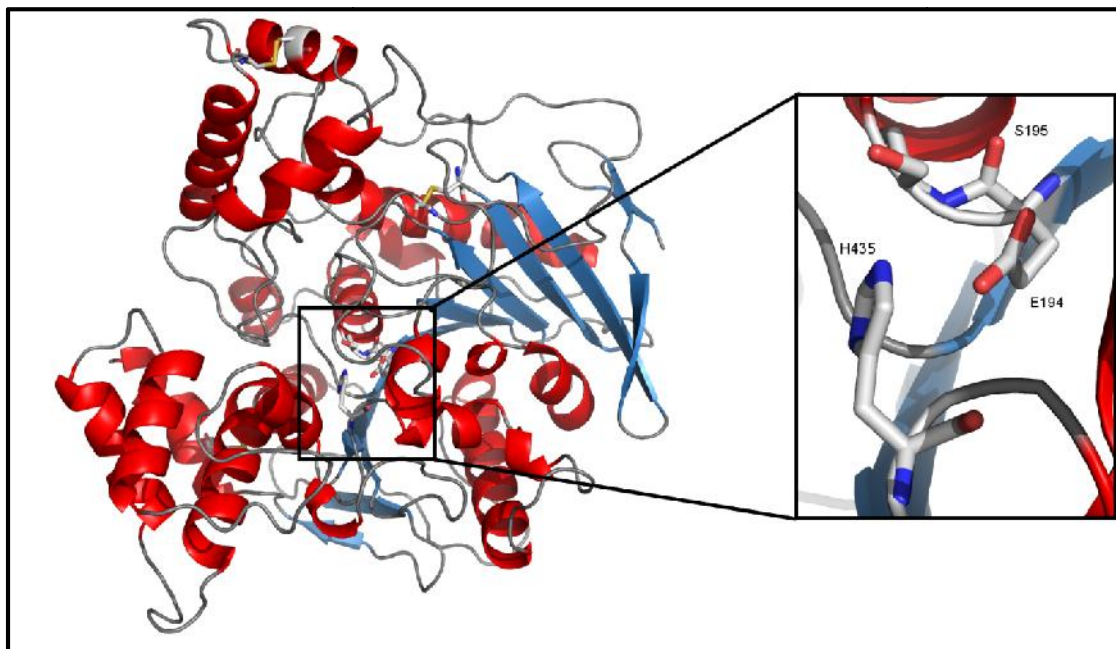


Figura 24. Representação do modelo da BChE cavalo construído pelo programa Modeller (modelo B). Pontes de dissulfeto em amarelo. Resíduos do sítio ativo (Glu194, Ser195 e His435) são mostrados em destaque.

5.4 *Docking* molecular

5.4.1 Validação dos Protocolos de *Docking* por Re-docking

Antes da realização do *docking* dos compostos fenólicos em seus respectivos alvos, o protocolo foi validado. Nessa validação o próprio ligante da estrutura cristalina de um complexo ligante-proteína é submetido ao processo de *docking* molecular para tentar reproduzir o modo de ligação original. A enzima foi considerada como um corpo rígido e as moléculas de água originais foram excluídas.

Foram utilizados dois programas para o estudo de *docking* molecular entre o ligante e a estrutura 3D das duas enzimas. Cada programa possui seu próprio método de cálculo de pontuação, assim como seu próprio algoritmo de busca. A seleção da melhor solução (conformação e orientação), ou pose, é frequentemente complicada, pois os resultados são particularmente sensíveis à função de pontuação usada em cada programa de *docking* (ARAÚJO, 2010).

Em geral, a confiabilidade dos resultados de *docking* depende da similaridade entre o modo de ligação experimental e a solução de menor energia. Um valor de $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ é amplamente aceito como a distinção entre o sucesso e o fracasso em reproduzir um modo de ligação conhecido (YUSUF *et al.*, 2008). Neste trabalho, foi aceito como metodologia validada, todo resultado que apresentou valor de $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$.

5.4.1.1 Acetilcolinesterase

Para validação dos protocolos empregados nos dois programas (Autodock e Molegro Virtual Docker) foi utilizada a estrutura cristalográfica da AChE de *Torpedo californica* (código PDB = 1ACL) que apresenta como ligante o íon decametônio (DME).

5.4.1.1.1 AutoDock

O *re-docking* do DME no sítio ativo da enzima foi realizado conforme protocolo mencionado anteriormente. Nas simulações de *docking* pelo AutoDock, a seleção da melhor solução de *docking*, ou pose, foi feita por critério de menor energia juntamente com o maior *cluster* possível (HEALY *et al.*, 2009).

A comparação por sobreposição estrutural com o complexo cristalográfico original revelou um modo de ligação similar à conformação original com um valor do RMSD de $1,26 \text{ \AA}$ (Figura 25). O resultado mostrou que o valor de RMSD, dentro da faixa aceita como sucesso de cálculo (RMSD abaixo de $2,0 \text{ \AA}$), é correlacionado com o número de 11 ligações rotacionáveis que o DME apresenta, validando positivamente a metodologia de *docking*.

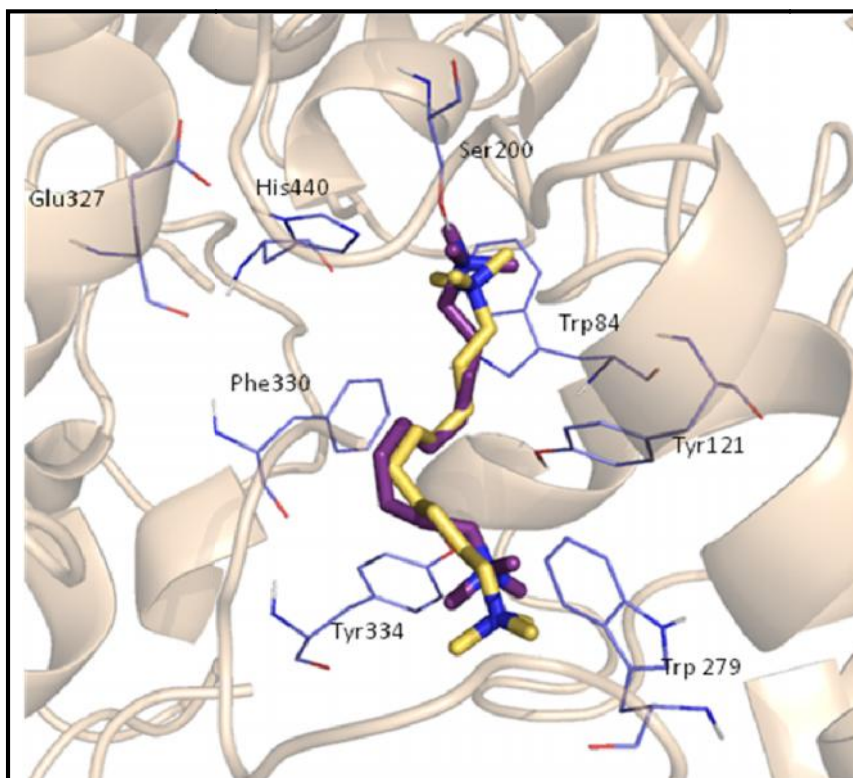


Figura 25. Sobreposição do DME original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de *docking* (roxo) com RMSD= 1,26Å. Principais resíduos de aminoácidos do sítio catalítico em destaque.

5.4.1.1.2 Molegro

Para o *Re-docking* do DME, pelo protocolo do programa MVD, foi utilizada a mesma estrutura de difração por raios-X sob o código PDB 1ACL empregada no estudo com o AutoDock.

A estrutura de cada complexo foi classificada usando as funções de pontuação do MVD (MolDock e *Re-Rank*). Nas simulações de *docking* pelo MVD, a melhor pose foi selecionada baseada na pontuação *Re-Rank* e menor valor de RMSD.

A comparação por sobreposição estrutural com o complexo cristalográfico original revelou uma conformação similar à conformação original com um valor da raiz de média quadrática (*root mean square*, RMS) de 1,51 Å (Figura 26), que também é correlacionado com o número de ligações rotacionáveis do DME. Sendo assim, o resultado validou a metodologia de *docking* empregada.

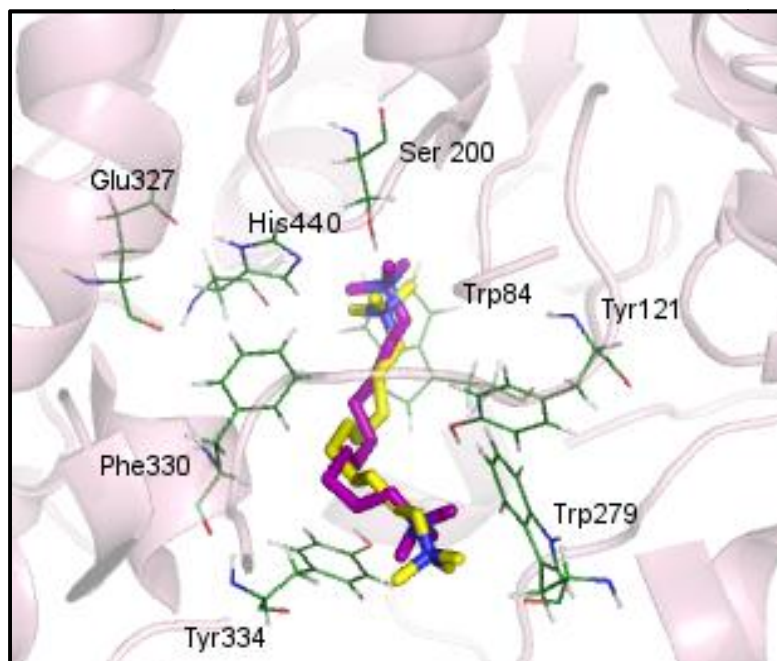


Figura 26. Sobreposição do DME original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de *docking* (roxo) com RMSD= 1,51Å. Principais resíduos de aminoácidos do sitio catalítico em destaque.

5.4.1.2 Butirilcolinesterase

Para validação dos protocolos empregados nos dois programas utilizados (Autodock e Molegro Virtual Docker) foi utilizada a estrutura cristalográfica da butirilcolinesterase (código PDB = 1P0I) que apresenta como ligante o ácido butanóico (BUT).

5.4.1.2.1. Autodock

A comparação por sobreposição estrutural com o complexo cristalográfico original revelou uma conformação similar à conformação original com um valor de RMSD de 0,96 Å (Figura 27). Este resultado também mostrou que o valor de RMSD se enquadra dentro da faixa de sucesso de cálculo ($\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ Å}$). Deve-se contanto notar, que o ligante utilizado na validação de protocolo dessa metodologia é o BUT, que possui uma cadeia lateral menor que os derivados fenólicos estudados. O mesmo foi empregado devido à indisponibilidades de outro complexo de estrutura cristalográfica resolvida. Para fins de validação, o resultado de *Re-docking* com o BUT foi satisfatório.

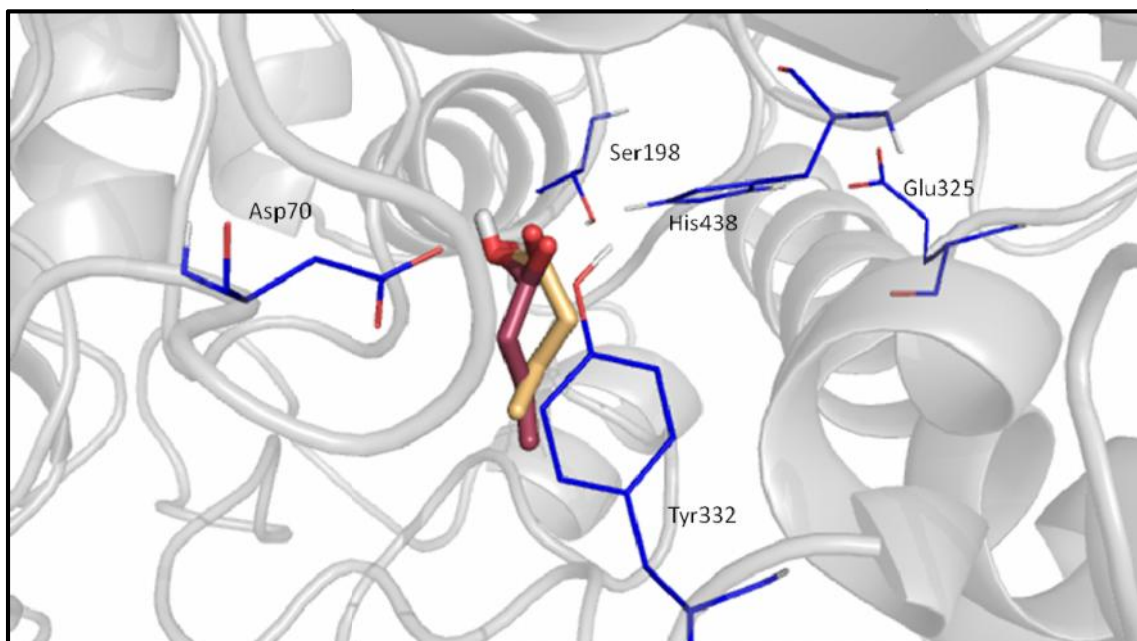


Figura 27. Sobreposição do BUT original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de *docking* (roxo) com RMSD= 0,96 Å. Principais resíduos de aminoácidos do sitio catalítico em destaque.

5.4.1.2.2 Molegro

Assim como no estudo com a acetilcolinesterase, nas simulações de *docking* pelo MVD, a melhor pose foi selecionada baseada na pontuação Re-Rank e menor valor de RMSD.

A comparação por sobreposição estrutural com o complexo cristalográfico original revelou uma conformação similar à conformação original com um valor de RMSD de 1,47 Å (Figura 28). O resultado validou a metodologia de *docking* empregada.

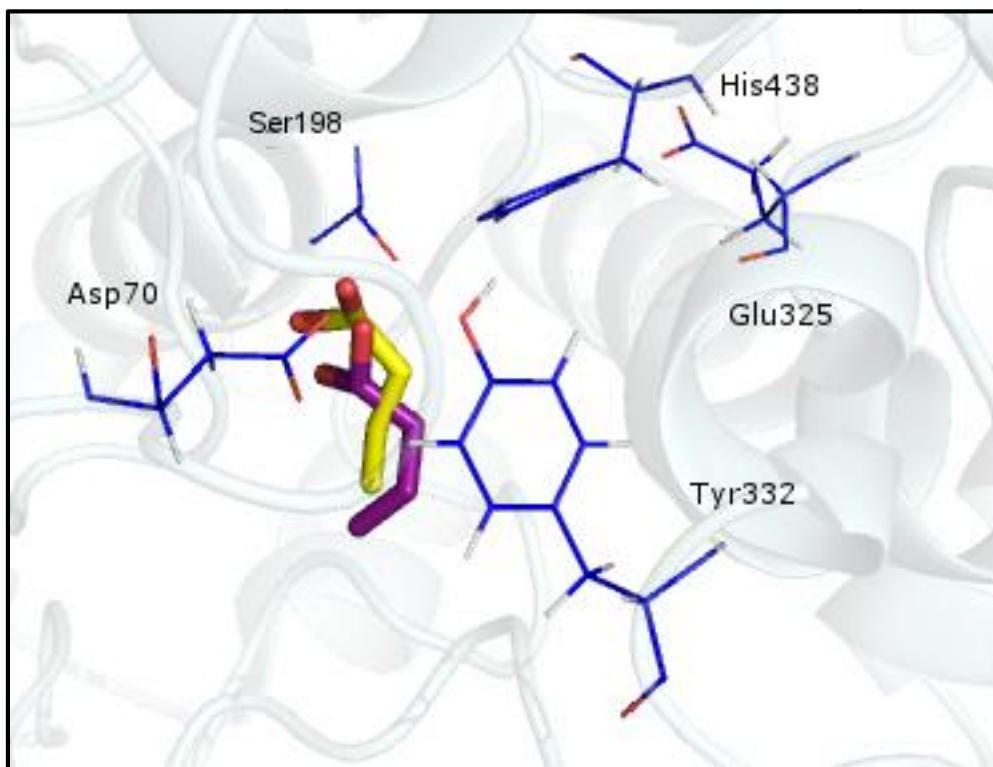


Figura 28. Sobreposição do BUT original obtida do cristal (amarelo) e da melhor pose de *docking* (vermelho) com RMSD= 1,47 Å. Principais resíduos de aminoácidos do sítio catalítico em destaque.

