



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LEANDRO LIMA CASTRO**

**NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS INIBIDORES DA ENZIMA GLICOGÊNIO  
SINTASE QUINASE 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE  
ALZHEIMER UTILIZANDO CÁLCULOS DE MODELAGEM MOLECULAR**

**MACAPÁ**  
**2016**

**LEANDRO LIMA CASTRO**

**NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS INIBIDORES DA ENZIMA GLICOGÊNIO  
SINTASE QUINASE 3- $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE  
ALZHEIMER UTILIZANDO CÁLCULOS DE MODELAGEM MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Concentração em Tecnologia Aplicada a Fármacos.

Orientador: Profa. Dra. Lorane Izabel da Silva  
Hage Melim

**MACAPÁ**  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

616.831

C355n Castro, Leandro Lima.

Novos candidatos a fármacos inibidores da enzima glicogênio sintase quinase 3- $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) no tratamento da doença de Alzheimer utilizando cálculos de modelagem molecular / Leandro Lima Castro; orientador, Lorane Izabel da Silva Hage Melim. -- Macapá, 2016.

110 p.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

**LEANDRO LIMA CASTRO**

**NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS INIBIDORES DA ENZIMA GLICOGÊNIO  
SINTASE QUINASE 3- $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE  
ALZHEIMER UTILIZANDO CÁLCULOS DE MODELAGEM MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Concentração em Tecnologia Aplicada a Fármacos.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Macapá, \_\_\_\_ de Março de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lorane Izabel da Silva Hage Melim  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho  
(Avaliador 1)

---

Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes  
(Avaliador 2)

**À Elaine Aires Castro, amada esposa, pelo apoio nos momentos difíceis, compreensão e pela  
indispensável e inestimável ajuda.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus**, por ter me dado forças e me guiado a fazer esta pesquisa e cuidados constantes na minha vida. Nada seria possível sem Ele.

À minha amada família, onde o apoio nos momentos difíceis foram cruciais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lorane pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal, pelos esclarecimentos, compreensão e principalmente paciência.

Ao Prof. Dr. Cleydson Breno pela ajuda nas metodologias.

Ao Grupo de Pesquisa do Laboratório de Modelagem Molecular – LMMQF/UNIFAP, Abraão, Ricardo, Anderson, Bianca, Karina, Lucilene, Késia, Leide, Neuziane, Laira e Maiara que me ajudaram a tentar decifrar os mistérios da modelagem molecular.

À sociedade, que por meio da UNIFAP, depositaram em mim a confiança para realização desta pesquisa, em que retorno a ela, esta humilde resposta.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença degenerativa e progressiva, sendo o tipo mais comum de demência incidente na população acima dos 60 anos de idade. A estratégia mais aplicada no tratamento de pacientes com DA tem como alvo a via colinérgica, que consiste no uso de drogas com efeito inibitório sobre a função biológica da enzima acetilcolinesterase (AChE). No entanto, esta estratégia é pouco eficaz. A enzima Glicogênio Sintase Quinase  $3\beta$  está relacionada com a hiperfosforilação da proteína tau que desestabiliza microtúbulos celulares e leva em última consequência, a degeneração celular neuronal, sendo um alvo bastante promissor na atualidade, podendo ser mais eficaz do que a alternativa colinérgica vigente. O objetivo deste trabalho foi propor novos candidatos a inibidores da enzima GSK- $3\beta$ . Para isto, 40 inibidores foram selecionados a partir da base de dados BindingDB, ranqueados por  $Cl_{50}$ , em seguida realizaram-se cálculos de modelagem molecular utilizando diversos descritores químico-quânticos selecionados utilizando uma matriz de correlação de Pearson, mapas de potencial eletrostático, orbitais de fronteiras (HOMO e LUMO), busca do perfil farmacofórico, predição de propriedades ADME/Tox, além de simulação por docking e predição de atividade e viabilidade sintética dos novos possíveis inibidores da enzima GSK- $3\beta$ . Para os cálculos de descritores, os parâmetros químico-quânticos, calculados em B3LYP/6-31G\*\*, mais relevantes segundo a correlação de Pearson em função do valor de  $Cl_{50}$  foram: LUMO +1; Moleza Molecular e LogP com valores de 0,4326; 0,4450 e 0,4248, respectivamente. O HOMO do inibidor CID44219658 está no anel imidazol piridina e parte do pirrol e o LUMO está na ligação C-C do anel aromático de seis carbonos. Os valores máximo positivo e negativo de MEPs variaram de 0.101155 ua (CID 6639576) a -0.09879 (CID 44219658). O padrão farmacofórico predito foi de 5 anéis aromáticos, dois aceptores de ligação de hidrogênio, 1 doador de ligação de hidrogênio e uma região positiva. Nenhum inibidor apresentou permeabilidade na barreira hematoencefálica. Dentre os 40 inibidores selecionados, a substância CID 44219658 possui o menor valor de  $Cl_{50}$ , sendo então utilizado como protótipo para propor modificações moleculares, resultando em quatro propostas. Nas predições de propriedades ADME, todas as propostas apresentaram bom perfil de absorção e distribuição. As quatro propostas tiveram valores de  $Pa > Pi$  (Proposta 1:  $Pa = 0,363$ ;

Proposta 2: 0,172; Proposta 3: 0,180 e proposta 4:  $P_a = 0,180$ ), indicando assim a possível atividade biológica para a GSK 3 $\beta$ , além disso, as propostas indicam estruturas de viabilidade sintética média. Diante dos resultados obtidos, a proposta 1 (3-(5-cloro-1-benzofurano-7-il)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona) é possivelmente a mais promissora, indicando a possibilidade de estudo para avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** Modelagem computacional. Inibidores da enzima glicogênio sintetase quinase 3- $\beta$ . Doença de Alzheimer.



## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive degenerative disease, the most common type of dementia incident on the population over 60 years of age. The strategy further applied in the treatment of patients with DA is targeting the cholinergic pathway, which involves the use of drugs with inhibitory effect on the biological function of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). However, this strategy is not very effective. GSK-3 $\beta$  enzyme is associated with hyperphosphorylation of tau protein which destabilizes microtubules in cell and leads ultimately result in neuronal cell degeneration, being a promising target in actuality, may be more effective than current cholinergic alternative. The aim of this study was to propose new candidates to GSK-3 $\beta$  enzyme inhibitors. For this, 40 inhibitors were selected from BindingDB database, molecular modeling calculations using various chemical-quantum descriptors selected using a Pearson correlation matrix, the pharmacophore profile search, screening ADME / Tox, electrostatic potential maps, orbital border (HOMO and LUMO), beyond docking simulation and prediction activity and synthetic feasibility of new potential GSK-3 $\beta$  enzyme inhibitors. In descriptors calculations, the quantum-chemical parameters calculated at B3LYP/6-31G \*\*, more relevant according to Pearson correlation due to the IC<sub>50</sub> value were: LUMO + 1; Softness Molecular and LogP with values of 0.4326; 0.4450 and 0.4248, respectively. The HOMO of CID44219658 inhibitor is in the imidazole pyridine ring and the part of the pyrrole and the LUMO is on the aromatic ring of the C-C bond six carbons. The maximum positive and negative values of MEPs ranged from 0.101155 ua (CID 6639576) at -0.09879 ua (CID 44219658). The pharmacophoric region was expected to 5 aromatic rings, two hydrogen bond acceptor, one hydrogen bond donor and a positive region. No inhibitor showed blood-brain barrier permeability. Among the 40 selected inhibitors, the substance CID 44219658 has the lowest IC<sub>50</sub> value, and then used as a prototype for proposing modifications molecular, they obtained four proposals. The predictions of ADME properties, all proposals had a good profile of absorption and distribution. The four proposals have values of Pa> Pi (Proposal 1: Pa = 0.363, Proposal 2: 0.172; Proposal 3: 0.180 and proposal 4: Pa = 0.180), thus indicating the biological activity for GSK 3 $\beta$ , furthermore, the proposed indicate averages

synthetic accessibility structures. Based on these results, the proposed one (3-(5-chloro-1-benzofuran-7-yl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione) is possibly the most promising, indicating the possibility of study for evaluation of biological activity *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** Computational modeling. Enzyme inhibitors glycogen synthetase kinase 3- $\beta$ . Alzheimer's disease.

## LISTA DE ABREVEATURAS

3D	Tridimensional
$\beta$ A	Beta Amilóide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Asp	Aspartato
Caco-2	Células Derivadas de Adenocarcinoma Do Cólon Humano
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
DA	Doença de Alzheimer
FHP	Filamentos Helicoidais Pareados
GSK -3 $\beta$	Glicogênio Sintase Quinase 3-Beta
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (Orbital molecular Ocupado mais alto)
LogP	Logaritmo Do Coeficiente De Partição Octanol-Água
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (Orbital Molecular não Ocupado mais baixo)
Lys	Lisina
MDCK	Células Madin-Darby de Rim Canino
Pa	Probabilidade De Ser Atividade
Pi	Probabilidade De Ser Inativo
PPA	Pepídeo precursor amilóide
SNC	Sistema Nervoso Central
Val	Valina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Representação das estruturas químicas dos 40 inibidores de GSK-3 $\beta$ selecionados a partir da base de dados BindingDB ordenados pelo $Cl_{50}$ com auxílio de ACD/ChemSketch.....	36
<b>Figura 2 -</b>	Representação do <i>HOMO</i> nos 32 inibidores da GSK-3 $\beta$ .....	44
<b>Figura 3 -</b>	Representação do <i>LUMO</i> nos 32 inibidores da GSK- 3 $\beta$ .....	50
<b>Figura 4 -</b>	Representação dos Mapas de Potencial Eletrostático Molecular dos 32 inibidores de GSK -3 $\beta$ .....	57
<b>Figura 5 -</b>	Melhor modelo farmacofórico alinhado com 32 inibidores de GSK-3 $\beta$ usando o Webservidor PharmaGist.....	63
<b>Figura 6 -</b>	Reprodução de pose cristalográfica do inibidor (Vermelho) e a solução de encaixe melhor classificado (azul). Simulação foi realizada utilizando o software AutoDock Vina 1.5.6.....	67
<b>Figura 7 -</b>	Soluções de encaixe para os inibidores e suas interações com o sítio ativo de GSK-3 $\beta$ : ligações de hidrogênio convencionais (verde), ligações de hidrogênio não-convencionais (azul) e interações hidrofóbicas (rosa). As simulações foram realizadas utilizando o software AutoDock Vina 1.5.6.....	68
<b>Figura 8 -</b>	Protótipo e Propostas a inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Nomes químicos dos inibidores selecionados.....	40
<b>Tabela 2 -</b>	Cálculos de energia total, EHOMO, EHOMO-1, ELUMO+1, gap energy, moleza molecular, potencial químico, energia de hidratação e LogP no nível B3LYP/6-31G** e a respectiva matriz de correlação de Pearson.....	43
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetros físico-químicos relacionados com RO5 para seleção de inibidores da GSK-3 $\beta$ ranqueados de forma crescente de Cl <sub>50</sub> .....	65
<b>Tabela 4 -</b>	Análise do resultado do Docking Molecular gerado pelo AutoDock Vina.....	74
<b>Tabela 5 -</b>	Propriedades de absorção dos 40 inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	81
<b>Tabela 6 -</b>	Propriedades de distribuição em percentagem de PPB e penetração na barreira hematoencefálica dos inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	84
<b>Tabela 7 -</b>	Propriedades toxicológicas de mutagenicidade (Ames teste) e carcinogenicidade (camundongo e rato) e bloqueadoras dos canais tipo hERG dos 40 inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	88
<b>Tabela 8 -</b>	Predição de atividade biológica para candidatos a inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	91
<b>Tabela 9 -</b>	Propriedades de absorção das propostas de inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	92
<b>Tabela 10 -</b>	Propriedades de distribuição em percentagem de PPB e penetração na barreira hematoencefálica das propostas de inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	93
<b>Tabela 11 -</b>	Propriedades toxicológicas de mutagenicidade (Ames teste) e carcinogenicidade (camundongo e rato) e bloqueadores dos canais tipo hERG das propostas de inibidores de GSK-3 $\beta$ .....	94

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>OBJETIVO</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
3.1	FISIOPATOLOGIA.....	18
3.2	SINTOMATOLOGIA.....	22
3.3	DIAGNÓSTICO.....	23
3.4	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	24
3.5	TRATAMENTO NÃO FARMACOLÓGICO.....	26
3.6	MODELAGEM COMPUTACIONAL.....	27
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	BUSCA PELAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES.....	30
4.2	DESCRITORES DE REATIVIDADE GLOBAL.....	30
4.3	DESCRITORES DE RELAÇÃO QUANTITATIVA ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE.....	31
4.4	CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE DADOS E SELEÇÃO DE PROPRIEDADES MOLECULARES.....	31
4.5	MAPAS DE PONTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEP).....	32
4.6	DERIVAÇÃO DO FARMACÓFORO.....	32
4.7	BUSCA PELA ESTRUTURA DA PROTEÍNA.....	33
4.8	SIMULAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR.....	33
4.9	ADME/TOX SCREENING.....	34
4.10	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, PREDIÇÃO DE ATIVIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA.....	34
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
5.1	INIBIDORES ESTUDADOS.....	36
5.2	MODELAGEM MOLECULAR DOS INIBIDORES ESTUDADOS E CÁLCULOS DE DESCRITORES.....	42
5.2.1	<b>Análise Estatística De Descritores Químico – Quânticos E Descritores De Relação Quantitativa Estrutura Atividade</b> .....	42

5.3	MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEPS).....	56
5.4	DERIVAÇÃO DO FARMACÓFORO.....	62
5.5	PROPRIEDADES FÍSICO – QUÍMICAS – PARÂMETROS DE LIPINSKI.....	63
5.6	DOCKING MOLECULAR.....	67
5.7	ADME/TOX SCREENING.....	79
5.8	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, PREDIÇÃO DE ATIVIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA.....	89
5.9	PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADME/TOX PARA AS PROPOSTAS.....	92
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA), sem dúvida, é a patologia neurodegenerativa mais frequente associada à idade. Seu perfil crônico e degenerativo acarreta inúmeras incapacidades que vão desde as físicas quanto as mentais.

A DA se tornou um dos maiores focos de pesquisa nos tempos atuais, devido principalmente ao seu caráter crônico-degenerativo, causando incapacidades irreversíveis, aliado a baixa eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis. Infelizmente, o arsenal terapêutico usado na DA é pouco eficaz e causa diversos efeitos adversos tornando-o praticamente ineficaz ao longo de uma fase mais tardia da doença, já que os riscos passam a superar os benefícios. Isso se dá, por causa da reduzida estratégia terapêutica que se pode adotar atualmente, a qual se faz através de apenas um único mecanismo farmacodinâmico, conhecido como abordagem anticolinesterásica (iACN). Diante disso, é imperativo ampliar as abordagens, e dentre elas, destacam-se as que têm o foco no mecanismo fisiopatológico da doença, trazendo desta forma, alternativas ao tratamento e qualidade de vida para milhões de pessoas que sofrem dessa doença.

Há, atualmente, diversas pesquisas em andamento que levam em consideração a hipótese da cascata amiloide que continua sendo a principal via fisiopatogênica de DA. No entanto, uma outra abordagem fisiopatológica promissora diz respeito a inibição da enzima glicogênio sintase quinase  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ). Esta enzima está envolvida no mecanismo fisiopatogênico primário da DA.

Dentre as várias metodologias de pesquisa de desenvolvimento de fármacos existentes, pode-se citar as tecnologias *in silico*, as quais utilizam a computação ou bioinformática a fim de prever propriedades de potenciais moléculas bioativas e promover perfis farmacocinéticos e químicos adequados para se tornarem futuros medicamentos. Essas tecnologias vêm se tornando cada vez mais robustas e uma das ferramentas mais poderosas de avaliação pré-clínica e de substituição dos polêmicos e famigerados modelos *in vivo*, as quais utilizam animais com finalidade de geração de resultados que podem servir para posterior uso em humanos, indo ao encontro das propostas de



metas mundialmente recomendadas que são conhecidos como programa dos 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), que significa reduzir, refinar e substituir.

Enfim, grandes esforços têm sido realizados para a compreensão e tratamento da doença de Alzheimer e este trabalho é um exemplo disto, pois a relevância desta pesquisa se justifica pela elaboração de novas moléculas por meio da modelagem computacional que podem ser possíveis inibidores da enzima GSK –  $3\beta$  a qual está envolvida no processo etiológico primário da doença que atua de forma corroborativa com a via amiloide na DA, sendo uma opção muito promissora dentro de uma perspectiva terapêutica medicamentosa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Propor novos candidatos a fármacos inibidores da enzima glicogênio sintase quinase 3- $\beta$  no tratamento da Doença de Alzheimer utilizando cálculos de modelagem molecular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Modelar os inibidores descritos na literatura com atividade inibitória da enzima glicogênio sintase quinase 3- $\beta$  utilizando cálculos químico-quântico com o método da teoria funcional de densidade (*Density functional theory*–DFT) e conjunto de base valência separada B3LYP/6-31G\*\*;
- b) Calcular descritores de reatividade global e de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR);
- c) Construir os orbitais de fronteiras (HOMO e LUMO) para fornecer informações sobre o caráter elétron-doador e/ou elétron-aceitador dos inibidores estudados;
- d) Construir a matriz de dados com as propriedades moleculares calculadas e aplicar a correlação de Pearson dos inibidores estudados;
- e) Construir os mapas de potencial eletrostático a partir das cargas atômicas e avaliar de forma qualitativa as regiões farmacofóricas dos inibidores estudados;
- f) Derivar o padrão farmacofórico para o grupo de inibidores identificados na literatura com atividade inibitória da enzima glicogênio sintase quinase 3- $\beta$ ;
- g) Simular por *docking* a ligação entre os inibidores identificados na literatura e a enzima glicogênio sintase quinase 3- $\beta$ ;
- h) Obter as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos inibidores rastreados da literatura e das novas propostas;
- i) Propor modificações no inibidor protótipo a fim de propor novas propostas possivelmente mais promissoras;
- j) Predizer atividade e viabilidade sintética dos novos candidatos a fármacos para a doença de Alzheimer.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1907, pelo psiquiatra e neuropatologista Alemão Alois Alzheimer, definindo sua descoberta como uma patologia neurológica, não reconhecida, que cursava com demência, destacando os sintomas de déficit de memória (BONUCCELLI et al., 2011).

A DA é a principal causa de demência e é caracterizada por um declínio progressivo da função cognitiva, que tipicamente se inicia com a deterioração da memória (MAYEUX; STERN, 2012).

Dentre os principais fatores de risco correlacionados com a ocorrência da DA, situam-se a idade e a predisposição genética. Observa-se, entretanto, que a maioria dos casos de DA são esporádicos. Apenas 5% dos pacientes têm a Doença de Alzheimer Familiar (DAF), uma forma incomum que tende a ocorrer mais cedo, e está relacionada com mutações em diversos genes, tais como o gene codificador da proteína precursora de amiloide – APP, da presinilina 1 (PS1) e 2 (PS2) e da apolipoproteína E (ApoE) (DIAS NETO et al., 2013).