5.4.2 Docking molecular dos derivados fenólicos

É importante enfatizar que para permitir a comparação em ambos os protocolos de *docking* as simulações foram realizadas considerando a estrutura das enzimas (AChE e BChE) como um corpo rígido, excluindo as moléculas de água originais, pois já foi relatado por Araújo (2010) que simulações de *docking* na presença de moléculas de água, mostraram que o solvente não influencia a classificação relativa desses complexos nas funções de pontuação.

A observação dos resultados de validação dos protocolos empregados para os diferentes programas mostrou que todos eles foram validados e apresentaram um valor de RMSD menor que 2,0Å. Foi observado, entretanto, que os resultados de AutoDock apresentam valores de RMSD menores quando comparado com os do MVD (AChE: RMSD AutoDock = 1,26Å e RMSD MVD = 1,51Å; BChE: RMSD AutoDock = 0,96Å e RMSD MVD = 1,47Å). Porém, como a diferença entre estes valores é pequena, o estudo de *docking* molecular dos derivados fenólicos foram conduzidos com os dois programas (AutoDock e Molegro) em suas metodologias validadas.

5.4.2.1 Acetilcolinesterase

Os derivados 4-[(dietilamino)-metil]-fenóxi foram desenvolvidos com o intuito de exercerem atividade de inibição através de interação tanto no sítio ativo quanto no sítio aniônico periférico (PAS). Essa proposta de inibição dual seria baseada na introdução do grupo amina no final da cadeia lateral, com o objetivo de promover uma interação eletrostática com resíduos do PAS (YU *et al.*, 2010).

Neste estudo foram avaliadas as interações entre os complexos ligante- proteína de dois derivados com alta atividade inibitória (**26** e **24**) e dois derivados com baixo perfil inibitório (**1** e **6**) contra a AChE.

5.4.2.1.1. Docking molecular entre os derivados 26, 24, 1, 6 e AChE

Os resultados obtidos para os *dockings* dos derivados **26**, **24**, **1**, **6** na AChE indicaram que todos os compostos ficaram localizados na cavidade catalítica, como esperado. Este comportamento foi observado empregando tanto no Autodock quanto no MVD.

Nas simulações de *docking* molecular do derivado **26** realizadas pelo programa AutoDock, as 50 poses obtidas foram agrupadas em *clusters* que possuíam energia estimada variando de -10,5 a -8,0 kcal/mol. O derivado **26** possui uma estrutura altamente flexível (Figura 29A), e por isso, já era esperado a geração de diversos *clusters*. As poses que se encontravam no *cluster* de maior população e de menor energia apresentavam uma conformação não estendida, provavelmente devido a uma interação intramolecular (Figura 29B).

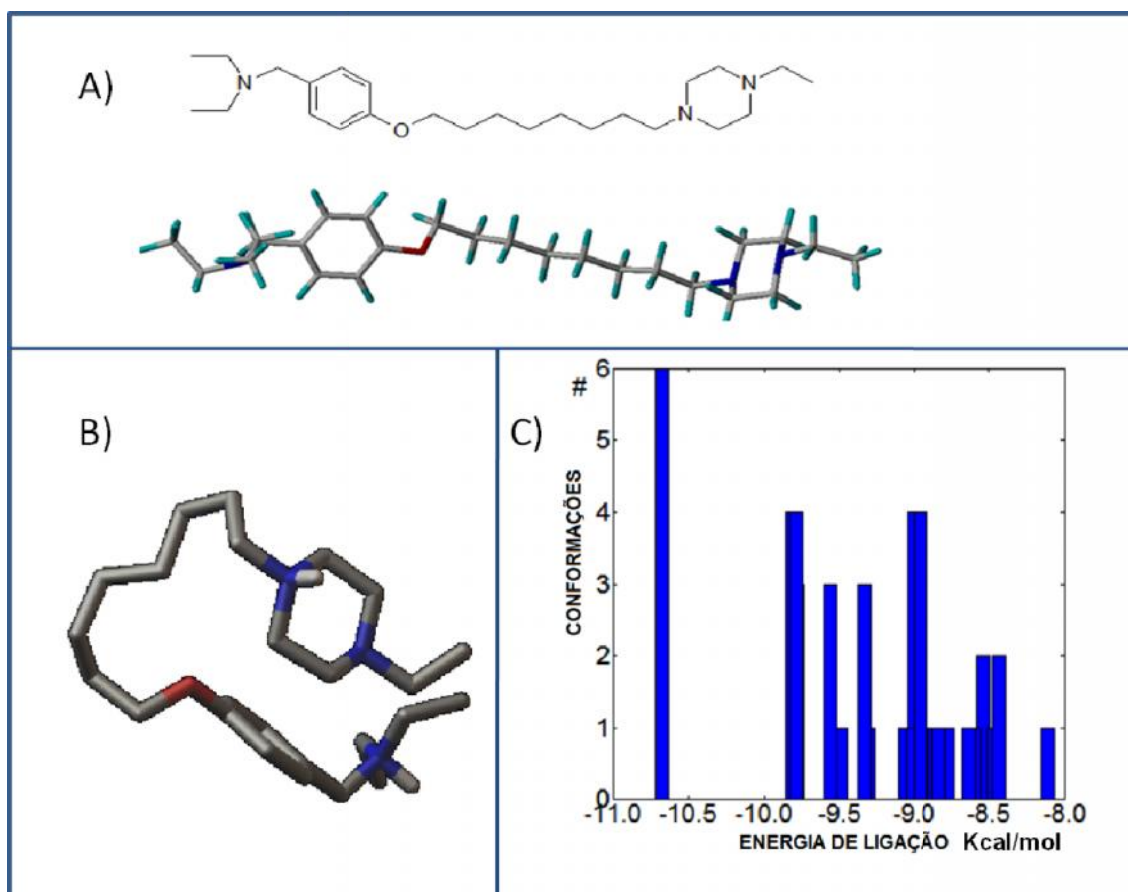


Figura 29. A) Representação da estrutura 2D e 3D do derivado **26**; B) Representação da pose de menor energia encontrada no *cluster* de maior população; C) *Clusters* obtidos no *docking* do derivado 26 e estrutura cristal 1ACL.

Uma análise de outras poses em outros *clusters* fez-se necessário. Nesta busca, foi levado em consideração o conjunto que apresentasse a menor energia subsequente, até que se achasse um grupo com estrutura estendida de acordo com a estrutura cristal do complexo AChE-DME (YU *et al.*, 2010). Assim sendo, a melhor pose foi encontrada no quarto *cluster* de menor energia (-9,5 kcal/mol). É importante notar que, a diferença de energia entre os grupos é pequena. Tal seleção foi comparada com a estrutura do DME original do cristal (Figura 30). A sobreposição mostrou um bom resultado na seleção da melhor pose.

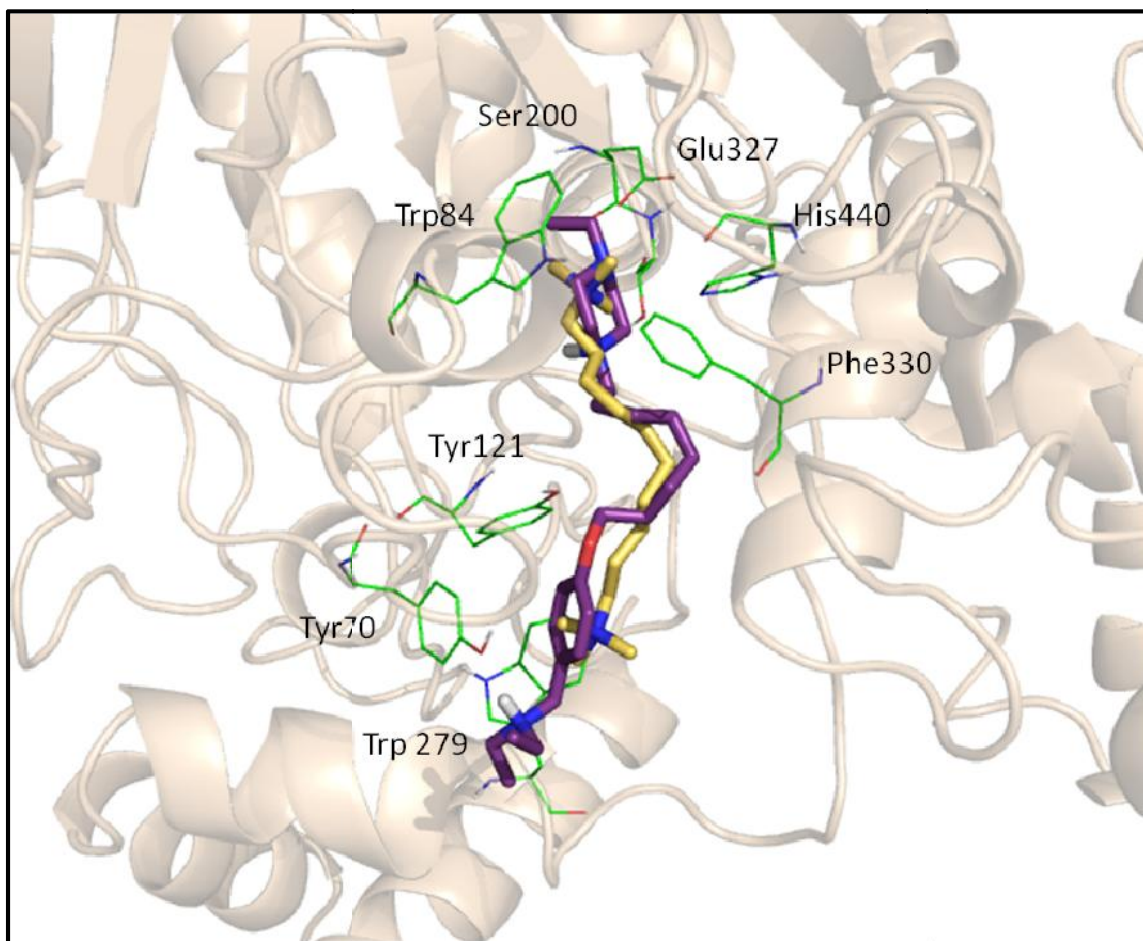


Figura 30. Sobreposição das conformações de DME do cristal (amarelo) e derivado **26** (roxo) no sítio ativo de AChE. Principais resíduos do sítio ativo em destaque. Os átomos de nitrogênio e de oxigênio estão representados pelas cores azul e vermelho, respectivamente.

Nas simulações de *docking* pelo programa Molegro, as 15 poses obtidas foram analisadas pelo valor de pontuação MolDockScore. Entretanto, semelhante ao resultado do programa AutoDock, a pose de menor energia também se apresentou na conformação não estendida (Figura 31A). Deste modo, foi avaliado a primeira pose com menor valor de pontuação *Re-rank score*, onde se obteve melhor resultado com a molécula na conformação estendida (Figura 31B).

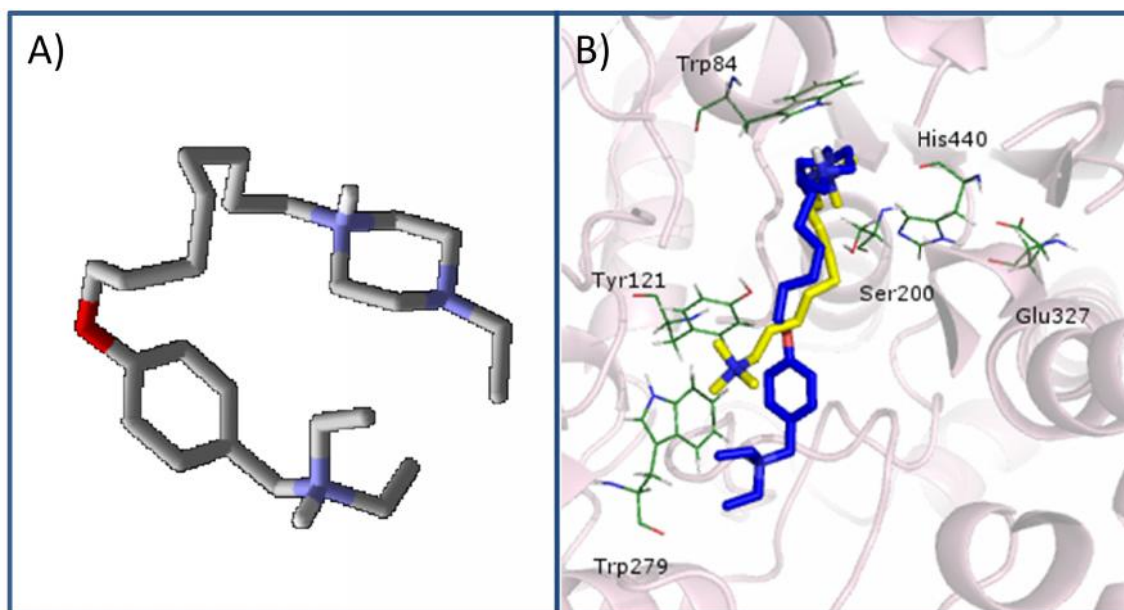


Figura 31. A) Representação da estrutura 3D do derivado 26 na pose de menor valor de MolDock score (MVD); B) Representação da pose de menor valor de *Rerank-score* (azul) sobreposta ao DME do cristal original.

Os resultados de *docking* molecular no sítio ativo da AChE indicaram um modo de ligação preferencial dos derivados de maior atividade inibitória que ocupa tanto a cavidade catalítica quanto o sítio aniônico periférico (PAS, do inglês *peripheral anionic site*).

O *docking* molecular realizado pelo programa AutoDock mostrou que o derivado **26** estabelece uma interação do tipo cátion- π entre o resíduo Trp84 com o segundo átomo de nitrogênio protonado deste composto (distância 4,4 Å), o mesmo foi visto pela melhor pose gerada pelo programa MVD (distância 3,6 Å). Também, foi observado pelos dois programas uma proximidade entre o átomo de oxigênio do derivado **26** e o resíduo Tyr121 com distância de 4,2 Å para AutoDock e 3,1 Å para o MVD e uma interação do tipo empilhamento π entre o anel aromático do composto **26** e o resíduo Trp279 com uma distância de 3,6 Å para a melhor pose gerada pelo AutoDock e 3,2 Å para o MVD. Além disso, uma interação hidrofóbica com os resíduos Phe330 e Tyr334 é observada em ambas as poses geradas o que provavelmente é o fator que favorece a não linearidade da estrutura (Figura 32).

A diferença encontrada entre as melhores poses geradas pelos programas utilizados foi quanto ao átomo de nitrogênio protonado próximo ao anel aromático do composto **26**. A melhor pose do AutoDock estabelece uma ligação hidrogênio com a hidroxila do resíduo Tyr70 com distância de 3,1 Å e a pose gerada pelo MVD

estabeleceu uma interação do tipo cátion - π com o resíduo Trp279 com distância de 3,2Å (Figura 32).

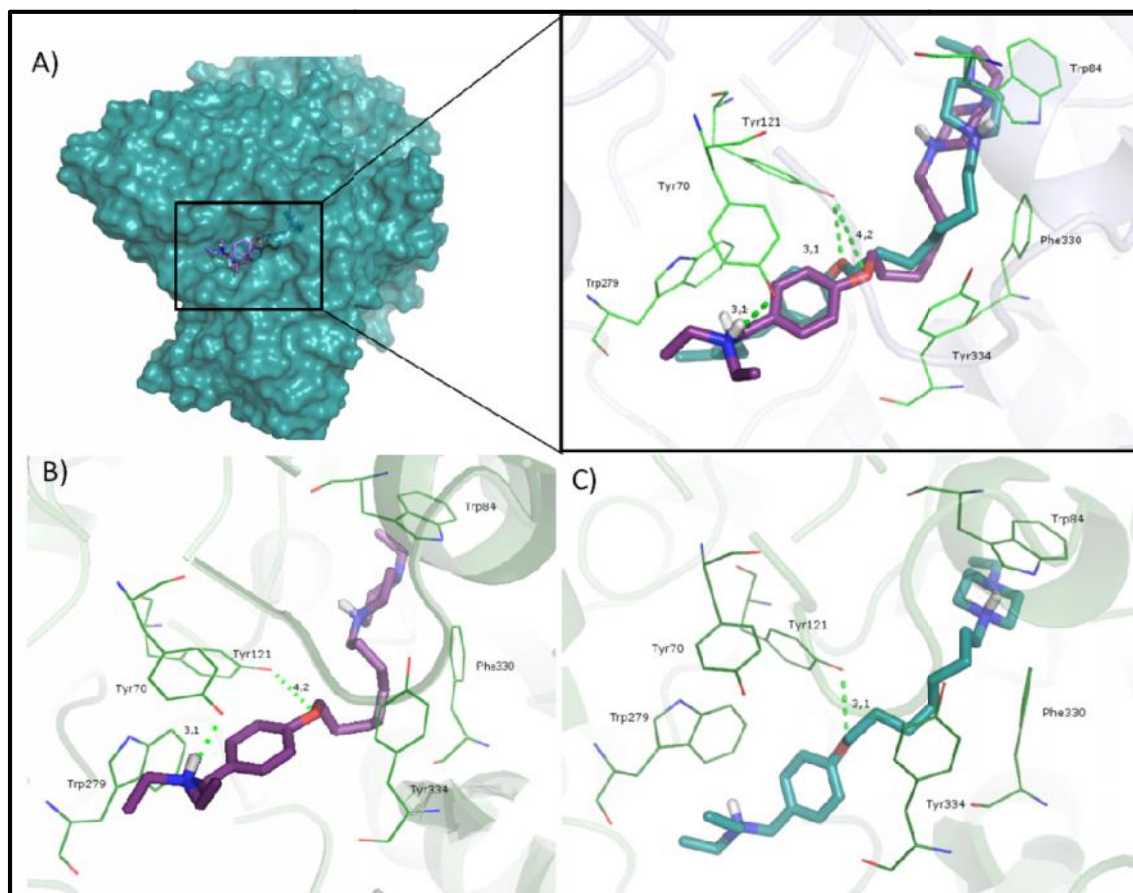


Figura 32. Resultado de *docking* molecular do derivado **26** empregando o programa Pymol. A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (roxo) e MVD (azul); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

No intuito de confirmar os dados obtidos com o estudo das interações entre o complexo formado entre o derivado **26** (maior perfil inibitório) e AChE, uma avaliação de *docking* molecular com o derivado **24** foi realizado.

O estudo de *docking* realizado pelo programa AutoDock revelou que a melhor pose do derivado **24** estabelece interação do tipo cátion- π entre o resíduo Trp84 e o segundo átomo de nitrogênio protonado deste composto (distância 4,3 Å), estando em concordância com a melhor pose encontrada pelo MVD (distância 4,6 Å). Foi observado ainda pela melhor pose gerada pelo AutoDock uma proximidade com hidrogênio com o resíduo Tyr121 (distância 4,1 Å) em concordância com a pose do MVD (distância 3,4 Å). Da mesma maneira que encontrado no estudo de *docking* entre o derivado **26** e AChE foi observado uma interação hidrofóbica com a Phe330 e com a Tyr334 para as melhores poses encontradas pelos dois programas (Figura 33).

A diferença encontrada entre as melhores poses geradas pelos programas utilizados foi quanto ao átomo de nitrogênio protonado próximo ao anel aromático do composto **24**. A melhor pose do MVD estabelece uma ligação de hidrogênio com a hidroxila do resíduo Tyr70 numa distância de 3,1 Å e a pose gerada pelo AutoDock não estabeleceu qualquer interação.

A comparação entre as poses obtidas pelos dois programas revelou que a conformação obtida pelo MVD se assemelha aos resultados obtidos com o derivado **26** (Figura 33).

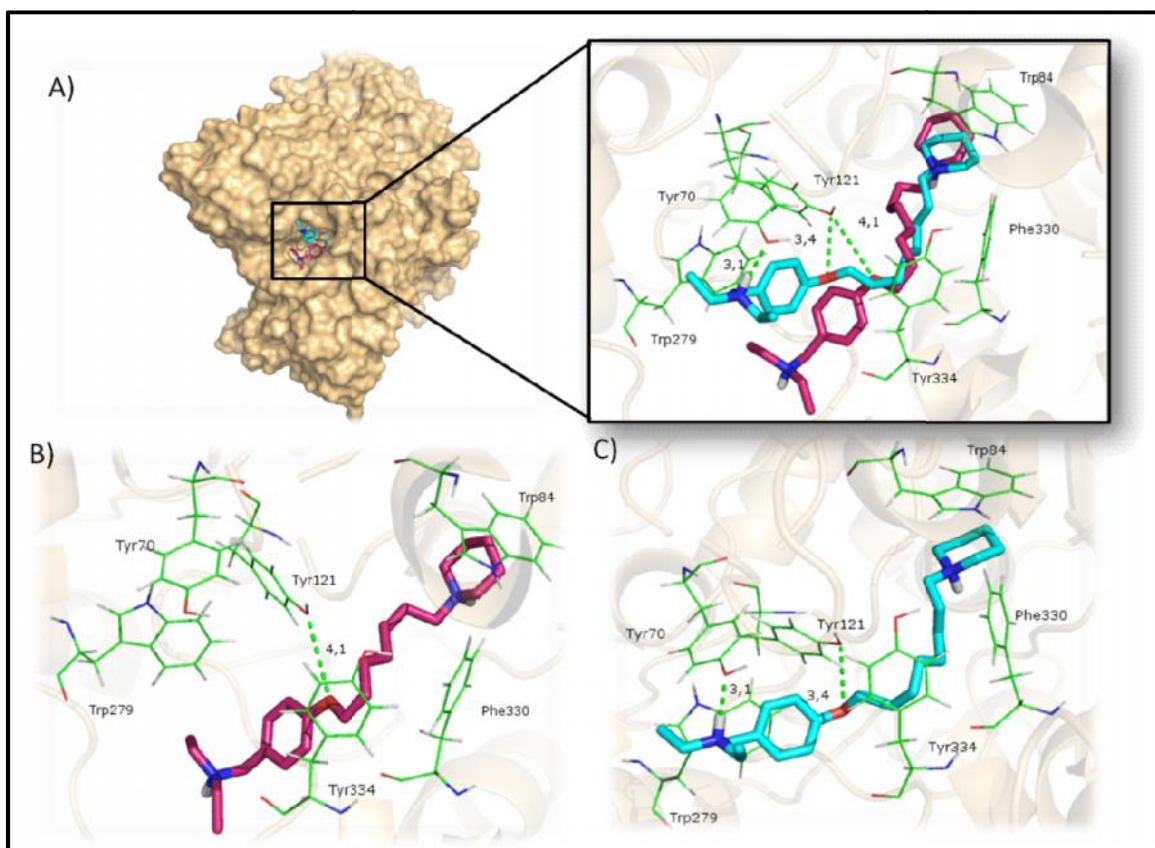


Figura 33. Resultado de *docking* molecular do derivado **24** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (rosa) e MVD (azul); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

Os resultados obtidos pelos dois programas são concordantes no que diz respeito a descrição dos principais resíduos envolvidos na interação com o ligante e com conseqüente inibição da enzima. São eles Trp84, Tyr70, Tyr121, Trp279, Phe330 e Tyr334.

Uma busca na literatura foi realizada, afim de saber quais os resíduos são mais importantes para a interação com a enzima e qual o papel de cada um nos principais modos de interação com a AChE.

O resíduo Trp84 está localizado na cavidade catalítica, próximo à tríade (Ser200-His440-Glu327) e é considerado como principal resíduo localizado no final da "garganta aromática" (HAREL *et al.*, 1993). O Trp84 vem sendo utilizado em muitos outros estudos de *docking* molecular como importante marcador de sucesso para inibição.

O Trp84 realiza uma interação cátion- π entre a amina quaternária da acetilcolina e o grupo indol deste resíduo (BEMBENEK *et al.*, 2008). No complexo AChE-DME, a estrutura cristal de código PDB 1ACL, revela que a amina quaternária do DME realiza, assim como o substrato natural, uma interação cátion- π com o grupo indol do Trp84 (HAREL *et al.*, 1993). Uma avaliação dos possíveis modos de ligação entre a estrutura cristal de AChE e o fármaco donepezil, que possui uma sub-unidade N-benzilpiperidina e uma indanona, revelou que o grupo benzila interage com Trp84 (SAXENA *et al.*, 2003).

Os resíduos Tyr70, Tyr121, Phe330 e Tyr334 estão localizados entre o sítio catalítico e o PAS e desempenham um papel importante na interação com o fármaco donepezil. O resíduo Tyr70 foi descrito na literatura como importante na interação com a piperidina do donepezil (SAXENA *et al.*, 2003). É relatado ainda, na estrutura 3D do complexo AChE-Donepezil, que os resíduos Phe330 e Tyr334 são considerados um sítio adicional de ligação, com significância funcional, no interior da sítio ativo (DA SILVA *et al.*, 2006). Um estudo que avaliou os modos de interação com a tacrina destacou, a importância da Phe330, sendo responsável pela estabilização da molécula da tacrina no sítio, o que possibilitou que o inibidor pudesse realizar a interação com o Trp84 (DA SILVA *et al.*, 2006).

O Trp279 é um resíduo que está localizado no PAS, e é o mais importante resíduo desta cavidade periférica (HAREL *et al.*, 1993). Estudos anteriores descrevem que ligação do donepezil com AChE é extremamente dependente das interações com Trp279 e Phe330, que não estão presentes na BChE o que pode explicar a alta especificidade do donepezil para AChE e não para BChE (DA SILVA *et al.*, 2006).

A avaliação dos modos de interação entre compostos que possuem pouca ou nenhuma atividade e seu alvo é também importante ferramenta no desenvolvimento de novos fármacos. Tais complexos podem indicar possíveis falhas na estrutura dos novos candidatos e orientar possíveis modificações estruturais. Por este motivo foram analisados os complexos formados entre os derivados **1** e **2** e a AChE.

A análise do complexo de AChE com o derivado **1** empregando o programa AutoDock, mostrou uma interação cátion- π com o resíduo Trp84 (distância 4,0 Å), o que foi também observado para a melhor pose encontrada pelo MVD (distância 4,5 Å). Para as melhores poses de ambos os programas empregados também foi encontrada uma proximidade com o resíduo Tyr121, a uma mesma distância 4,6 Å. Porém, quando comparado com a média da distância desta mesma interação encontrada nos derivados **24** e **26** (4,0 Å), observa-se uma distância maior. Como este derivado possui uma cadeia lateral menor que os compostos de maior potência inibitória, não é observado proximidade com o resíduo Trp279 do PAS, e por este motivo o derivado **1** se aproxima dos resíduos Phe330 e Tyr334. Esta proximidade pode estar sendo estabilizada devido a formação de uma interação do tipo π - π *stacking* com a própria Tyr334 a uma distância de 3,8 Å para a pose gerada pelo Autodock e 3,9 Å para a melhor pose do MVD. Uma interação hidrofóbica com o resíduo Phe330 foi observada para ambos resultados (Figura 34).

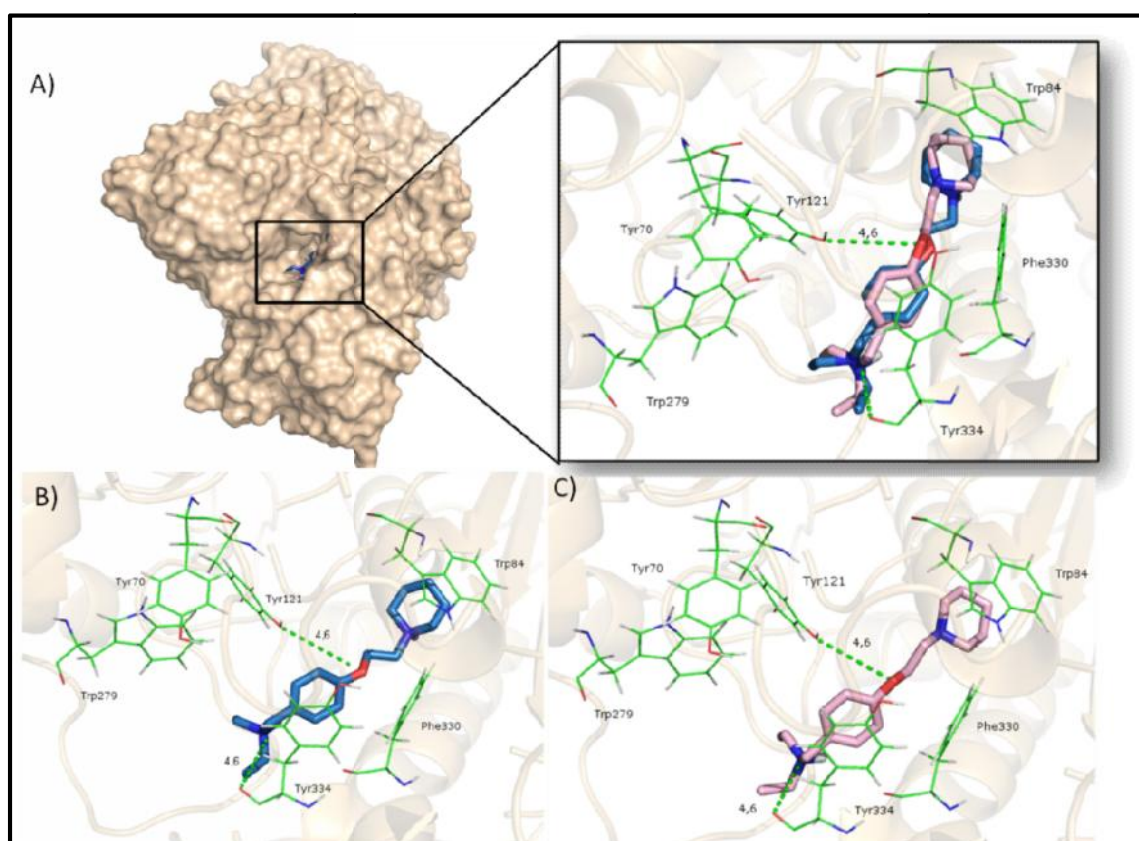


Figura 34. Resultado de *docking* molecular do derivado **1** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (azul) e MVD (rosa); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

A pose do derivado **6** gerada pelo programa AutoDock apresentou interação cátion- π com o resíduo Trp84 (distância 3,7 Å), assim como a pose gerada pelo MVD (distância 3,5 Å). Foi observado uma proximidade com a hidroxila do resíduo Tyr121, a uma distância de 4,6 Å e 4,2 Å para as poses do AutoDock e MVD, respectivamente. Não foi observada proximidade com o resíduo Trp279 do PAS. O derivado **6**, assim como o composto **1** se aproxima dos resíduos Phe330 e Tyr334. Com a Tyr334 existe uma proximidade com a hidroxila a uma distância 4,3 Å para a melhor pose gerada pelo AutoDock e distância 4,3 Å de MVD. Adicionalmente, a formação de uma interação do tipo empilhamento π - π entre o anel do derivado **6** e a Tyr334 foi observado para as duas poses, com uma distância de 3,8 Å pra a pose do AutoDock e 3,6 Å para a pose do MVD. Uma interação hidrofóbica com o resíduo Phe330 foi observada para ambos os resultados (Figura 35).