A prevalência de DA aumenta progressivamente com o envelhecimento, sendo a idade o maior fator de risco para a doença. A partir dos 65 anos, sua prevalência dobra a cada cinco anos. Entre 60 e 64 anos apresenta prevalência de 0,7%, passando por 5,6% entre 70 e 79 anos, e chegando a 38,6% nos nonagenários (APRAHAMIAN; MARTINELLI; YASSUDA, 2009).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o mundo vem enfrentando um envelhecimento progressivo de sua população. Em 1950, havia 214 milhões de pessoas com 60 anos ou mais e as estimativas indicam que serão 1 bilhão em 2025. No Brasil, está cada vez mais evidente o envelhecimento populacional, aumentando a suscetibilidade destas pessoas às mais diversas formas de demências. A expectativa de vida aumenta rapidamente e projeções indicam que em 2025 o Brasil terá cerca de 34 milhões de pessoas acima de 60 anos, ou seja, 10% da população, sendo o país com a sexta maior população de idosos em todo o mundo (IBGE, 2014).

Devido ao rápido envelhecimento da população mundial, é esperado que a prevalência de DA duplique a cada 20 anos. Assim, estima-se que em 2050, 115 milhões de pessoas vão estar afetadas pela doença (AMBROZ et al., 2012).

### 3.1 FISIOPATOLOGIA

A DA caracteriza-se, histopatologicamente, pela maciça perda sináptica e pela morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (SELKOE, 2001; VINTERS, 2015).

As características histopatológicas presentes no parênquima cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer incluem depósitos fibrilares amiloidais localizados nas paredes dos vasos sanguíneos, associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau e consequente formação de novos neurofibrilares (NFT), perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação (SELKOE, 2001; VINTERS, 2015).

Duas hipóteses principais foram propostas, a fim de explicar a etiologia da doença. De acordo com a hipótese da cascata amiloida, a neurodegeneração na DA inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição da substância  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) e placas senis (HARDY; SELKOE, 2002; EKAVALI; KUMAR; SINGH, 2015). A outra é a hipótese colinérgica, onde a disfunção do sistema colinérgico é suficiente para produzir uma deficiência de memória em modelos animais, a qual é semelhante à doença de Alzheimer, além do mais, cérebros de pacientes portadores da doença de Alzheimer mostraram degeneração dos neurônios colinérgicos, ocorrendo também uma redução dos marcadores colinérgicos, sendo que a colina acetiltransferase e a acetilcolinesterase tiveram sua atividade reduzida no córtex cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer (BARTUS; EMERICH, 1999).

Na Hipótese da Cascata Amiloide as placas senis são formadas através do acúmulo e da agregação do peptídeo  $\beta$ A, formando neuritos distróficos, astrócitos reativos e microglia ativada. Acredita-se que a concentração de placas neuríticas esteja relacionada ao grau de demência dos afetados. O peptídeo  $\beta$ A é o principal componente das placas senis, e é produzido por ação de endoproteases (secretases) da membrana glicoproteica, a partir da APP, codificada por um gene localizado no cromossomo 21 (WONG, 2011; EKAVALI; KUMAR; SINGH, 2015). Fragmentos de tamanhos específicos deste peptídeo formam agregados fibrilares não-covalentes insolúveis, característicos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que

depositam-se no tecido neuronal e estão relacionados à neurotoxicidade da DA (ALIEV et al., 2013).

O  $\beta$ A é derivado por clivagem proteolítica da APP pela ação de beta e gama secretases. Em condições normais, o  $\beta$ A é degradado por enzimas e retirado do encéfalo através de um balanço entre efluxo e influxo, mediados pela proteína receptora de LDL e receptores para produtos finais de glicosilação avançada. Na DA, um desbalanço entre a produção e o *clearance* do  $\beta$ A levam ao depósito de oligômeros deste peptídeo (em especial  $\beta$ A 42) no espaço extracelular, ocasionando inibição do potencial de longa duração hipocampal e da plasticidade sináptica (NASLUND, 2000; DE STROOPER; KARRAN; MERCKEN, 2011; WONG, 2011; BORN, 2015).

As secretases são enzimas responsáveis pelo processo proteolítico normal da APP, levando à formação de fragmentos  $\beta$ A. Dependendo do sítio de proteólise, estas enzimas são classificadas em  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases. As  $\alpha$ -secretases são, provavelmente, fixadas à membrana plasmática e clivam a APP entre os resíduos 16 e 17 da sequência do  $\beta$ A, gerando fragmentos extracelulares solúveis conhecidos como sAPP $\alpha$ , que são normalmente fagocitados pelas microglias e eliminados. Portanto, a quebra da APP por  $\alpha$ -secretases inibe a formação de depósitos de  $\beta$ A e constitui a maior rota fisiológica de quebra desta proteína (ANGOSTO; GONZÁLEZ, 2009).

Os emaranhados neurofibrilares são formados pela deposição de proteína Tau, sendo sua principal função estabilizar os microtúbulos responsáveis em organizar a função neuronal (ALLARD et al., 2012). A proteína tau do citoesqueleto pode ser fosforilada em mais de 39 locais por várias quinases e estudos recentes *in vivo* sugerem fortemente que a GSK-3 $\beta$  é um fator crítico na hiperfosforilação da proteína tau (PETIT-PAITEL, 2010; ADLARD et al., 2011).

Proteína tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (*microtubule-associated proteins* - MAP). A principal função das MAPs é estabilizar os microtúbulos pela agregação da tubulina 12. O gene da proteína Tau humana está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21) e possui 16 éxons. No cérebro humano, a Tau é uma proteína solúvel, apresentando-se em seis isoformas derivadas do splicing alternativo de RNAm e compostas por 352-441 resíduos de

aminoácidos com peso molecular aproximado de 37 a 46 KDa. (GOEDERT, 2004; ENGEL; ITTNER; MUNOZ; OOI, 2015).

No cérebro adulto, todas as isoformas da Tau são expressas. A relação entre as isoformas 3R e 4R da Tau é geralmente de 1:1, visto que alterações nessa razão estão relacionadas a certos mecanismos de neurodegeneração (LIU; WANG, 2008).

Em células nervosas saudáveis, a proteína Tau é normalmente encontrada nos axônios, ao contrário dos achados descritos nas tauopatias, em que a proteína encontra-se distribuída no corpo celular e nos dendritos. A proteína Tau pode ser encontrada na forma solúvel ou insolúvel; esta última é identificada nos filamentos helicoidais pareados (FHP), que é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares. Os FHPs apresentam de seis a oito grupos fosfato por molécula de proteína Tau, o que, em comparação com o grau de fosforilação usual da proteína Tau em cérebros saudáveis (em torno de dois grupos fosfato por molécula), permite afirmar que a proteína Tau identificada nos FHPs encontra-se em estado hiperfosforilado (BRANDT; HUNDELT; SHAHANI, 2005; BORN, 2015).

A proteína Tau controla a dinâmica dos microtúbulos durante a maturação e o crescimento dos neuritos. Sendo a maior proteína do citoesqueleto, a hiperfosforilação da Tau afeta funções biológicas e morfológicas nos neurônios (HARRINGTON; STOREY; WISCHIK, 2014).

Desta forma, a hiperfosforilação anormal da proteína Tau pode ser o resultado do aumento da atividade das tauquinases, da subsensibilização das suas fosfatases ou de ambos os mecanismos (HARRINGTON; STOREY; WISCHIK, 2014). Em humanos com tauopatias, a proteína Tau está presente na forma de filamentos anormais insolúvel e hiperfosforilados (BRANDT; HUNDELT; SHAHANI, 2005; KRÜGER; MANDELKOW, 2016). Diversas doenças têm em comum a presença de grandes quantidades de agregados de proteína Tau (MATHURANATH; ROBERT, 2007).

Vários estudos demonstraram que a hiperfosforilação reduz a capacidade de a Tau estabilizar os microtúbulos. Isso compromete a dinâmica microtubular, afetando o transporte intraneuronal, resultando em efeitos deletérios sobre diversos processos celulares. Todos os defeitos na proteína Tau alteram o transporte axonal, fatores vitais e necessários para a manutenção da homeostase neuronal. A

hiperfosforilação da Tau favorece a formação de agregados, bloqueando o tráfego intracelular de proteínas neurotróficas e outras proteínas funcionais, e resultando em perda ou declínio no transporte axonal ou dendrítico nos neurônios (LIU; WANG, 2008; PEDERSEN; SIGURDSSON, 2015).

Nos tecidos cerebrais, o estado de fosforilação da Tau resulta da ação conjunta de várias quinases e fosfatases, muitas das quais operam coordenadamente para regular sua fosforilação (MATHURANATH; ROBERT, 2007; BAIRD; LOVESTONE; WESTWOOD, 2015). Estas hiperfosforilações são consequência da ação da Glicogênio-sintase-quinase-3 (GSK-3), a qual é uma serina/treonina quinase que foi nomeada após o seu envolvimento no metabolismo do glicogênio. E tem-se demonstrado que a GSK-3 é uma quinase multifuncional com um papel crítico na formação da neurodegeneração e da memória (COHEN; FRAME, 2001; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2008).

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr) (COX; LEHNINGER; NELSON, 2011).