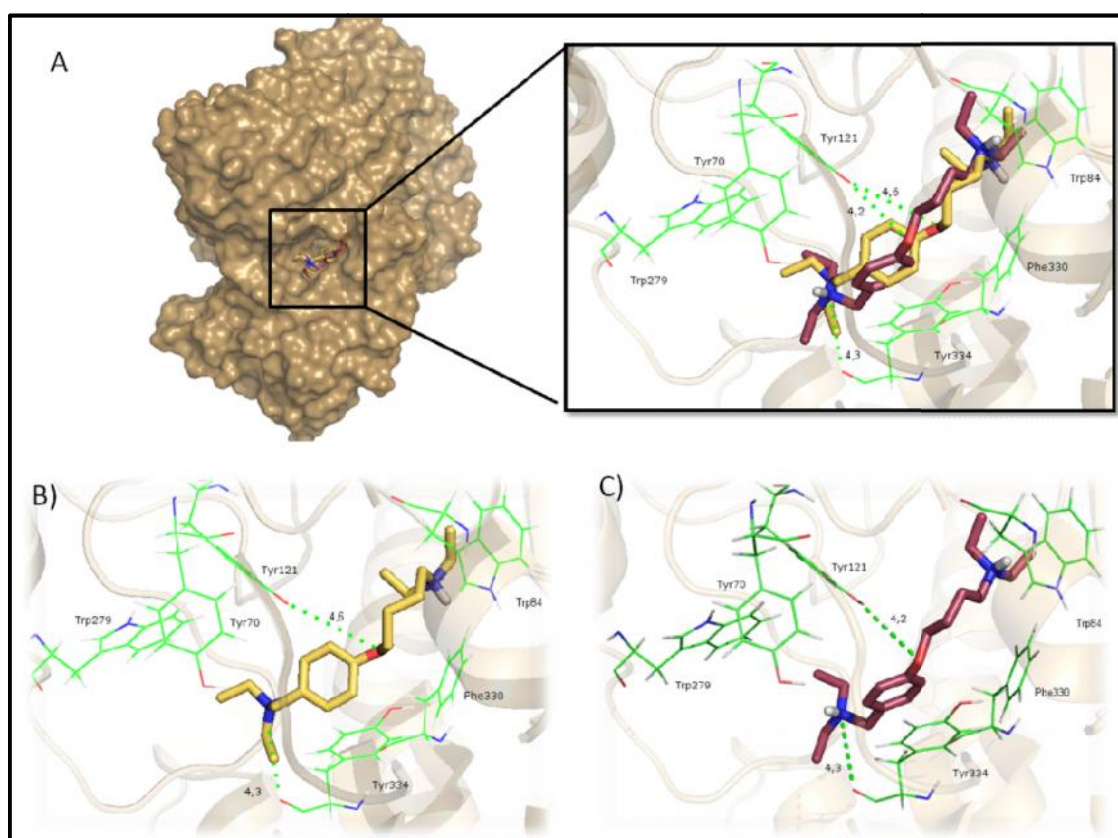


Figura 35. Resultado de *docking* molecular do derivado **6** empregando o programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (amarelo) e MVD (roxo); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

Os dados obtidos da análise dos complexos formados entre os derivados de menor perfil inibitório, **1** e **6**, com a estrutura cristal da 1ACL revelaram um modo de ligação semelhante entre eles. Os resultados obtidos pelos dois programas foram concordantes e demonstraram que estes compostos realizam as principais interações com os resíduos Trp84, Tyr121, Tyr334 e Phe330. Diferente dos compostos com maior atividade, os derivados **1** e **6** não realizaram interações com os resíduos Tyr70 e Trp279.

Os derivados de menor atividade **1** e **6** possuem uma quantidade menor de espaçadores metileno quando comparados aos compostos de maior atividade. Isso parece estar impossibilitando a interação com o resíduo Trp279 do PAS e interferindo na atividade, sugerindo que um alto perfil inibitório esteja intimamente ligado a uma interação com esta cavidade (LEONETTI *et al.*, 2008). Este fato, destaca a importância de uma distância mínima, ou ideal, entre as aminas quaternárias desta série, o que corrobora com dados obtidos da literatura (YU *et al.*, 2010) e do estudo de QSAR- 2D também realizado neste trabalho (DE SOUZA *et al.*, 2012).

Para uma inibição mais efetiva desta enzima, uma interação simultânea com Trp84 e com Trp279 parece ser primordial, pois foi observado pelos resultados de *docking* molecular, que a principal diferença entre os compostos de maior e de menor perfil inibitório é a interação com o Trp279, ou seja, que a falta de interação com o principal representante do PAS diminui muito a potência inibitória. Portanto, para que haja uma inibição mais efetiva é necessário que um candidato a inibidor de AChE deve ser capaz de ligar-se à cavidade catalítica e ao PAS, simultaneamente. A função da enzima é controlada principalmente pelos resíduos de triptofano presentes nos dois sítios. No sítio ativo, o Trp84 participa na orientação das cargas do substrato (GUPTA *et al.*, 2011), porém, tal atuação é dependente do PAS que desempenha uma função alostérica onde o Trp279 desempenha um papel fundamental (COLLETIER *et al.*, 2006).

Estudos recentes identificaram que a AChE pode também desempenhar um papel importante na aceleração da formação de placas β -amilóides (GUPTA *et al.*, 2011). O mecanismo ainda não é claro, porém, acredita-se que a AChE faça interação com as proteínas β A, e com isso, estaria promovendo a formação de placas amilóides. Esta interação envolveria os aminoácidos localizados na proximidade do PAS (BIN WANGA *et al.*, 2010). Apoiado nestes achados, outros estudos descrevem ainda, que existe uma possibilidade dos inibidores duais não somente atuarem na AChE, mas simultaneamente atenuar o déficit cognitivo em pacientes com DA e impedir a formação

de placas β amilóides, retardando o processo neurodegenerativo, sendo portanto, uma nova estratégia para a DA nos últimos tempos (SHENGA *et al.*, 2009).

Nesta série, foi observado, ainda, a importância de um átomo de oxigênio posicionado na cadeia lateral que possibilita uma ligação de hidrogênio com a Tyr121, reafirmando que se trata de um sítio adicional de ligação mantendo o modo de ligação obtido.

Desta maneira, é importante o desenvolvimento e otimização de protótipos que tenham a capacidade de interagir com os dois sítios da enzima e que, de acordo com os achados em estudo baseados na estrutura 3D da enzima, possuam uma cadeia lateral com distância apropriada e que contenha nela, pelo menos, um heteroátomo capaz de realizar interações com um possível sítio adicional, o qual a Try121 faz parte. Existe, porém, a necessidade de manter a cadeia lateral capaz de realizar interações hidrofóbicas, como cátion- π e empilhamento π - π , uma vez que a cavidade possui 14 aminoácidos aromáticos conservados (ROY *et al.*, 2012). Além disso, mostrou-se importante manter os dois átomos de nitrogênio quartenários nas extremidades para que ocorram interações eletrostáticas com Trp84 e Trp279.

5.4.2.2 Butirilcolinesterase

Os derivados fenólicos foram avaliados quanto a atividade inibitória da BChE de plasma de cavalo (YU *et al.*, 2010). Porém, não havia disponível a estrutura 3D para o estudo de *docking* molecular, levando a prévia construção desta estrutura terciária por modelagem comparativa.

Neste estudo foram avaliadas as interações dos complexos ligante-proteína de dois derivados com alto perfil inibitório (**24** e **28**) e dois derivados com baixa perfil inibitório (**1** e **2**) contra a BChE.

5.4.2.2.1. Docking molecular entre os derivados 24, 26, 1, 2 e BChE

Os resultados obtidos para o *docking* dos derivados **24**, **26**, **1** e **2** em complexo com o modelo de BChE de cavalo, indicaram que os compostos ficaram, como esperado, ancorados na cavidade catalítica,. Este comportamento foi observado em ambos os programas, AutoDock e MVD.

Nas simulações de *docking* pelo programa AutoDock, as 50 poses obtidas foram agrupadas em *clusters* com energia estimada variando de -5,0 a -9,0 kcal/mol. O derivado **24** possui uma estrutura altamente flexível e também foram gerados diversos *clusters*, como descrito anteriormente no estudo com a AChE. As poses que se encontravam no *cluster* de maior população e de menor energia apresentavam uma conformação não estendida. Uma avaliação de outras poses em outros *clusters* foi realizada. Nesta busca, foi levado em consideração, assim como no estudo com a AChE, o *cluster* que apresentasse a menor energia subsequente, até que se achasse um grupo com estrutura estendida. Assim, a melhor pose foi encontrada no terceiro cluster de menor energia (- 8,3 Kcal/mol). O mesmo procedimento foi adotado para todos os estudos de *docking* realizados com esta enzima.

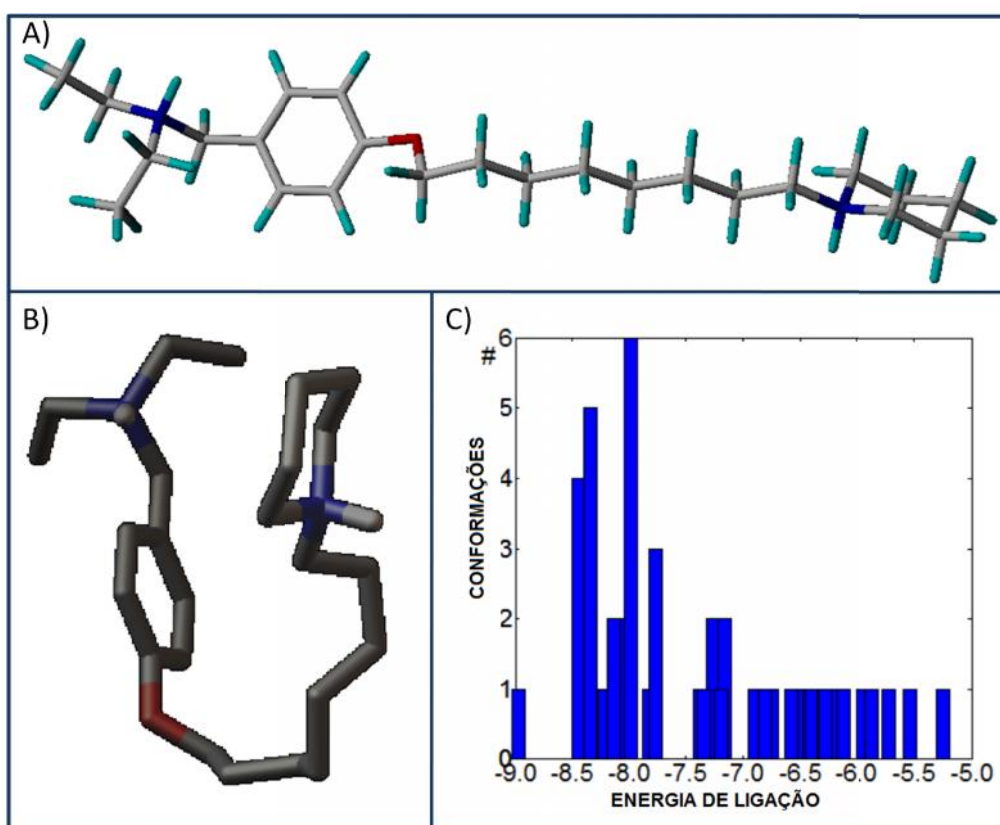


Figura 36. A) Representação da estrutura 3D do composto **24**; B) Representação da pose de menor energia encontrada no cluster de maior população; C) Clusters obtidos no *docking* do derivado **24** e estrutura cristal do modelo de BChE gerado por homologia.

A pose com o composto **24**, gerada no AutoDock mostra interação cátion- π com o resíduo Trp79 (distância 4,0Å) o que também foi observado na melhor pose gerada pelo programa MVD. Uma interação por ligação hidrogênio com a hidroxila do resíduo Tyr329 também foi observada em ambos os resultados de *docking*, sendo que na pose

do AutoDock, a distância é de 3,8Å, e na melhor pose do MVD, a distância é 2,6 Å. Na pose do AutoDock, foi observado a possibilidade de interação por ligação hidrogênio com a cadeia principal do resíduo Leu283 (distância 4,2Å), o que não foi encontrado na pose do MVD. O oxigênio do composto **24** está a uma distância de 5,0 Å do átomo de nitrogênio do resíduo Asp67 na melhor pose do AutoDock (Figura 37).

Ao contrário do observado pelo resultado do AutoDock, a pose do MVD mostrou a possibilidade de interação por ligação hidrogênio com o resíduo Asp67 (distância 4,6 Å) e não foi observado proximidade com o resíduo Leu283 (Figura 37).

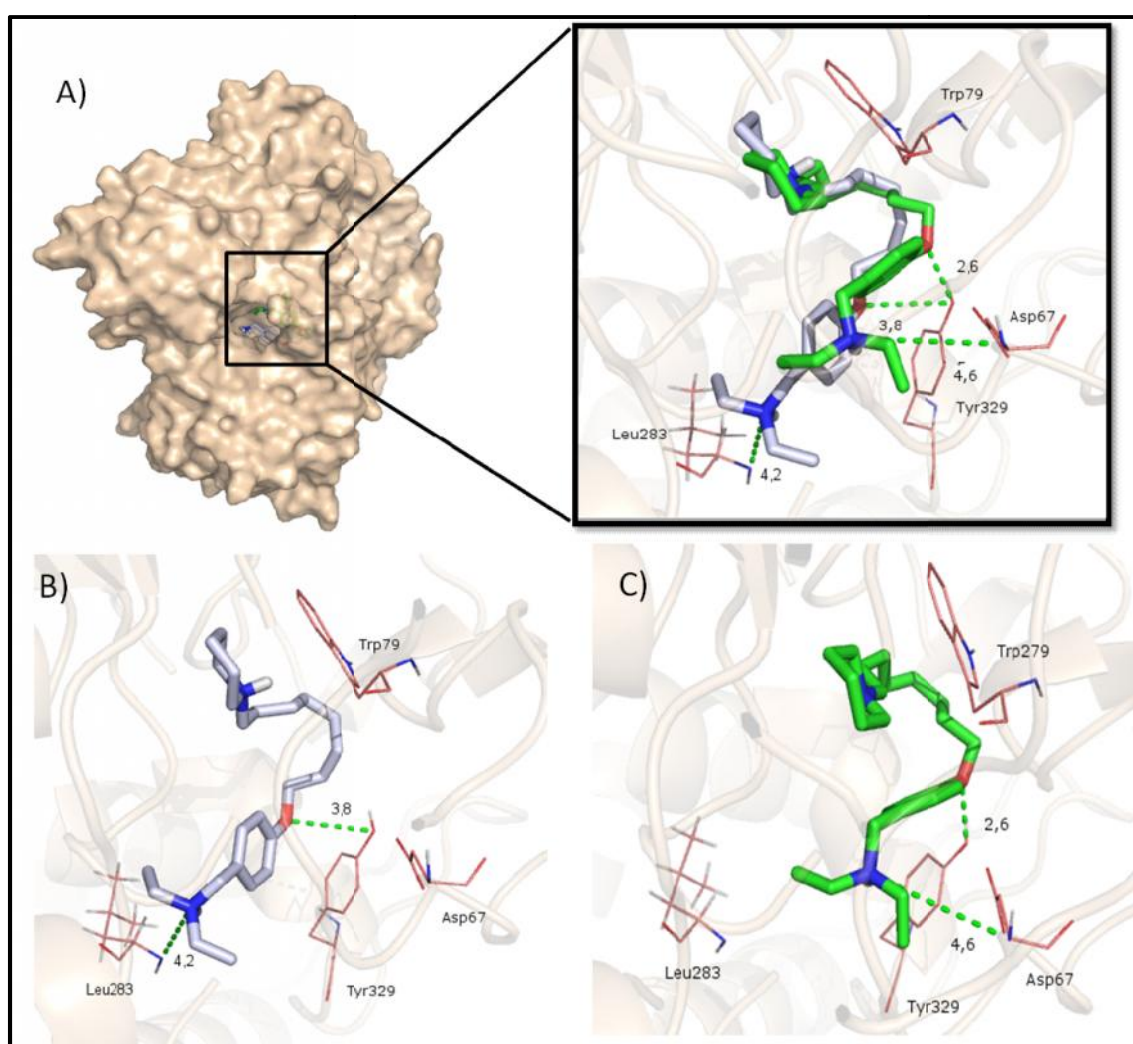


Figura 37. Resultado de *docking* molecular do derivado **24** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (cinza) e MVD (verde); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

A pose com o composto **26**, gerada no AutoDock, mostra resultado similar ao do composto **24** (maior atividade inibitória), indicando uma interação cátion- π com o resíduo Trp79 (distância 4,6Å) assim como na melhor pose do MVD (distância 4,8Å). Uma possibilidade de interação por ligação hidrogênio com a hidroxila do resíduo Tyr329 foi observada tanto para a pose do AutoDock (distância 3,9Å) como para a pose do MVD (distância 4,8Å), devido a sua proximidade. O oxigênio do composto **26** está a uma distância de 4,4 Å do átomo de nitrogênio do resíduo Leu283 (Figura 38) na pose do AutoDock, porém, não foi observado a proximidade com o resíduo Leu283 na pose do MVD (Figura 38C).

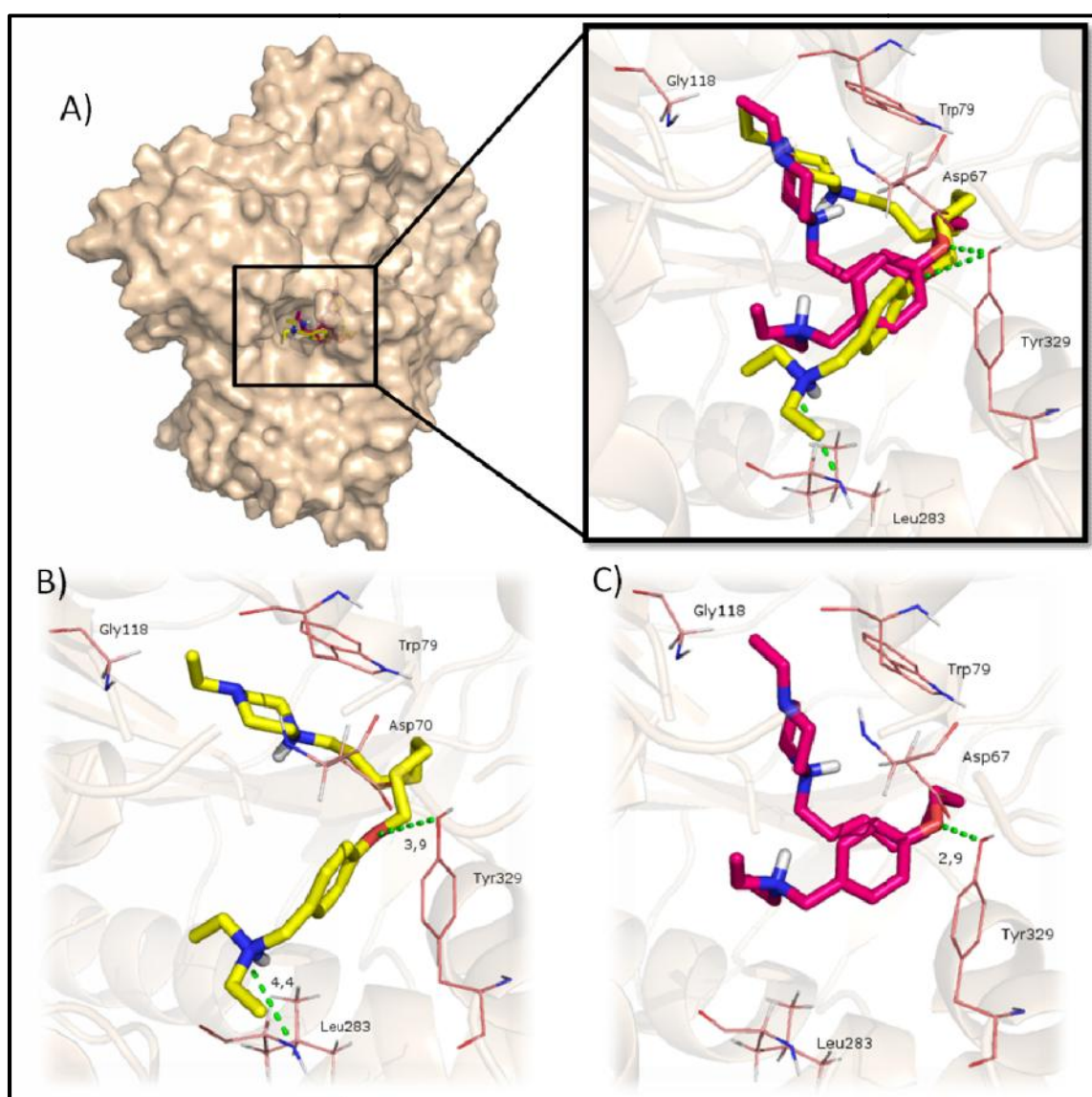


Figura 38. Resultado de *docking* molecular do derivado **26** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (amarelo) e MVD (rosa); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

Os resultados obtidos nos estudos de *docking* dos compostos mais ativos são concordantes no que diz respeito a descrição dos principais resíduos envolvidos nos modos de ligação dos compostos de maior potência inibitória com a BChE. Os principais resíduos destacados como importantes para a inibição da atividade são: Trp79, Asp67, Tyr329 e Leu283.

O resíduo Trp79 está localizado na cavidade catalítica, próximo à tríade do modelo de BChE (Ser195-His435-Glu322). De acordo com os resultados do estudo de *docking*, este resíduo apresenta na BChE o mesmo comportamento que o Trp84 desempenha na AChE. Este resíduo Trp79 influencia no modo de ligação de todos os derivados, participando na orientação das cargas dentro do sítio catalítico.

Neste momento, vale destacar que o grau de semelhança entre AChE e BChE é elevado (51% de identidade) (LEONETTI *et al.*, 2008). De maneira geral, a estrutura 3D da BChE possui o sítio ativo e o sítio PAS que está localizado no início da "garganta aromática" (KHAN *et al.*, 2010).

Os resíduos principais deste sítio são Asp67 e Tyr329 que desempenham uma função de "porteiro" do sítio ativo. Esses resíduos estão envolvidos na ligação inicial dos substratos carregados positivamente e controlam a arquitetura do sítio ativo. Esta mesma tarefa parece envolver os resíduos Leu283 e Val285 da cavidade acila da BChE, em contraste com a AChE que possui nesta mesma cavidade dois resíduos aromáticos (Phe295 e Phe297), o que parece ser responsável pela seletividade de ligação para AChE (NAWAZ *et al.*, 2011).

Os programas empregados neste estudo geraram poses que foram concordantes nas interações com os resíduos Trp79 e Tyr329, porém, o AutoDock gerou poses (compostos **24** e **26**) que indicaram uma maior proximidade com o resíduo Leu283, o que não foi observado no MVD. Como a validação do protocolo de *docking* para o programa AutoDock gerou um valor de RMSD (RMSD = 0,96Å) menor do que o valor (RMSD = 1,47 Å) do MVD e como dados de literatura confirmam a importância do resíduo de Leu283, esta interação foi considerada importante para a inibição da BChE.

Para uma comparação entre os modos de interação entre compostos que possuem alto e baixo perfil inibitório, foram analisados, também, os complexos formados entre os derivados **2** e **1** e a BChE.

A pose do composto **2** (menor perfil inibitório para BChE) gerada pelo programa AutoDock, mostra interação cátion- π com o resíduo Trp79 (distância 4,5Å) e com o resíduo Tyr329 (distância 4,1Å) (Figura 39).

A melhor pose do composto **2**, gerada no MVD, não revelou interação com o resíduo Trp79, porém, o átomo de nitrogênio protonado do ligante **2** possui uma proximidade com a Gly113 (distância 3,6 Å) possibilitando uma ligação hidrogênio. Existe ainda, uma possibilidade de ligação hidrogênio com os resíduos Asp67 (distância 4,1Å) e com o resíduo Thr117 (distância 3,2Å) (Figura 40).

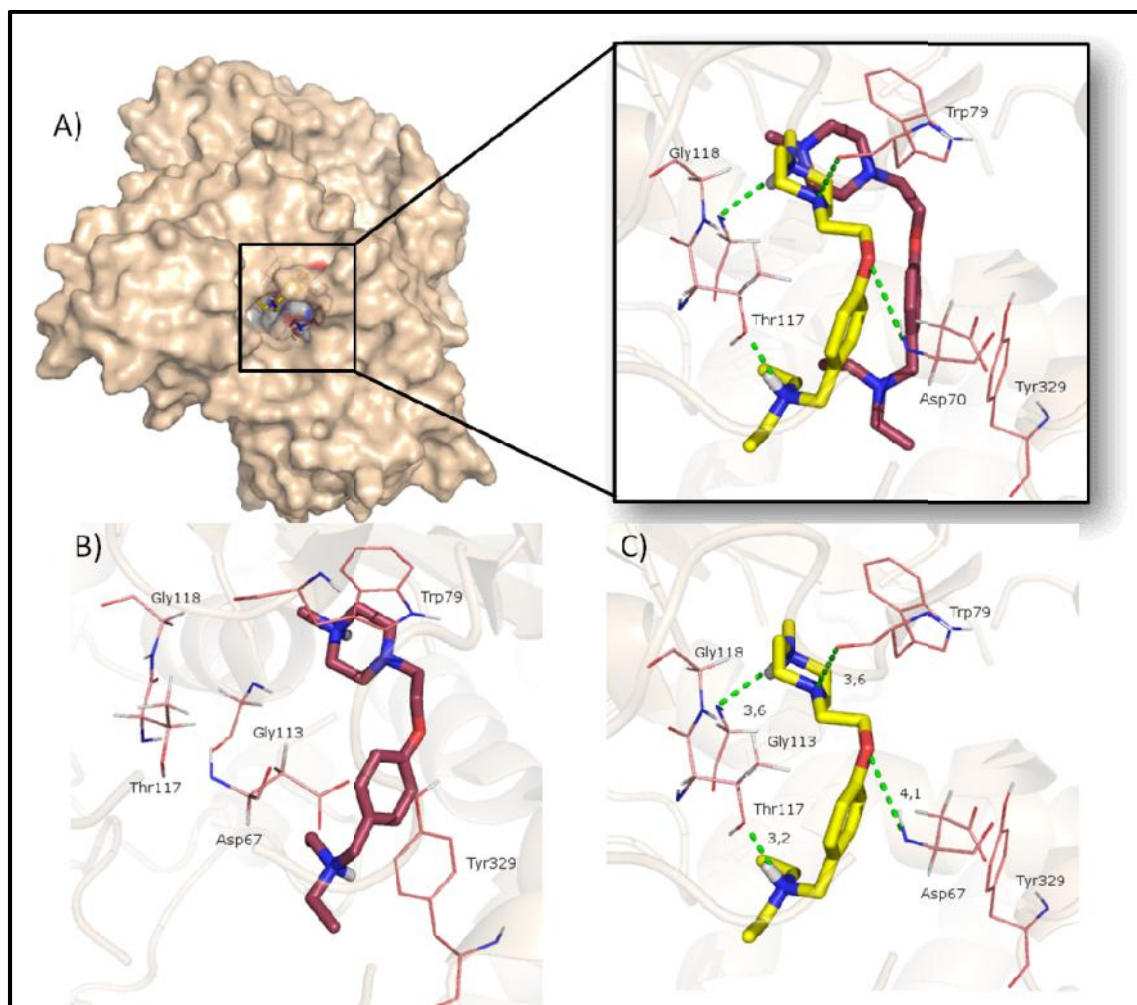


Figura 39. Resultado de *docking* molecular do derivado **2** empregando programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (vinho) e MVD (amarelo); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

A pose com o composto **1**, gerada no AutoDock, revelou apenas uma interação π -cation com o resíduo Trp79 (distância 3,8Å) e com o resíduo Tyr329 (distância 3,4Å) (Figura 40B), assim como observado na pose com o composto **2**, gerada no mesmo programa.

A pose com o composto **1**, gerada no MVD, não revelou interação com o resíduo Trp79, porém, o átomo de nitrogênio protonado do ligante **1** possui uma proximidade

com a Gly113. Existe, ainda, uma possibilidade de ligação hidrogênio com os resíduos Asp67 (distância 3,6Å) e com o resíduo Thr117 (distância 2,9Å) (Figura 40).