Existem duas isoformas muito semelhantes a GSK-3, GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ , que são codificadas por genes distintos. Na idade adulta, a GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  são mais proeminentemente expressa no cérebro com particular abundância no hipocampo, neocórtex, e cerebelo (GIESE, 2009). GSK-3 $\beta$  participa de uma variedade de processos fisiológicos, tais como a regulação da morfologia celular, crescimento neuronal e motilidade e plasticidade sináptica e integra uma variedade de intracelulares e extracelulares vias, incluindo a sinalização wnt, a via da insulina, acoplado à proteína G de receptores e outras (ANGELO; GIESE; PLATTNER, 2005). O aumento na atividade de GSK-3 $\beta$  por fosforilação reguladora de resíduos de Ser9 e Tyr216 (fosforilação de Tyr216 pode aumentar a atividade da enzima, e por outro lado a fosforilação de Ser9 é inibidora) parece ser o ponto focal de numerosas vias de sinalização patológicas e a sinalização anormal de GSK-3 pode também ocorrer em outras doenças neurodegenerativas, tais como as tauopatias, doença de Pick, paralisia supranuclear progressiva e degeneração córtico-basal (ADLARD et al., 2011). Com efeito, ela está envolvida na regulação das duas principais

características neuropatológicas presentes nos cérebros de pacientes com DA (emaranhados neurofibrilares e placas amiloides) (PETIT-PAITEL, 2010).

Como pode-se observar, a DA é caracterizada por diversas alterações histopatológicas e neurofisiológicas, a presença de placas amiloides extracelulares, constituídas de depósitos amorfos de proteína  $\beta$ A e de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, constituídos de filamentos de uma proteína fosforilada associada a microtúbulos, a proteína tau, têm sido considerados os principais achados histopatológicos da DA, sendo os mesmos frequentemente relacionados à gravidade da doença (HARRINGTON; STOREY; WISCHIK, 2014).

Pesquisas apontam outro fator tão importante no mecanismo fisiopatológico como a conhecida via amiloide. Este fator é conhecido como ligantes Ap derivado difusíveis (*ADDLs*). *ADDLs* são potentes Ap 1-42 neurotoxinas que não são fibrilares. Em vez de fibrilas, a sua estrutura compreende relativamente pequenos oligômeros globulares solúveis (KLEIN et al., 2011).

*ADDLs* podem causar primeiramente perda de memória em estágio inicial, posteriormente, degeneração do nervo e morte celular, levando muitas das vezes a sintomatologia clássica de DA, independentemente de presença de placas  $\beta$ -amiloide e FHPs (CALEB, 2003; KLEIN et al., 2011).

### 3.2 SINTOMATOLOGIA

O possível diagnóstico etiológico desta enfermidade depende de fatores como o tempo de evolução em anos e também a ordem em que as funções cognitivas vão sendo perdidas. Inicialmente, observa-se o agravo da memória anterógrada e do senso localizatório. Posteriormente, ocorrem a perda da praxia ideomotora, que é a incapacidade de repetir e executar gestos, e a perda construcional, que é a inabilidade em operar instrumentos, vestir-se, comer e copiar figuras e etc. Além disso, observam-se ainda graus de acalculia, afasia (principalmente anomia) e agnosia. Nas fases mais avançadas da enfermidade podem sobrevir completa apatia, incapacidade de deambular, convulsões e, por fim, o coma e óbito por causas não relacionadas à enfermidade primária (BOWEN et al., 1998).

A DA pode ser dividida em três fases – leve, moderada e grave – de acordo com o nível de comprometimento cognitivo e o grau de dependência do indivíduo (ALVAREZ et al., 2002).



Na fase leve da doença, a pessoa apresenta uma queda significativa no desempenho de tarefas instrumentais da vida diária, contudo ainda é capaz de executar as atividades básicas do dia a dia, mantendo-se independente. Na fase moderada, o comprometimento intelectual é maior e o paciente passa a necessitar de assistência para realizar tanto as atividades instrumentais como as atividades básicas. Já na fase grave da doença, o paciente geralmente fica acamado e necessitando de assistência integral. Nessa fase, o paciente pode apresentar dificuldades de deglutição, sinais neurológicos, incontinência urinária e fecal (ANGHINAH, 2005).

### 3.3 DIAGNÓSTICO

Na prática, o diagnóstico clínico da DA é feito quando os pacientes têm declínio progressivo da memória por um período superior a seis meses com consequente deterioração da saúde pessoal e das funções sociais ou ocupacionais. A presença objetiva de deterioração da memória deve ser documentada através de recurso ao MMSE (Mini-mental state examination) que permite avaliar a orientação temporal e espacial, a memória imediata e de evocação, a capacidade de cálculo e atenção, a linguagem, a habilidade de seguir comandos verbais e escritos e apraxia, além de outros testes neuropsicológicos (CHU, 2012).

Além de testes mais simples como os mencionados para triagem inicial e avaliação mais breve, há exames neuropsicométricos mais abrangentes como os critérios preestabelecidos mais utilizados no diagnóstico de Alzheimer que são o do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais da Associação de Psiquiatria Americana versões III-R e IV (DSM, 1994), e o proposto pelo National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) (DRACHMAN et al., 1984). O exame físico visa identificar déficits neurológicos focais, como paresias e parestesias, sinais de hidrocefalia, como alteração de marcha e incontinência urinária, alterações na motricidade, lentificação e tremores sugestivos de parkinsonismo, sinais de hipotireoidismo, entre outras alterações consistentes com os diagnósticos diferenciais mais comuns com a demência do tipo Alzheimer (APRAHAMIAN; MATINELLI; YASSUDA, 2009).

Outros pontos diagnósticos essenciais incluem déficit em duas ou mais áreas de cognição, ausência de perturbações da consciência, início da doença entre os 40 e os 90 anos de idade, ausência de doenças sistêmicas ou outras doenças cerebrais que possam ser responsáveis pelo déficit progressivo da memória e da cognição, evidência de atrofia cerebral à TAC (Tomografia Axial Computadorizada) ou à RMN (Ressonância Magnética Nuclear), sem outras lesões orgânicas significativas e ausência de doença metabólica (CHU, 2012).

O diagnóstico definitivo, entretanto, é obtido apenas após análise histopatológica de materiais de autópsia. Tal análise revela perda neuronal nas camadas piramidais do córtex cerebral e degenerações sinápticas intensas, tanto em nível hipocampal quanto neocortical, além de identificar os depósitos extracelulares do peptídeo beta-amiloide ( $\beta A$ ), as placas neuríticas ou senis e os emaranhados neurofibrilares – ENF intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada (CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; JESSEN; WAGNER, 2015).

### 3.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Os inibidores das colinesterases (I-ChE) são as principais drogas hoje licenciadas para o tratamento específico da DA. Seu uso se baseia no déficit colinérgico que ocorre na doença, e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, através da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil e a butirilcolinesterase (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os inibidores da acetilcolinesterase (tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina (enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (GROSSBERG, 2003; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A galantamina, fármaco de origem vegetal, também é um anticolinesterásico utilizado no tratamento da DA. Esse medicamento possui um duplo mecanismo de ação, o qual, além de inibir a acetilcolinesterase, também foi capaz de modular alostericamente os receptores nicotínicos. O papel dos receptores nicotínicos na cognição é bastante conhecido, entretanto, o significado clínico da modulação nicotínica no tratamento da DA não está completamente elucidado. Os receptores

nicotínicos pré-sinápticos controlam a liberação de neurotransmissores, os quais são importantes para a memória e para o humor (SERENIKI; VITAL, 2008.)

Revisão sistemática e metanálise concluíram que as melhoras determinadas por inibidores da colinesterase são pequenas, não tendo sido estabelecida sua transposição para reais benefícios na vida (HOBLYN et al., 2003; CLEGG et al., 2006).

A memantina é utilizada como coadjuvante aos inibidores de colinesterase para tratar DA e também é usada frequentemente para tratar outras demências neurodegenerativas. A memantina é um antagonista não competitivo do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), e interage com o sítio de ligação do  $Mg^{2+}$  no canal do receptor de forma a impedir a ativação excessiva e, ao mesmo tempo, preservar a função normal (BRUNTON; HILAL-DANDAN, 2008). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório cerebral, particularmente em regiões associadas às funções cognitivas e à memória, tais como o córtex temporal e o hipocampo. O glutamato também age como uma excitotoxina, causando a morte neuronal quando níveis elevados desse neurotransmissor são liberados por períodos prolongados. As regiões corticais e subcorticais que contêm neurônios e receptores glutamatérgico sofrem perdas estruturais e funcionais na evolução da DA (ARONSON; GRAHAME-SMITH, 2004).

Constatou-se modesta melhora de funções cognitivas e funcionais, humor, comportamento e impressão clínica com memantina usada por seis semanas para tratamento de DA de moderada a severa, demência vascular e mista (AREOSA SASTRE; SHERRIFF; MCSHANE, 2005.)

Medicamentos derivados de plantas também são muito estudados no tratamento de DA, por exemplo, o extrato de *Ginkgo biloba*, EGb761, que contém glicosídeos de ginkgoflavonas e terpenoides, cuja ação combinada promove o aumento do suprimento sanguíneo cerebral por vasodilatação e redução da viscosidade do sangue, além de reduzir a densidade de radicais livres de oxigênio nos tecidos nervosos (LUO, 2001). Apesar disso, de acordo com uma revisão recente de 36 ensaios clínicos aleatorizados dos quais nove com duração de pelo menos seis meses (2016 pacientes), os benefícios do EGb761 para o tratamento do comprometimento cognitivo e da demência da DA foram incertos e inconsistentes (BIRKS; EVANS, 2009).