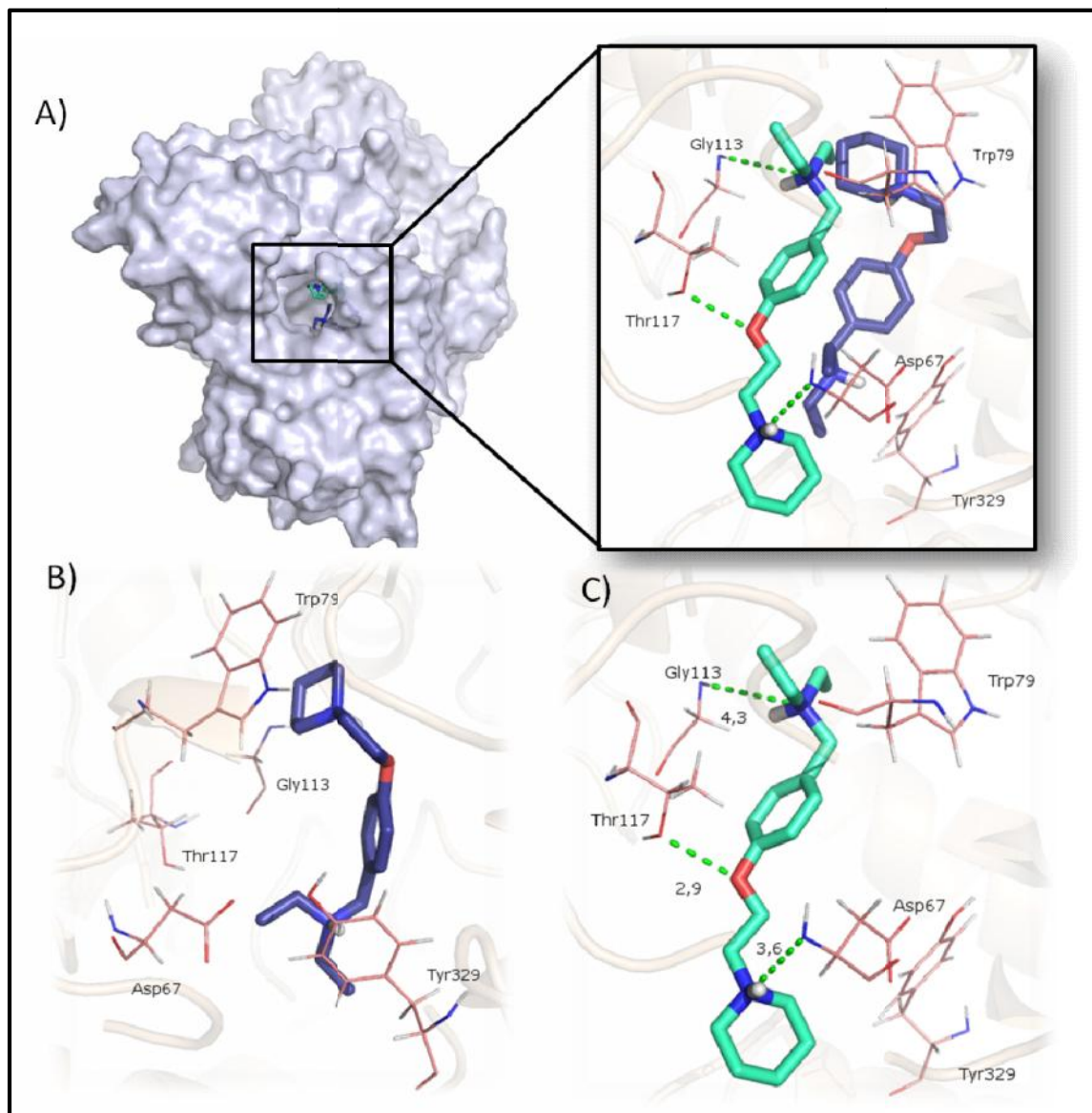


Figura 40. Resultado de *docking* molecular do derivado **1** empregando o programa Pymol A) Sobreposição das melhores poses obtidas pelo AutoDock (azul) e MVD (verde); B) Principais interações obtidas pelo AutoDock; C) Principais interações obtidas pelo MVD.

Em analogia ao observado na pose com o composto **2**, este estudo indicou o mesmo modo de ligação encontrado pelo programa AutoDock, o que difere do encontrado pelo MVD. Observou-se que a cadeia lateral está invertida nas melhores poses obtidas entre os programas utilizados. O modo de ligação da melhor pose encontrada pelo AutoDock foi encontrado em 72% das poses obtidas. Uma possível justificativa para esta mudança de modo de interação é que, como a cavidade da BChE é

maior do que a cavidade da AChE (CORREA-BASURTO *et al.*, 2007) e os compostos de menor atividade possuem uma cadeia lateral mais curta, existe uma maior diversidade de modos de ligação destes compostos no sítio da BChE.

Assim como descrito anteriormente, o resultado do AutoDock foi escolhido pela comparação dos resultados entre os compostos de maior e menor atividade inibitória.

Os resultados obtidos demonstraram que estes compostos realizam interações com os resíduos Trp79, Tyr329 e Leu283. Diferente dos compostos com maior atividade, os derivados **1** e **2** não realizaram interação com o resíduo Leu283. De acordo com os resultados descritos anteriormente, os compostos de alto perfil inibitório, por possuírem uma cadeia lateral maior, conseguem fazer uma interação com o resíduo de Leu283. Uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr329 também foi observada nas poses dos compostos de maior atividade. Provavelmente, a diminuição de potência dos compostos **1** e **2** é justificada pela interação mais fraca com a Tyr329 (cátion- π).

5.5 Planejamento racional de novos derivados fenólicos

Os resultados obtidos no estudo de QSAR-2D (HQSAR) destacaram a importância da presença dos átomos de oxigênio e nitrogênio para a atividade inibitória, assim como a necessidade de uma cadeia lateral mais extensa. Em concordância com estes achados, os estudos de *docking* molecular baseados na estrutura das enzimas, revelaram que, de uma maneira geral, os resíduos triptofano e tirosina são igualmente importantes para o reconhecimento do ligante em ambas as enzimas estudadas, AChE e BChE. As interações que ocorrem com estes resíduos estão diretamente relacionadas com os átomos de nitrogênio protonados e a distância entre eles. Esta distância parece ser um fator importante, pois é diretamente responsável pela interação simultânea do ligante aos sítios catalítico e aniônico periférico. Além do tamanho, outra característica importante da cadeia lateral é seu caráter hidrofóbico, uma vez que a chamada "garganta aromática" de ambas as enzimas é composta, em sua maioria, por resíduos aromáticos conservados (XU *et al.*, 2008).

Nos estágios médio a avançado da DA, a atividade da AChE diminui progressivamente em algumas regiões do cérebro, enquanto que a atividade de BChE fica inalterada ou aumentada. Portanto, uma modificação molecular baseada nessas

informações pode auxiliar na proposta de novos derivados fenólicos com melhor atividade inibitória frente a enzima BChE (GIACOBINI, E., 2004).

No processo de otimização de novos candidatos a inibidores de colinesterases, a primeira escolha foi manter a estrutura geral dos derivados da série estudada, assim como o tamanho da cadeia lateral, a fim de proporcionar alcance dos compostos aos principais resíduos dos sítios catalítico e aniônico periférico. Os mesmos grupos piperidina e 4-etilpiperazina dos compostos **24** e **26**, respectivamente, foram mantidos para compor a estrutura dos novos compostos, por fazerem parte dos derivados de maior potencia inibitória para BChE e AChE.

A principal modificação foi direcionada para a cadeia lateral, no intuito de diminuir a sua flexibilidade a fim de diminuir a entropia do sistema, porém, sem alterar o espaçamento necessário para a interação com a enzima. Foram propostos quatro novos compostos, introduzindo a subunidade bifenila em posições diferentes, *para* e *meta* (Figura 41). Por se tratarem de anéis aromáticos, a característica hidrofóbica da cadeia lateral foi mantida, assim como o espaçamento entre os átomos de nitrogênio terminais. Espera-se, com isso, avaliar qual o papel da diminuição da flexibilidade da cadeia lateral, assim como, o impacto de grupos mais volumosos na atividade das duas enzimas.

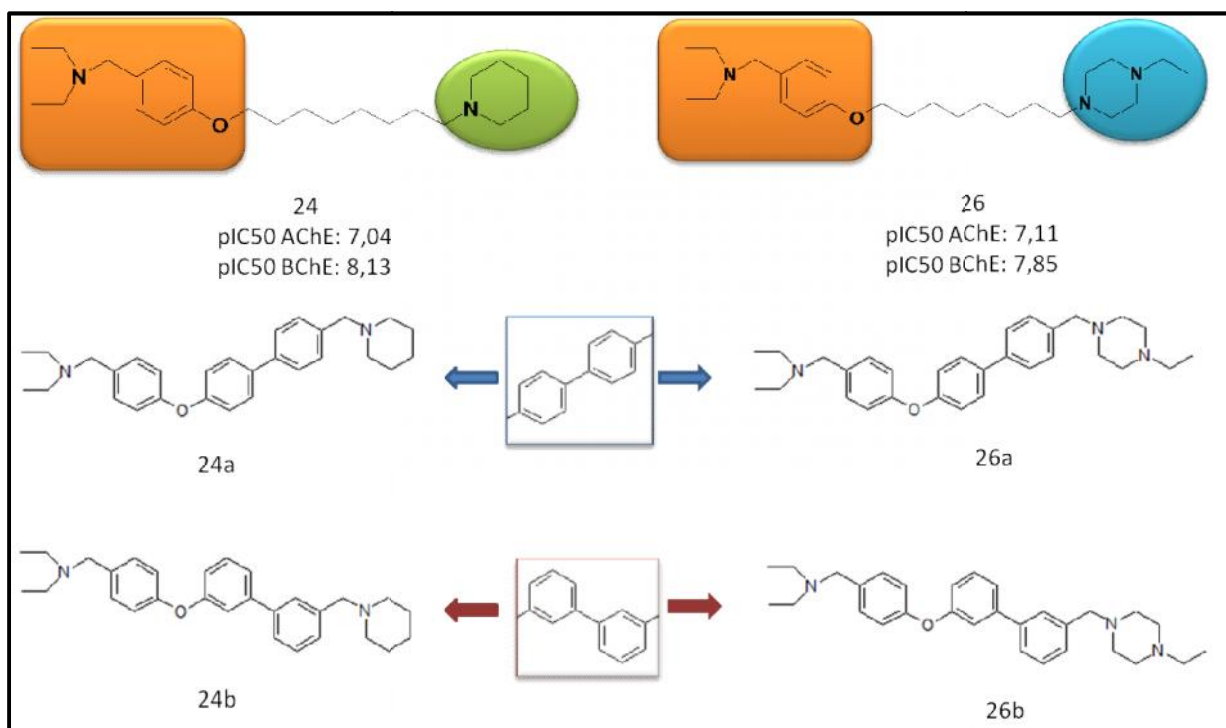
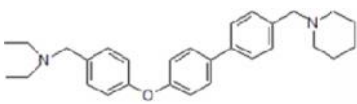
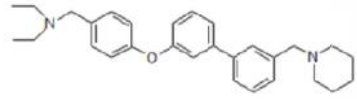
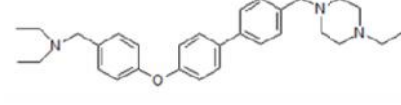
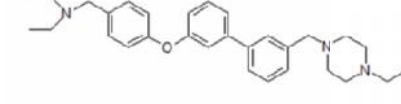


Figura 41. Esquema da proposição de novos candidatos a inibidores de colinesterases, baseado na estrutura geral dos compostos **24** e **26**.

5.5.1 Estudos de QSAR-2D (HQSAR) dos novos derivados fenólicos

As atividades biológicas dos derivados propostos foram preditas utilizando os melhores modelos de HQSAR gerados e validados para cada enzima (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade biológica estimada (pIC₅₀, M) para os novos derivados fenólicos empregando os modelos de HQSAR de AChE e BChE.

Compostos	AChE pIC ₅₀ previsto	BChE pIC ₅₀ previsto
 24a	7,66	8,03
 24b	5,22	8,03
 26a	5,25	9,10
 26b	5,67	9,10

O resultado de HQSAR frente a AChE indicou que, possivelmente, as alterações propostas poderiam levar a um pequeno aumento de atividade inibitória. Este fato foi observado para o composto **24a**, que apresentou um valor de pIC_{50} de 7,66. Não foi observado aumento da atividade prevista frente a AChE para os outros compostos propostos.

Com base nos resultados de HQSAR frente a BChE, foi encontrada uma expectativa de aumento de atividade maior do que observado para AChE. O maior valor de atividade inibitória experimental da série estudada contra a BChE é do derivado **24**, que possui pIC_{50} de 8,13. O melhor valor de pIC_{50} predito foi encontrado para os novos derivados **26a** e **26b** ($pIC_{50}=9,10$), que não indicaram expectativa de melhora contra a AChE.

Avaliando os resultados de HQSAR descritos anteriormente, podemos inferir que, a alteração proposta na cadeia lateral, mesmo sendo uma modificação discreta, foi capaz de aumentar, como esperado, a atividade inibitória predita para a BChE. Acredita-se que, o aumento de volume na cadeia lateral possa ter levado a uma seletividade para BChE, uma vez que esta enzima possui uma cavidade maior quando comparada a AChE.

5.5.2 Estudos de *docking* molecular dos novos derivados fenólicos

5.5.2.1 Acetilcolinesterase

O *docking* dos quatro novos derivados foi realizado segundo protocolo anteriormente validado para o programa AutoDock.

A melhor pose encontrada com o composto **24a** revela um modo de ligação no sítio ativo semelhante a melhor pose do derivado **26a**. Os dois compostos possuem a mesma cadeia lateral com uma bifenila na posição *orto*. O mesmo comportamento foi observado para os compostos **24b** e **26b**, que também possuem uma bifenila, porém na posição *meta*.

A pose do composto **24a** revelou uma possibilidade de interação cátion- π com o resíduo Trp84 (distância de 4,2Å), uma ligação hidrogênio com o resíduo Tyr70 (distância de 2,9Å), interação do tipo empilhamento π com o resíduo Tyr334 (distância de 4,3Å) e uma proximidade com o resíduo Trp279 de 4,5Å. Como descrito, um mesmo modo de ligação foi observado para o composto **26a** e, assim como o derivado **24a**,

apresentou uma interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp84 (distância 4,0Å) e empilhamento π com o resíduo Tyr334 (distância 4,0Å). Uma interação do tipo cátion- π com Trp279 com uma distância de 4,0Å também foi observado.

A melhor pose com o composto **24b**, assim como para o **26b**, revelou uma interação cátion- π com o resíduo Trp84 (4,2Å para **24b** e **26b**) e uma ligação hidrogênio com o resíduo Try70 (2,9Å para **24b** e **26b**) e com Tyr121 a uma distância de 3,5Å para **24b** e 3,9 Å para **26b**. Foi observado, ainda, uma interação do tipo empilhamento π - π com a His435 com uma distância de 3,6Å e 3,8 para os derivados **24b** e **26b**, respectivamente. Porém, uma outra possibilidade de interação foi observada para o **26b** devido a uma proximidade entre anel aromático deste composto com o anel do Trp279 de 3,9Å, possibilitando uma interação do tipo empilhamento π - π .