As práticas farmacológicas até agora introduzidas no tratamento da DA têm tido eficácia sintomática, não havendo qualquer agente disponível capaz de interferir sobre a etiopatogenia das demências em geral ou impedir a progressão da doença. Também não são isentos de efeitos adversos e têm potencial para interação com outros medicamentos (WANNMACHER, 2005).

Além do mais, terapias daquele tipo são preocupantes em idosos, onde a incidência da doença é maior e, são mais suscetíveis a riscos medicamentosos e mais frequentemente em uso de polifarmácia (ROZENFELD, 2003).

### 3.5 TRATAMENTO NÃO FARMACOLÓGICO

O tratamento multidisciplinar objetiva complementar o tratamento farmacológico na DA. A literatura descreve grande variedade de métodos de intervenção para melhorar ou manter o desempenho cognitivo na mesma. Entre as principais técnicas que envolvem trabalho multidisciplinar destacam-se: treinamento cognitivo, técnica para melhor estruturação do ambiente, orientação nutricional, programas de exercícios físicos, orientação e suporte psicológico aos familiares e cuidadores (ALVAREZ et al., 2002).

Existem ainda, abordagens nutricionais que visam retardar a progressão da doença, assim como diminuir a sintomatologia, já que o acometimento nutricional na DA pode levar a desnutrição e conseqüentemente maior progressão da doença, diminuindo a sobrevida ou simplesmente aumentando a sintomatologia (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005; JICHA; SWAMINATHAN, 2014).

O exercício físico também apresenta contribuições importantes, sobretudo quando associado ao tratamento psicofarmacológico, auxiliando na recuperação da autoestima e da autoconfiança, além de ser considerada como uma alternativa não farmacológica de tratamento do transtorno depressivo, por representar baixo custo econômico, ser acessível e prevenir o declínio funcional do idoso (COSTA et al., 2010). Metanálise de 30 ensaios clínicos randomizados avaliou o benefício do exercício físico em 2020 pessoas com mais de 65 anos, demência ou outros déficits cognitivos. Houve melhora significativa de capacidade física, desempenho funcional, função cognitiva e comportamento em relação aos indivíduos de grupos sem exercício (ABREU; HEYN; OTTENBACHER, 2004).

### 3.6 MODELAGEM COMPUTACIONAL

Um dos mais importantes avanços no planejamento e descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular. Ela tem se firmado como uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de um protótipo já existente ou obtido pelo próprio estudo de modelagem molecular (ESSEX; JEWSBURY; TAYLOR, 2002).

A modelagem molecular fornece informações importantes para o processo de descoberta de fármacos. Ela permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com o receptor (ALBUQUERQUE et al., 1997; PATRICK, 2001).

Devido à rápida evolução nas áreas de hardware, software e métodos, os processos computacionais anteriormente executados exclusivamente em estações de trabalho de alto desempenho são hoje em dia realizados em microcomputadores numa escala de tempo bastante razoável (JENWITHEESUK et al., 2008).

Um programa de modelagem molecular permite a representação, visualização, manipulação e determinação de parâmetros geométricos (comprimento e ângulo de ligação) e eletrônicos (energia dos orbitais de fronteira, momento de dipolo, potencial de ionização etc.) de uma molécula isolada, além de realizar estudos em macromoléculas (proteínas) e complexos droga–receptor. A grande maioria dos programas de modelagem molecular é capaz de retratar entidades químicas com um alto grau de precisão. Esta afirmação é oriunda de estudos comparativos de parâmetros eletrônicos e geométricos obtidos experimentalmente. Os métodos mais empregados para a obtenção de propriedades moleculares são: a mecânica molecular e os métodos semi-empíricos (ALBUQUERQUE et al., 1997; SANT'ANNA, 2009).

As interações de um fármaco com seu receptor biológico são determinadas por forças intermoleculares, ou seja, interações lipofílicas, polares, eletrostáticas e estéricas. Assim sendo, substâncias que apresentam propriedades terapêuticas, ao interagirem com um alvo específico (uma enzima, um receptor, um canal de íons, um ácido nucleico ou qualquer outra macromolécula biológica), devem possuir uma estrutura tridimensional de forma que as disposições de seus grupos funcionais favoreçam uma maior complementaridade ao sítio de ligação (ARROIO; DA SILVA; HONÓRIO, 2010).

A química medicinal além da descoberta de moléculas bioativas, também estuda os fenômenos envolvidos no metabolismo e o estabelecimento de relações entre a estrutura química e atividade (SAR, do inglês, *structure activity relationships*). Nesse sentido, destacam-se também os métodos de QSAR (do inglês, *quantitative structure-activity relationships*) que têm como objetivos relacionar a informação em conjuntos de dados (estrutura química e atividade biológica) e criar modelos estatísticos com capacidade preditiva externa (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006).

Os estudos de SAR e de QSAR são importantes para guiar a síntese de novas moléculas com propriedades otimizadas, minimizando o universo de compostos a serem considerados nos programas de triagem biológica. (JENWITHEESUK et al., 2008).

O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*). Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos. Em muitos casos, o uso integrado de estratégias de SBDD e LBDD pode gerar informações úteis no planejamento de novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*), por meio da sinergia e complementaridade de conhecimentos entre as estratégias (ABRAHAM; ANDRICOPULO; SALUM, 2009).

Um dos grandes desafios da química medicinal no processo de planejamento de fármacos é contribuir para o aumento da taxa de sucesso na descoberta de NCE. A integração de métodos experimentais e computacionais tem enorme importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas bioativas a partir de coleções de compostos reais ou virtuais. Nesse âmbito, as estratégias de SBDD e LBDD assumem natural destaque (ANDRICOPULO; GUIDO; OLIVA, 2008).

Os métodos de SBDD se baseiam no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo, utilizam como pré-requisito dados 3D detalhados da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de

estruturas cristalográficas, de RMN ou de modelagem por homologia (ANDRICOPULO; SALUM, 2009).

A docagem molecular (do inglês molecular docking) é uma das principais estratégias de SBDD, que consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (proteína-alvo), seguido da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

A triagem virtual baseada na estrutura do receptor (SBVS, do inglês structure based virtual screening) emprega métodos de docagem molecular na análise de grandes bases de dados de compostos com o objetivo de caracterizar um espaço químico-biológico privilegiado e permitir a seleção de compostos para testes bioquímicos e/ou biológicos (ESSEX; JEWSBURY; TAYLOR, 2002; SANT'ANNA, 2009).

Enfim, o progresso no desenvolvimento de softwares e hardwares aliado a uma redução constante de custo dos materiais informáticos, torna a química computacional uma das áreas mais promissoras deste novo século, onde a disponibilização e aperfeiçoamento de programas computacionais de química e dos bancos de dados em rede constituem – se como ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos fazendo com que novos agentes terapêuticos possam ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional, obtidos por técnicas de modelagem molecular atendendo desta maneira, um dos grandes desafios da química medicinal, que é contribuir para o aumento da taxa de sucesso na descoberta de novas entidades químicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 BUSCA PELAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES

As estruturas 3D dos 40 inibidores com atividade para a enzima GSK-3 $\beta$  descritos na literatura foram obtidas no site de banco de dados **BindingDB** ([www.bindingdb.org/bind/index.jsp](http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)), utilizando a palavra-chave “glycogen synthase kinase 3 beta inhibitor”. Após realizar o *download* dos arquivos com as estruturas de todos os inibidores, as mesmas foram reorganizadas com auxílio do programa livre ACD/ChemSketch. Em seguida foram tabelados em ordem crescente do valor de  $Cl_{50}$ , acrescentando os parâmetros físico-químicos, obtidos a partir do Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), relacionados à regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997).

### 4.2 DESCRITORES DE REATIVIDADE GLOBAL

Todas as estruturas químicas tiveram suas energias minimizadas através do programa **HyperChem** 6.02 (CHEMPLUS, 2000) por métodos químico-quânticos do tipo semiempírico RM1 (Recife Model 1), uma reparametrização de AM1 (Austin Model 1), representando uma melhoria em relação a este (FREIRE; ROCHA; SIMAS; STEWART, 2006). Todas as estruturas foram calculadas na forma neutra, no vácuo e sem qualquer restrição geométrica. Nesse estudo, foram calculados, com o auxílio do programa **GaussView 5.0** (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2009), usando o conjunto de base B3LYP/6-31G\*\* implementado com o programa **Gaussian 03** (FRISCH et al., 2003) e o método Teoria do Funcional da Densidade (DFT), 23 descritores de reatividade: energia total (ET), eletronegatividade de Mulliken ( $\chi$ ), dureza molecular ( $\eta$ ), moleza molecular ( $1 / \eta$ ), potencial químico ( $\mu$ ), índice eletrofilicidade global ( $\omega$ ), Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia (HOMO), um nível abaixo do Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia (HOMO-1), Energia do Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia (LUMO), um nível acima Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia (LUMO +1), diferença de energia entre HOMO e LUMO (GAP = HOMO-LUMO) estes descritores são



indicadores de estabilidade e reatividade química (CHATTARAJ; GIRI, 2007; PADMANABHAN et al., 2007).

As cargas atômicas usadas neste estudo foram obtidas com a palavra-chave POP=CHELPG usando o potencial eletrostático (BRENEMAN; WIBERG, 1990), com esta estratégia, foi possível obter o melhor potencial molecular quântico de pontos definidos em torno da molécula, e cargas atômicas oferecem a vantagem geral de ser fisicamente mais satisfatória do que cargas Mulliken KOLLMAN; SINGH, 1994).

#### 4.3 DESCRITORES DE RELAÇÃO QUANTITATIVA ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE (QSAR)

Os seguintes descritores QSAR foram calculados para os inibidores relatados da literatura: Área de superfície (aprox), Área de superfície (grid), volume molecular (VM), refratividade molecular (RM), polarizabilidade molecular (PM), coeficiente de lipofilicidade (logP), massa molecular (MM) e energia de hidratação (EH) de acordo com o programa **HyperChem 6.02** (CHEMPLUS, 2000). Os descritores moleculares selecionados forneceram informações valiosas sobre a influência eletrônica, estérica, hidrofílica e hidrofóbica nos inibidores selecionados.

#### 4.4 CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE DADOS E SELEÇÃO DE PROPRIEDADES MOLECULARES

Com a determinação de todos os descritores moleculares, foi possível construir a matriz de dados. Antes de iniciar a análise foi necessário fazer a padronização da matriz de dados  $X = (n, m)$  contendo os inibidores nas linhas e os descritores calculados nas colunas, onde  $n$  é o número de compostos estudados e  $m$  é o número de variáveis. O objetivo da padronização é dar a cada variável um peso igual em termos matemáticos, cada variável foi centrada na média e escalada para a variância unitária. A seleção das variáveis foi iniciada com a análise da matriz de correlação de Pearson (SANTOS et al., 2014) entre as variáveis e a atividade biológica, os descritores que tiveram pequena ou nenhuma correlação (menor do que 0,40, valor de correlação de corte) foram descartados. As análises de correlação

de Pearson foram realizadas com os softwares Pirouette 3.01 (PIROUETTE, 2001) e Statistica 6.1 (STATISTICA, 2004). O objetivo final da análise foi avaliar os descritores que melhor se correlacionam com a atividade biológica (CI<sub>50</sub>) para propor os novos candidatos a fármacos para tratamento de DA.

#### 4.5 MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEP)

Um importante conceito que será explorado neste estudo é a correlação da atividade da estrutura dos inibidores estudados através das características do mapa de potencial eletrostático. O MEP permite a utilização de uma análise qualitativa para localizar sítios reativos numa molécula, e determinar os papéis desempenhados por ambos os efeitos eletrônicos e estéricos (tamanho/forma) sobre a sua potência. É de fundamental importância que a visualização do MEP forneça informações qualitativas sobre as moléculas, tais como o comportamento da interação entre um ligante e o receptor. O MEP num dado ponto (x, y, z) na vizinhança de uma molécula é definida em termos da energia de interação entre a carga elétrica gerada a partir dos elétrons das moléculas, núcleos e uma carga de teste positivo (um prótons) situado em  $r$ . Para os compostos estudados, os valores  $V(r)$  foram calculadas pela equação abaixo, como descrita por Politzer e Murray (2002):

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r')}{|r' - r|} dr'$$

onde  $Z_A$  é a carga do núcleo A, localizada em  $R_A$ ,  $\rho(r')$  é a função da densidade eletrônica da molécula, e  $r'$  é variável de integração simulado.

Os MEPs foram gerados a partir da carga atômica no nível DFT B3LYP/6-31G\*\* calculada no programa **Gaussian 03** (FRISCH et al., 2003), e os resultados foram visualizados com o auxílio do programa **Molekel** (PLUKIGER et al., 2001).

#### 4.6 DERIVAÇÃO DO FARMACÓFORO

A derivação do padrão farmacofórico foi gerada a partir do servidor **PharmaGist** (SCHNEIDMAN-DUHOVNY, 2008) que detecta os grupos

farmacofóricos por alinhamento múltiplo e flexível dos ligantes utilizados. Os recursos farmacofóricos que podem ser observados nos resultados são: grupos hidrofóbicos, grupos aromáticos, doadores de ligações de hidrogênio, ligação de hidrogênio aceitantes, grupos ionizáveis e positivos negativos, a triagem dos alinhamentos é feita por uma função de pontuação. Também é possível escolher um dos ligantes como modelo (rígido) para o alinhamento dos outros. Neste estudo foi utilizada a substância CID 46888954 como modelo mais 31 inibidores mais ativos (por  $CI_{50}$ ) relatados na literatura obtidos a partir do banco de dados **BindingDB** ([www.bindingdb.org/bind/index.jsp](http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp)).

#### 4.7 BUSCA PELA ESTRUTURA DA PROTEÍNA

Foi feito o “download” da estrutura cristalográfica da GSK-3 $\beta$  humana depositada no Protein Data Bank (PDB ID: 3Q3B - a resolução de 2.7 Å) complexada com o inibidor 4-(4-hidroxi-3-metilfenil) -6-fenilpirimidina-2 (5H) -ona (COFFMAN et al., 2011). Estes foram obtidos a partir do Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org>) no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (BERMAN et al., 2000).

#### 4.8 SIMULAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR

Simulações de “docking” foram realizadas utilizando o programa **AutoDock Vina** (GOODSELL; OLSON, 1990) pra cada inibidor e a enzima GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 3Q3B). Para realizar o protocolo de “docking”, moléculas de água, cofatores e íons foram excluídos; os estados de protonação (ligantes e proteína) foram ajustados ao pH fisiológico; átomos de hidrogênio adicionados, assim como cargas parciais Gasteiger-Marsili; a cadeia B e o inibidor foram retirados do complexo; as ligações rotacionáveis dos ligantes foram ajustadas para serem livres, e a enzima foi tratada como um corpo rígido.

A validação do acoplamento foi realizada pelo cálculo do RMSD (Root Mean-Square-desvio) entre o inibidor e a pose (conformação) de maior pontuação resultante, com o auxílio do programa Discovery Studio Visualizer 4.0 (DIETRICH, 1995). The Grid Box, o qual define a região da macromolécula, em que o software

será livre para envolver o ligante, foi centrado no sítio ativo da enzima, em Lys85, Asp133 e resíduos Val135 (COFFMAN; PARTHUN; WU; WU, 2011), com os seguintes valores  $x = 38.16\text{\AA}$ ,  $y = 9.697\text{\AA}$  e  $z = 36.362\text{\AA}$ .

As conformações dos inibidores obtidas nas simulações com menor valor de energia de afinidade foram selecionadas e um estudo sobre distâncias médias das interações observadas utilizando o programa Discovery Studio Visualizer 4.0 foi executada.

#### 4.9 ADME SCREENING

Utilizando o PreADMET (<http://preadmet.bmdrc.org/>) foram preditas as propriedades farmacocinéticas dos inibidores selecionados, através da predição ADME, onde prevê a absorção intestinal humana (HIA), permeabilidade celular em células Caco-2 e MDCK, ligação às proteínas plasmáticas (PPB), permeabilidade na barreira hematoencefálica (BBB). Yamashita (2000), afirma que estas células têm sido recomendadas como modelo *in vitro* de confiança para a predição de absorção oral da droga candidata. Além disso, pode prever as propriedades toxicológicas que os compostos naturais podem causar, tais como mutagenicidade e carcinogenicidade.

As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas foram calculadas usando PreADMET (<http://preadmet.bmdrc.org/>) para todos os inibidores selecionados da literatura e aos novos inibidores propostos inibidores de GSK-3 $\beta$  para o tratamento de Alzheimer.

#### 4.10 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, PREDIÇÃO DE ATIVIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA

Com os resultados obtidos *in silico* foi possível propor modificações na estrutura da molécula com menor valor de  $Cl_{50}$ . Além disso, pôde-se prever a atividade dessas novas substâncias propostas através do programa **PASS** (<http://www.akosgmbh.de/pass/index.html>), o qual prediz com alta acurácia (70-80%) até 2000 atividades biológicas para compostos químicos.