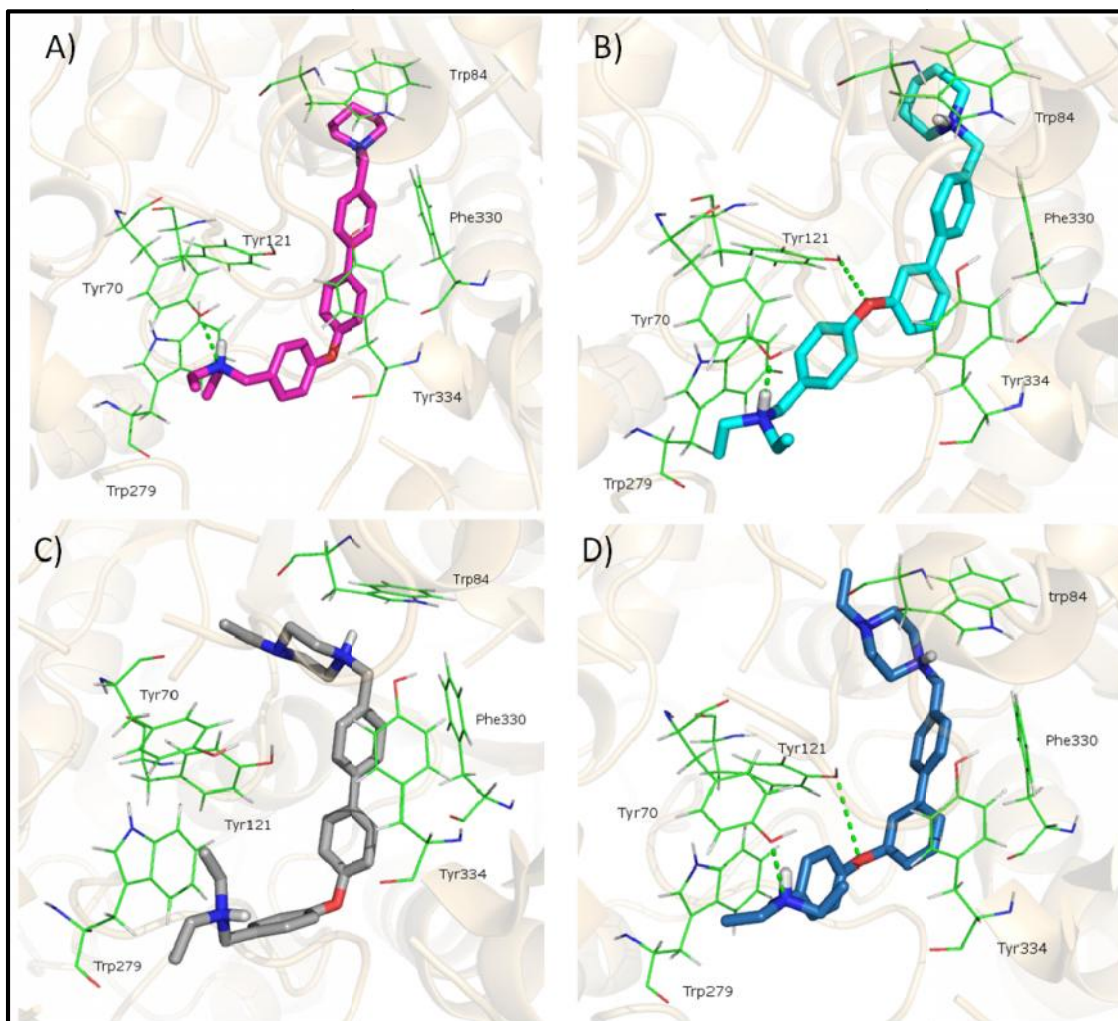


Figura 42. Resultado de *docking* molecular dos novos derivados e a AChE empregando programa de visualização Pymol. A) Principais interações com o derivado **24a**; B) Principais interações como derivado **24b**; C) Principais interações com o derivado **26a**; C) Principais interações com o derivado **26b**

5.5.2.2 Butirilcolinesterase

O *docking* dos quatro novos derivados foi realizado segundo protocolo anteriormente validado para o programa AutoDock.

A melhor pose encontrada com o composto **24a** revela um modo de ligação no sítio ativo semelhante a melhor pose do derivado **26a**. Os dois compostos possuem a mesma cadeia lateral com uma bifenila na posição *orto*. O mesmo comportamento foi observado para os compostos **24b** e **26b**, que também possuem uma bifenila, porém na posição *meta*.

A pose do composto **24a** revelou uma possibilidade de interação por empilhamento π - π com o resíduo Trp79 numa distância de 4,0Å, uma ligação hidrogênio com o resíduo Gly113 (distância 3,6Å), interação do tipo empilhamento π - π com resíduo Tyr329 (distância 3,2Å) e uma proximidade com o resíduo Leu283 de

3,7Å, o que pode possibilitar uma ligação hidrogênio. Como descrito, um mesmo modo de ligação foi observado para o composto **26a**, que apresentou também uma interação com o Trp79, porém, do tipo cátion- π a uma distância de 3,5Å, assim como o derivado **24a**, uma interação do tipo π -stacking com a Tyr329 (distância 3,2 Å) e uma proximidade com o resíduo de Leu283 de 4,6Å. Porém, uma diferença importante foi observada para o derivado **26a**, uma possibilidade de interação com a His435 da tríade catalítica por uma proximidade de 4,6Å entre o terceiro átomo nitrogênio do composto proposto com o nitrogênio deste resíduo. Esta interação pode explicar a predição de maior perfil inibitório deste composto quando comparado ao **24a**.

A melhor pose com o composto **24b**, assim como para o **26b**, revelou uma interação cátion- π com o resíduo Trp79 a uma distância de 4,2Å para **24b** e de 4,4Å para **26b**, uma proximidade com o resíduo Leu283 de 4,7Å para **24b** e 4,5 para **26b**, uma ligação hidrogênio com a Gly114 com distância de 3,6Å para **24b** e uma possibilidade de ligação hidrogênio com a Gly113, devido a uma proximidade encontrada de 4,1Å para **26b**. Foi observado, ainda, uma interação do tipo empilhamento π - π com a His435 (3,6Å para **24b** e 3,8 Å para **26b**). Porém, uma outra possibilidade de interação foi observada para o **26b** devido a uma proximidade entre o nitrogênio deste composto com o da His435 de 4,3Å.

Como descrito pelos estudos de *docking*, o grupo 4-etilpiperazina parece ser importante na promoção de interação com o resíduo da tríade catalítica.

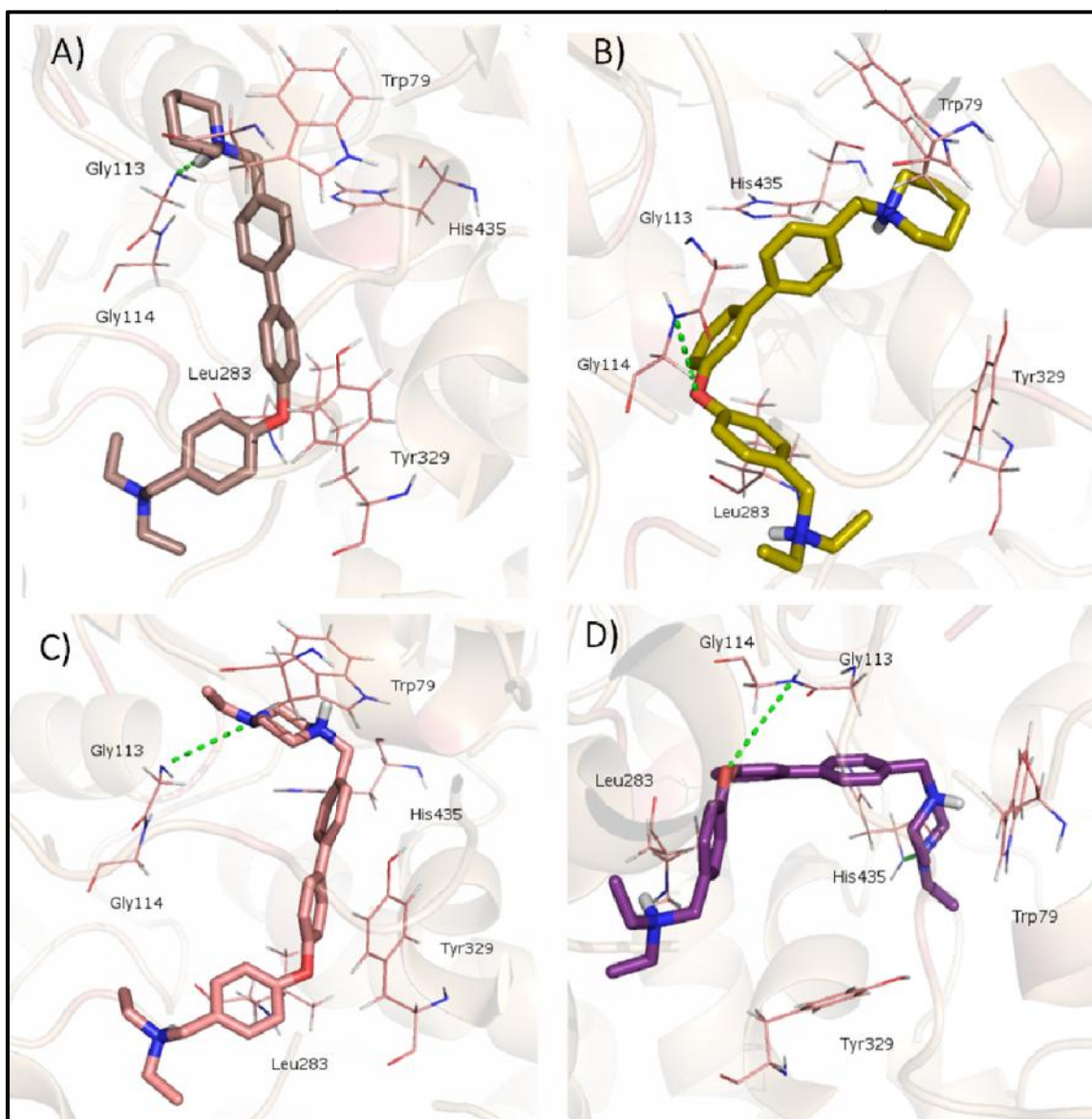


Figura 43. Resultado de *docking* molecular dos novos derivados e a BChE empregando programa Pymol. A) Principais interações com o **24a**; B) Principais interações como derivado **24b**; C) Principais interações com o derivado **26a**; D) Principais interações com o derivado **26b**.

6. CONCLUSÕES

Modelos de QSAR-2D (HQSAR) foram construídos e validados para as enzimas AChE e BChE. Ambos os estudos mostraram resultados estatísticos significativos (AChE: $r^2 = 0,974$ e $q^2 = 0,897$; BChE: $r^2 = 0,945$ e $q^2 = 0,883$) e baixos valores residuais entre atividade experimental e calculada. O mapa de contribuição de atividade gerado pelo estudo, mostrou que unidades estruturais aromáticas e um espaçador maior colaboram para o aumento da inibição. Destacou, também, a importância dos átomos de oxigênio e nitrogênio para a atividade.

Um modelo 3D da BChE de *Equus caballus*, foi obtido por modelagem comparativa usando programa Modeller.

Os resultados de *docking* dos derivados fenólicos no sítio ativo da AChE de *Torpedo californica* mostraram que os compostos de maior perfil inibitório fazem interações com os resíduos Trp84, Tyr70, Tyr121, Trp279, Phe330 e Tyr334, que estão localizados nos sítios catalítico e aniônico periférico. Este estudo foi capaz de destacar, também, a importância do tamanho da cadeia lateral para promover as principais interações observadas que são as que ocorrem com o Trp84 e Trp279, que parecem ser essenciais para a inibição de atividade.

Os resultados de *docking* dos derivados fenólicos no sítio ativo do modelo 3D de BChE de cavalo indicaram que os compostos de maior atividade realizavam interações com os resíduos Trp79, Asp67, Tyr329 e Leu283. Os compostos de menor perfil inibitório não realizaram interações com o resíduo Leu283, devido ao seu menor tamanho de cadeia lateral, o que parece ser importante no conjunto das interações observadas para a atividade inibitória contra a BChE.

Baseado nas análises de HQSAR e *docking*, juntamente com dados obtidos da literatura com relação a inibidores das duas enzimas, foram propostos 4 novos derivados fenólicos. As modificações estruturais foram baseadas, principalmente, em alterações na cadeia lateral com a introdução de bifenilas nas posições *meta* e *orto*, além de hibridação molecular envolvendo os grupos piperidina e 4-etilpiperazina dos compostos **24** e **26**, respectivamente.

Estudos de HQSAR e de *docking* molecular foram realizados com os novos compostos propostos. Estimou-se um aumento discreto de atividade prevista, indicando que uma otimização na cadeia lateral, mantendo o mesmo espaçamento, porém,

diminuindo a flexibilidade desta, assim como o emprego do grupo 4-etilpiperazina, pode ser interessante para uma maior inibição contra a BChE.

Tendo em vista os resultados descritos, uma avaliação da toxicidade *in silico* seria interessante para uma posterior etapa de avaliação *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A, L. R.; W, M. M.; S, M. D.; M, T. J. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. v. 26, p. 283-291, 1993.

ACHARYA, K. R.; LLOYD, M. D. The advantages and limitations of protein crystal structures. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 1, p. 10-4, 2005.

ALCALA MDEL, M.; VIVAS, N. M.; HOSPITAL, S.; CAMPS, P. *ET AL.* Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 749-55, 2003.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med Res Rev**, v. 26, n. 5, p. 531-68, 2006.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. *ET AL.* Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

ALZHEIMER'S-ASSOCIATION. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 8, n. 2, p. 131-68, 2012.

ANSTEY, K. J.; VON SANDEN, C.; SALIM, A.; O'KEARNEY, R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 4, p. 367-78, 2007.

ARAÚJO, J. Q. **Estudos de Docking e QSAR-3D dependente do receptor de inibidores da Acetilcolinesterase.** . Tese (Doutorado em Ciências (Química)). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,. 2010.

ASH, S.; CLINE, M. A.; HOMER, R. W.; HURST, T. *ET AL.* SYBYL Line Notation (SLN) a versatile language for chemical structure representation. **J chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 37, p. 71-79, 1997.

AULETTA, J. T.; JOHNSON, J. L.; ROSENBERRY, T. L. Molecular basis of inhibition of substrate hydrolysis by a ligand bound to the peripheral site of acetylcholinesterase. **Chem Biol Interact**, v. 187, n. 1-3, p. 135-41, 2010.

BALLARD, C. G. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. **Eur Neurol**, v. 47, n. 1, p. 64-70, 2002.

BEMBENEK, S. D.; KEITH, J. M.; LETAVIC, M. A.; APODACA, R. *ET AL.* Lead identification of acetylcholinesterase inhibitors-histamine H3 receptor antagonists from molecular modeling. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 6, p. 2968-73, 2008.

BERTRAM, L.; BUSCH, R.; SPIEGL, M.; LAUTENSCHLAGER, N. T. *ET AL.* Paternal age is a risk factor for Alzheimer disease in the absence of a major gene. **Neurogenetics**, v. 1, n. 4, p. 277-80, 1998.

BIN WANGA; YI-CHI MAIA; YUE LIA; JIN-QIANG HOUA *ET AL.* Synthesis and evaluation of novel rutaecarpine derivatives and related alkaloids derivatives as selective acetylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1415–1423, 2010.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Alzheimer's disease: pathogenesis and prevention. **Alzheimers Dement**, v. 8, n. 3, p. 227-33, 2012.

BROWN, R. D.; MARTIN, Y. C. Use of structure-activity data to compare structure-based clustering methods and descriptors for use in compound selection. **J. Chem. Inf. Comput. Sci**, v. 36, p. 572-584, 1996.

CAMPS, P.; EL ACHAB, R.; MORRAL, J.; MUNOZ-TORRERO, D. *ET AL.* 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, n. 24, p. 4657-66, 2000.

CARAMELLI, P. **Neuropsiquiatria geriátrica**. Neuropatologia da Doença de Alzheimer. FORLENZA, O. V. C., P. São Paulo: Atheneu: 107-118 p. 2000.

CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 13-14, p. 676-83, 2009.

COLLETIER, J.-P.; FOURNIER, D.; GREENBLATT, H. M.; STOJAN, J. *ET AL.* Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. **EMBO J**, v. 25, n. 12, p. 2746-2756, 2006.

CORREA-BASURTO, J.; FLORES-SANDOVAL, C.; MARÍN-CRUZ, J.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A. *ET AL.* Docking and quantum mechanic studies on cholinesterases and their inhibitors. **Eur J Med Chem**, v. 42, n. 1, p. 10-19, 2007.

CRAMER, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. **J Am Chem Soc**, v. 110, n. 18, p. 5959-67, 1988.

CUTLER, N. R.; SRAMEK, J. J. Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 27-57, 2001.

DA COSTA, P. A.; POPPI, R. J. Genetic algorithm in chemistry. **Quim. Nova**, v. 22, p. 405-411, 1999.

DA SILVA, C. H.; CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; TAFT, C. A. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. **J Mol Graph Model**, v. 25, n. 2, p. 169-75, 2006.