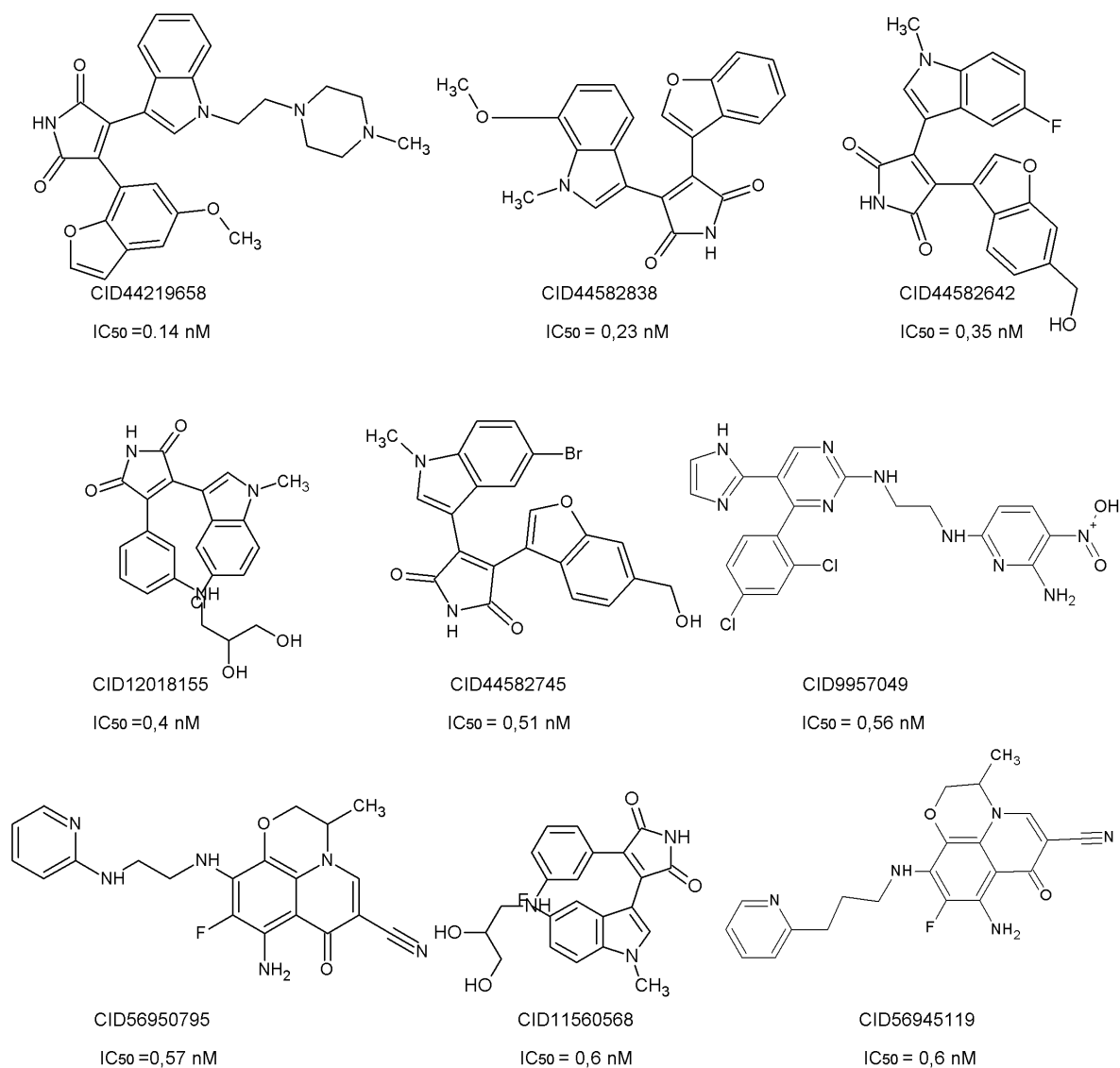
Para avaliar a viabilidade sintética, as moléculas propostas foram submetidas ao programa **SYLVIA** (<http://www.molecular-networks.com/>).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

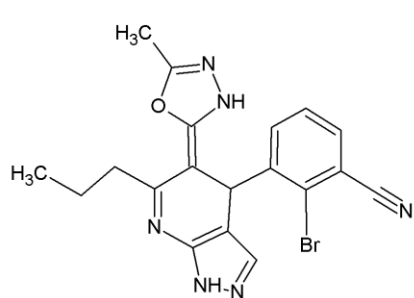
### 5.1 INIBIDORES ESTUDADOS

A Figura 1 mostra os 40 inibidores de GSK-3 $\beta$  selecionados a partir da base de dados BindingDB ordenados pelo  $CI_{50}$  e a Tabela 1 apresenta o nome químico de cada estrutura.

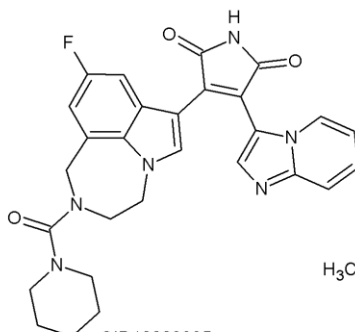
**Figura 1** – Representação das estruturas químicas dos 40 inibidores de GSK-3 $\beta$  selecionados a partir da base de dados BindingDB ordenados pelo  $CI_{50}$  com auxílio de ACD/ChemSketch.