DAGA, P. R.; PATEL, R. Y.; DOERKSEN, R. J. Template-based protein modeling: recent methodological advances. **Curr Top Med Chem**, v. 10, n. 1, p. 84-94, 2010.

DE SOUZA, S. D.; DE SOUZA, A. M. T.; DE SOUSA, A. C. C.; SODERO, A. C. R. *ET AL.* Hologram QSAR Models of 4-[(Diethylamino)methyl]-phenol Inhibitors of Acetyl/Butyrylcholinesterase Enzymes as Potential Anti-Alzheimer Agents. **Molecules**, v. 17, p. 9529-9539, 2012.

DEBNATH, A. K. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) paradigm--Hansch era to new millennium. **Mini Rev Med Chem**, v. 1, n. 2, p. 187-95, 2001.

DODDAREDDY, M. R.; LEE, Y. J.; CHO, Y. S.; CHOI, K. I. *ET AL.* Hologram quantitative structure activity relationship studies on 5-HT₆ antagonists. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 14, p. 3815-24, 2004.

DWORACEK, B.; RUPREHT, J. Physostigmine: short history and its impact on anaesthesiology of present days. **International Congress Series**, v. 1242, n. 0, p. 87-93, 2002.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V., JR.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ERICKSON, J. A.; JALAIE, M.; ROBERTSON, D. H.; LEWIS, R. A. *ET AL.* Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. **J Med Chem**, v. 47, n. 1, p. 45-55, 2004.

FERRER, I. Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. **Prog Neurobiol**, v. 97, n. 1, p. 38-51, 2012.

FRANK, R.; HUEBEL, S.; STREICH, W. J. Substructural QSAR Approaches and Topological Pharmacophores. **Envir. Healt. Perspect**, v. 61, p. 239-255, 1985.

FREE, S. M. J.; WILSON, J. W. A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. **J Med Chem**, v. 7, p. 395-399, 1964.

GEHLHAAR, D. K.; VERKHIVKER, G. M.; REJTO, P. A.; SHERMAN, C. J. *ET AL.* Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease - Conformationally flexible docking by evolutionary programming. **Chemistry & Biology**, v. 2, p. 317-324, 1995.

GELDENHUYS, W. J.; GAASCH, K. E.; WATSON, M.; ALLEN, D. D. *ET AL.* Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 3-4, p. 127-32, 2006.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacol Res**, v. 50, n. 4, p. 433-40, 2004.

GIACOBINI, E., Ed. **Conitive Enhancing Drugs**. Basel, Boston , Berlin: Buccafusco, J. J., p.11-36ed. 2004.

GIBAS, C.; JAMBECK, P., . **Desenvolvendo bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia**. Rio de Janeiro: 2001.

GREIG, N. H.; LAHIRI, D. K.; GIACOBINI, E. Editorial: advances in Alzheimer therapy: something old, something new, something borrowed, something blue. **Curr Alzheimer Res**, v. 2, n. 3, p. 275-9, 2005.

GUALTIERI, F.; DEI, S.; MANETTI, D.; ROMANELLI, M. N. *ET AL.* The medicinal chemistry of Alzheimer's and Alzheimer-like diseases with emphasis on the cholinergic hypothesis. **Farmaco**, v. 50, n. 7-8, p. 489-503, 1995.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-23, 1997.

GUPTA, S.; FALLARERO, A.; JARVINEN, P.; KARLSSON, D. *ET AL.* Discovery of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors identified by pharmacophore modeling and sequential virtual screening techniques. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 4, p. 1105-12, 2011.

HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins**, v. 47, n. 4, p. 409-43, 2002.

HANSCH, C.; FUJITA, T. Analysis. Method for Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. **J. Am. Chem. Soc**, v. 86, p. 1616-1626, 1964.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F. *ET AL.* Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 19, p. 9031-5, 1993.

HEALY, E. F.; SANDERS, J.; KING, P. J.; ROBINSON, W. E., JR. A docking study of L-chicoric acid with HIV-1 integrase. **J Mol Graph Model**, v. 27, n. 5, p. 584-9, 2009.

HEHRE, W. J. A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations. **Wavefunction, Inc.**, 2003.

HERRERA, E., JR.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 16, n. 2, p. 103-8, 2002.

HOPFINGER, A. J. A QSAR investigation of dihydrofolate reductase inhibition by Baker triazines based upon molecular shape analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, p. 7196-7206, 1980.

HOPFINGER, A. J.; WANG, S.; TOKARSKI, J. S.; JIN, B. Q. *ET AL.* Construction of 3D-QSAR models using the 4D-QSAR analysis formalism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 10509-10524, 1997.

HURST, T.; HERITAGE, T. **HQSAR - A Highly Predictive QSAR Technique Based on Molecular Holograms**,. 213th ACS Natl. Meeting. San Francisco, CA: CINF 019 1997.

JAISWAL, D.; KARTHIKEYAN, C.; TRIVEDI, P. Rationalization of Physicochemical Properties of Alkanoic Acid Derivatives towards Histone Deacetylase Inhibition. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, v. 5, p. 13-26, 2006.

JAISWAL, D. K., C.; TRIVEDI, P. Rationalization of Physicochemical Properties of Alkanoic Acid Derivatives towards Histone Deacetylase Inhibition. **Internet Electronic Journal of Molecular Design** v. 5, p. 13-26., 2006.

JAMES, C. A.; WEININGER, D. **Daylight theory Manual**. Daylight chemical information systems, Inc. 27401 Los Altos, Suite # 370, Mission Viejo, CA 92691 1995.

JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1813-8, 2004.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577-637, 1983.

KHAN, I.; NISAR, M.; KHAN, N.; SAEED, M. *ET AL.* Structural insights to investigate Conyopododiol as a dual cholinesterase inhibitor from *Asparagus adscendens*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1020-1025, 2010.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 11, p. 935-49, 2004.

KIVIPELTO, M.; LAAKSO, M. P.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A. *ET AL.* Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention. **CNS Drugs**, v. 16, n. 7, p. 435-44, 2002.

KIVIPELTO, M.; SOLOMON, A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. **Acta Neurol Scand Suppl**, v. 185, p. 50-7, 2006.

KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. **J Med Chem**, v. 47, n. 3, p. 558-65, 2004.

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

KUBINYI, H. **Hansch Analysis and Related Approaches**. New York: VCH, 1993. 240

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R. *ET AL.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-8, 2007.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **J Appl Crystallogr**, v. 26, p. 283-91, 1993.

LEACH, A. R. **Molecular modeling - principles and applications**. 2^a ed. Hall (England): 2003. 744pp

LEONETTI, F.; CATTO, M.; NICOLOTTI, O.; PISANI, L. *ET AL.* Homo- and hetero-bivalent edrophonium-like ammonium salts as highly potent, dual binding site AChE inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 7450-7456, 2008.

LILL, M. A. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 12, n. 23-24, p. 1013-7, 2007.

LUAN, K.; ROSALES, J. L.; LEE, K. Y. Viewpoint: Crosstalks between neurofibrillary tangles and amyloid plaque formation. **Ageing Res Rev**, 2012.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83-5, 1992.

MAGALHÃES, U. O. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a estudos Físico-Químicos, Farmacocinéticos e Toxicológicos In Silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Leishmanicida**. . Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

MARTINS, I. J.; HONE, E.; FOSTER, J. K.; SUNRAM-LEA, S. I. *ET AL.* Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 8, p. 721-36, 2006.

MASHHADI, H. R.; SHANECHI, H. M.; LUCAS, C. A new genetic algorithm with Lamarckian individual learning for generation scheduling. **Ieee Transactions on Power Systems**, v. 18, p. 1181-1186, 2003.

MCDOWELL, I. Alzheimer's disease: insights from epidemiology. **Ageing (Milano)**, v. 13, n. 3, p. 143-62, 2001.

MEBANE-SIMS, I. 2009 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 5, n. 3, p. 234-70, 2009.

MEEK, P. J.; LIU, Z.; TIAN, L.; WANG, C. Y. *ET AL.* Shape Signatures: speeding up computer aided drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 19-20, p. 895-904, 2006.

MESULAM, M. M. Aging, Alzheimer's Disease and Dementia. . In: MESULAM, M. M. (Ed.). **Principles of behavioral and cognitive neurology**. 2. New York: Oxford University Press, 2000. p.461-462.

MOHS, R. C. The clinical syndrome of Alzheimer's disease: aspects particularly relevant to clinical trials. **Genes Brain Behav**, v. 4, n. 3, p. 129-33, 2005.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R. *ET AL.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function;. **J. Comp. Chem.**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R. *ET AL.* Automated Docking Using a Lamarkian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **J. Comput. Chem**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F. *ET AL.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, n. 16, p. 2785-91, 2009.

MUSIAL, A.; BAJDA, M.; MALAWSKA, B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 25, p. 2654-79, 2007.

NASCIMENTO, É. C. M.; MARTINS, J. B. L.; DOS SANTOS, M. L.; GARGANO, R. Theoretical study of classical acetylcholinesterase inhibitors. **Chemical Physics Letters**, v. 458, n. (4-6), p. 285-289, 2008.

NAWAZ, S. A.; AYAZ, M.; BRANDT, W.; WESSJOHANN, L. A. *ET AL.* Cation-pi and pi-pi stacking interactions allow selective inhibition of butyrylcholinesterase by modified quinine and cinchonidine alkaloids. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 404, n. 4, p. 935-40, 2011.

NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. *ET AL.* Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, p. 41141-7, 2003.

NITRINI, R. Epidemiologia da doença de Alzheimer no Brasil. **Revista de Psiquiatria Clínica , Brasil (USP. Impresso)**, v. v. 26, n. n. 5, p. 262-267, 1999.

OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. **Curr Med Chem**, v. 7, n. 2, p. 141-58, 2000.

PAN, L.; TAN, J. H.; HOU, J. Q.; HUANG, S. L. *ET AL.* Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 18, n. 13, p. 3790-3, 2008.

PERRY, E. K. The cholinergic hypothesis--ten years on. **Br Med Bull**, v. 42, n. 1, p. 63-9, 1986.

PETRELLA, J. R.; COLEMAN, R. E.; DORAISWAMY, P. M. Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future. **Radiology**, v. 226, n. 2, p. 315-36, 2003.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv Protein Chem**, v. 23, p. 283-438, 1968.

RANG, H. P. D., M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2004.

RAYAN, A. New tips for structure prediction by comparative modeling. **Bioinformation**, v. 3, n. 6, p. 263-7, 2009.

RECANATINI, M.; VALENTI, P. Acetylcholinesterase inhibitors as a starting point towards improved Alzheimer's disease therapeutics. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 25, p. 3157-66, 2004.

RICHARD, F.; AMOUYEL, P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol**, v. 412, n. 1, p. 1-12, 2001.

ROBICHAUD, A. J. Approaches to palliative therapies for Alzheimer's disease. **Curr Top Med Chem**, v. 6, n. 6, p. 553-68, 2006.

ROCHA, G. B.; FREIRE, R. O.; SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **J Comput Chem**, v. 27, n. 10, p. 1101-11, 2006.

RODRIGUES, C. R. **Modelagem Molecular de Agentes Antiprotzoários Utilizando Métodos semi-empíricos AM1, Mecânica Molecular e Métodos de QSAR (CoMFA e HQSAR)**. (Doutorado). Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1999.

ROY, K. K.; TOTA, S.; TRIPATHI, T.; CHANDER, S. *ET AL*. Lead optimization studies towards the discovery of novel carbamates as potent AChE inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6313-6320, 2012.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim. Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

SAXENA, A.; FEDORKO, J. M.; VINAYAKA, C. R.; MEDHEKAR, R. *ET AL*. Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept) to cholinesterases. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 22, p. 4447-58, 2003.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 113, n. 11, p. 1625-44, 2006.

SHENGA, R.; LINA, X.; ZHANG, J.; CHOLC, K. S. *ET AL.* Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 6692–6698, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374

SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Rev. Elet. Farm.**, v. 4, n. 1, p. 15-26, 2007.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v. 17, n. 4, p. 355-62, 1993.

SMALL, G.; BULLOCK, R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, v. 7, n. 2, p. 177-84, 2011.

SODERO, A. C. R. **Modelagem Molecular de Aspartil Proteases de Schistosoma mansoni (SmAPs) para o Desenvolvimento de Potenciais Moléculas Esquistossomicidas**. 22 Tese (Doutorado em Ciências). Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz,, Rio de Janeiro. 2011.

SOUZA, A. M. T. **Modelagem Molecular Por Homologia e Estudos de Docking Molecular de Potenciais Alvos Terapêuticos para Doença de Chagas**. 29 Tese (Doutorado em Química). Química orgânica, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2011.

STORN, R.; PRICE, K. Differential evolution - A simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. **Journal of Global Optimization**, v. 11, p. 341-359, 1997.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C. *ET AL.* Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 872-9, 1991.

TANG, H.; WEI, Y. B.; ZHANG, C.; NING, F. X. *ET AL.* Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of oxoisoaporphine and oxoaporphine derivatives as new dual inhibitors of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 6, p. 2523-32, 2009.

TERRY, A. V., JR.; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 3, p. 821-7, 2003.

TERRY, R. D. Dementia. A brief and selective review. **Arch Neurol**, v. 33, n. 1, p. 1-4, 1976.

THOMSEN, R. **Flexible ligand docking using differential evolution**. The 2003 Congress on Evolutionary Computation: 2354-2361 p. 2003.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **J Med Chem**, v. 49, n. 11, p. 3315-21, 2006.

TRIPOS. **HQSAR Manual**. St. Louis, MO 2005.

TUMIATTI, V.; MINARINI, A.; BOLOGNESI, M. L.; MILELLI, A. *ET AL.* Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 17, p. 1825-38, 2010.

VEDANI, A.; DOBLER, M. 5D-QSAR: the key for simulating induced fit? **J Med Chem**, v. 45, n. 11, p. 2139-49, 2002.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W. *ET AL.* Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-23, 2003.

WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. **J Med Chem**, v. 46, n. 12, p. 2287-303, 2003.

WEINER, M. W.; VEITCH, D. P.; AISEN, P. S.; BECKETT, L. A. *ET AL.* The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. **Alzheimers Dement**, v. 8, n. 1 Suppl, p. S1-68, 2012.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-10, 2007.

WINBLAD, B.; FIORAVANTI, M.; DOLEZAL, T.; LOGINA, I. *ET AL.* Therapeutic use of nicergoline. **Clin Drug Investig**, v. 28, n. 9, p. 533-52, 2008.

XU, Y.; COLLETIER, J. P.; WEIK, M.; JIANG, H. *ET AL.* Flexibility of aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase: X-ray versus molecular dynamics. **Biophys J**, v. 95, n. 5, p. 2500-11, 2008.

YAN, H.; PAN, X.; TAN, N.; FAN, J. *ET AL.* 2D- and 3D-QSAR studies on 54 anti-tumor Rubiaceae-type cyclopeptides. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 9, p. 3425-32, 2009.

YE, M.; DAWSON, M. I. Studies of cannabinoid-1 receptor antagonists for the treatment of obesity: hologram QSAR model for biarylpyrazolyl oxadiazole ligands. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 12, p. 3310-5, 2009.

YU, L.; CAO, R.; YI, W.; YAN, Q. *ET AL.* Synthesis of 4-[(diethylamino)methyl]-phenol derivatives as novel cholinesterase inhibitors with selectivity towards butyrylcholinesterase. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 11, p. 3254-8, 2010.

YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **J Chem Inf Model**, v. 48, n. 7, p. 1411-22, 2008.

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