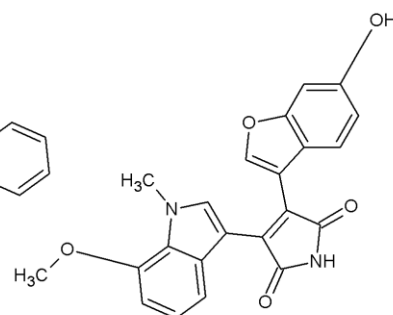
Cont. Fig. 1



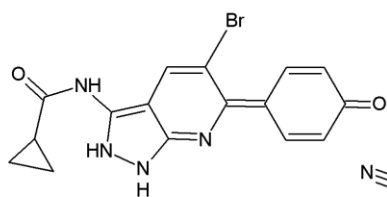
CID44456875

IC<sub>50</sub> = 0,7 nM

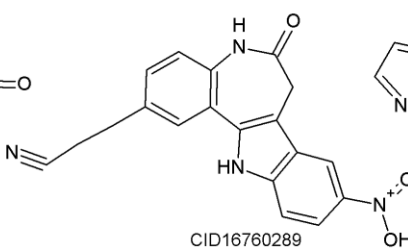
CID10029385

IC<sub>50</sub> = 0,7 nM

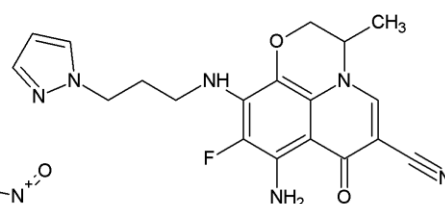
CID44582855

IC<sub>50</sub> = 0,73 nM

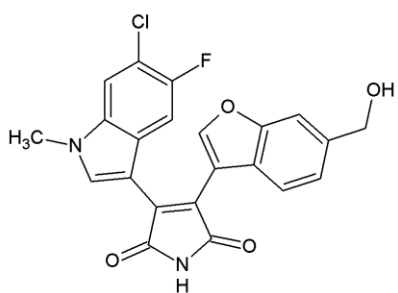
CID6539574

IC<sub>50</sub> = 0,8 nM

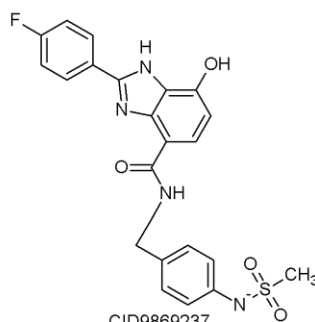
CID16760289

IC<sub>50</sub> = 0,8 nM

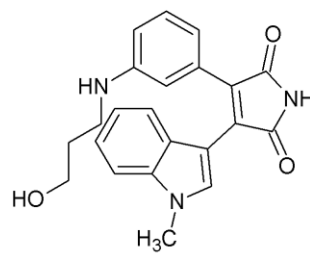
CID57399952

IC<sub>50</sub> = 0,86 nM

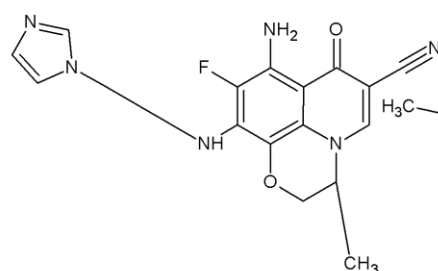
CID44582684

IC<sub>50</sub> = 0,95 nM

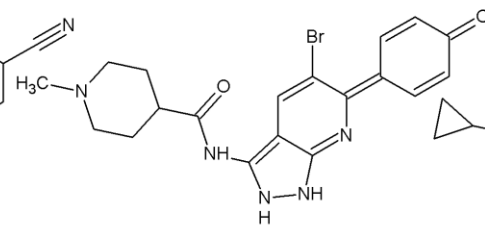
CID9869237

IC<sub>50</sub> = 1 nM

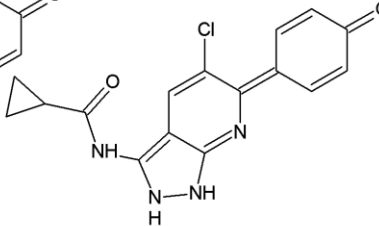
CID12018144

IC<sub>50</sub> = 1 nM

CID57403370

IC<sub>50</sub> = 1 nM

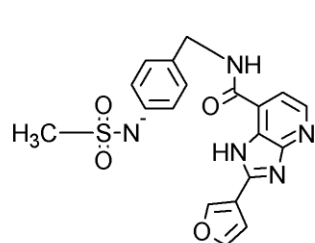
CID6539584

IC<sub>50</sub> = 1 nM

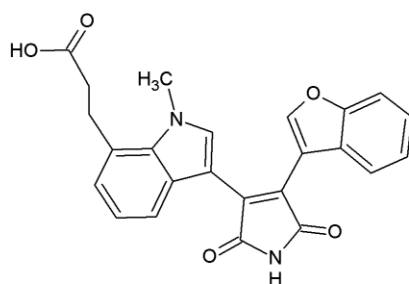
CID6539575

IC<sub>50</sub> = 1 nM

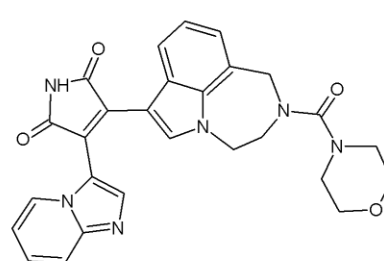
Cont. Fig. 1



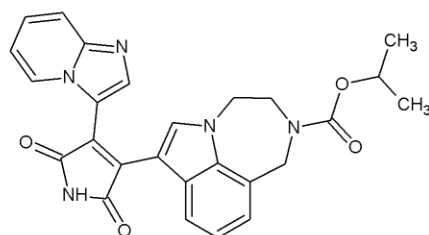
CID57766857

IC<sub>50</sub> = 1 nM

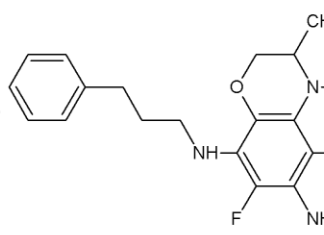
CID44582857

IC<sub>50</sub> = 1,2 nM

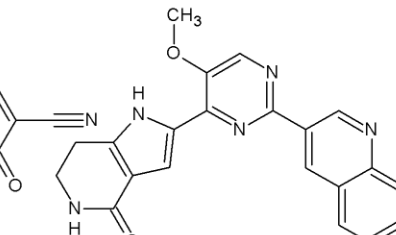
CID11248978

IC<sub>50</sub> = 1,3 nM

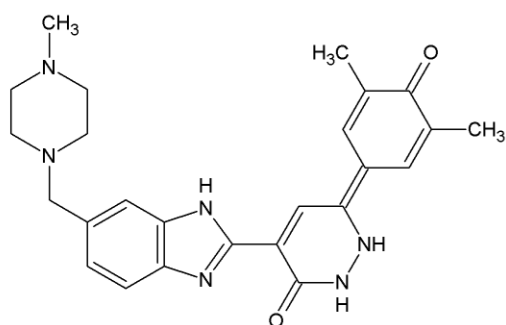
CID11328863

IC<sub>50</sub> = 1,3 nM

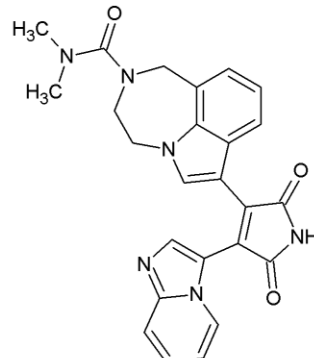
CID57391251

IC<sub>50</sub> = 1,4 nM

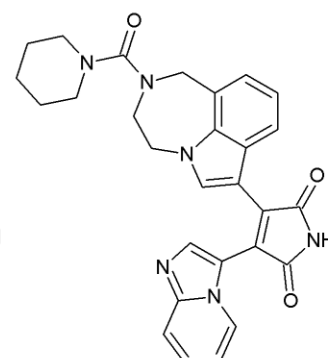
CID71452173

IC<sub>50</sub> = 1,73 nM

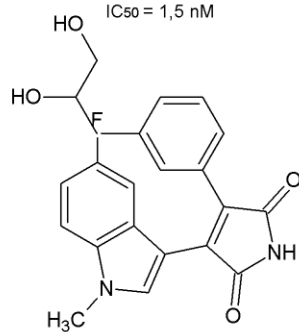
CID44456875

IC<sub>50</sub> = 1,5 nM

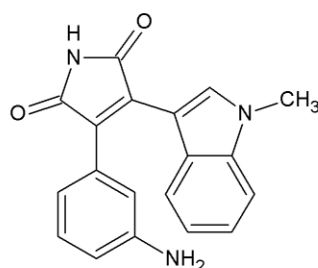
CID11316975

IC<sub>50</sub> = 1,6 nM

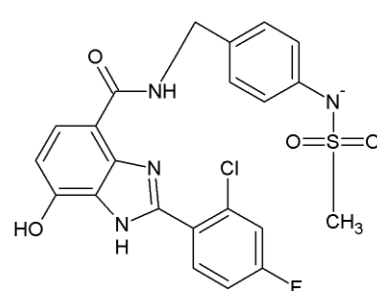
CID11294864

IC<sub>50</sub> = 1,6 nM

CID46880335

IC<sub>50</sub> = 1,8 nM

CID5327711

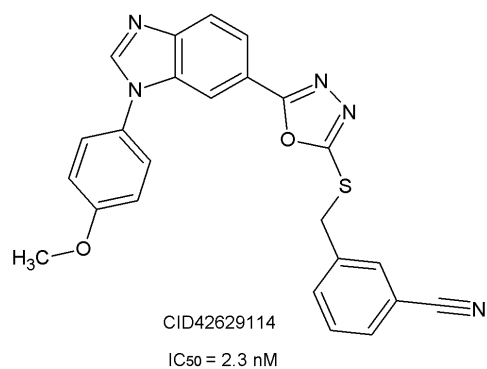
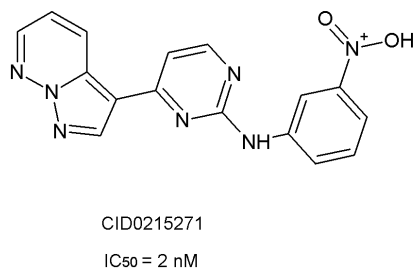
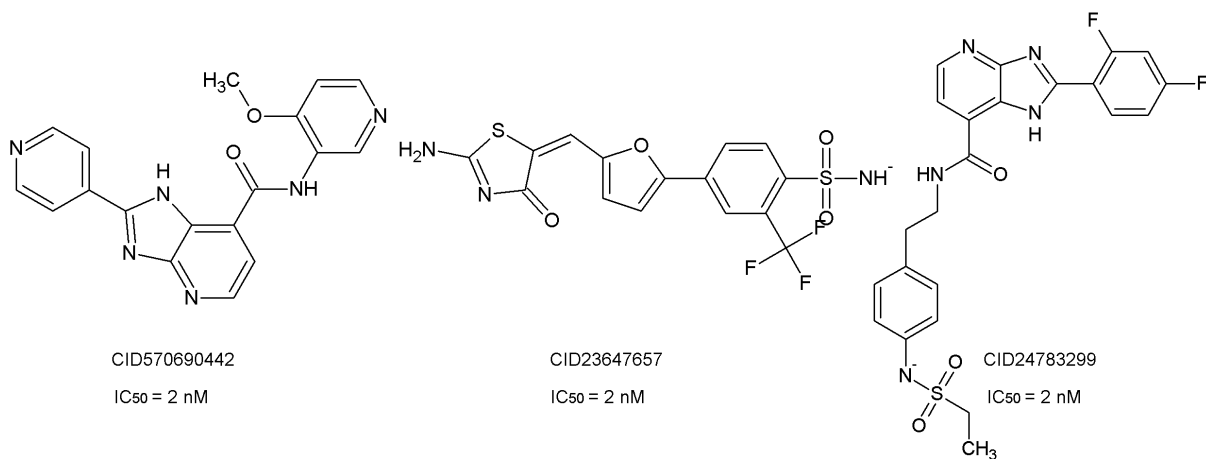
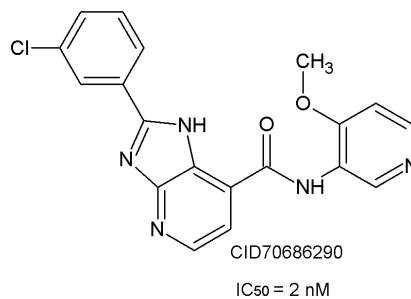
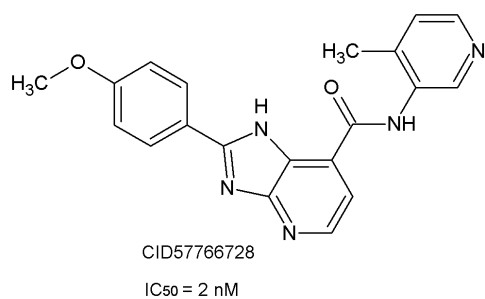
IC<sub>50</sub> = 1,8 nM

CID45272193

IC<sub>50</sub> = 2 nM



Cont. Fig. 1



**Tabela 1** – Nomes químicos dos inibidores selecionados

<b>INIBIDORES</b>	<b>NOMES QUIMICOS</b>
CID 44219658	3-(5-metoxi-1-benzofurano-7-il)-4-[1-[2-(4-metilpiperazina-1-il)etil]indol-3-il]pirrol-2,5-diona
CID 44582838	3-(1-benzofurano-3-il)-4-[7-(metoximetil)-1-metilindol-3-il]pirrol-2,5-diona
CID 44582642	3-(5-fluoro-1-metilindol-3-il)-4-[6-(hidroximetil)-1-benzofurano-3-il]pirrol-2,5-diona
CID 12018155	3-(5-cloro-1-metilindol-3-il)-4-[3-(2,3-diidroxipropilamino)fenil]pirrol-2,5-diona
CID 44582745	3-(5-bromo-1-metilindol-3-il)-4-[6-(hidroximetil)-1-benzofurano-3-il]pirrol-2,5-diona
CID 9957049	6-N-[2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(1H-imidazol-2-ij)pirimidina-2-il]amino]etil]-3-nitropiridina-2,6-diamina
CID 56950795	(3S)-8-amino-9-fluoro-3-metil-7-oxo-10-{{2-(piridina-2-ilamino)etil}amino}-2,3-diidro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-il]quinolina-6-carbonitrila
CID 11560568	3-[3-(2,3-diidroxipropilamino)fenil]-4-(5-fluoro-1-metilindol-3-il)pirrol-2,5-diona
CID 56945119	(3S)-8-amino-9-fluoro-3-metil-7-oxo-10-{{3-(piridina-2-il)propil}amino}-2,3-diidro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinolina-6-carbonitrila
CID 44456875	2-bromo-3-[(5Z)-5-(5-metil-3H-1,3,4-oxadiazol-2-ilidena)-6-propil-1,4-diidropirazolo[3,4-b]piridina-4-il]benzonitrila
CID 10029385	3-(9-fluoro-2-(piperidina-1-ilcarbonil)-1,2,3,4-tetraidro(1,4)diazepino(6,7,1hi)indol-7-il)-4-imidazo(1,2-a)piridin-3-il-1H-pirrol-2,5-diona
CID 44582855	3-[6-(hidroximetil)-1-benzofurano-3-il]-4-[7-(metoximetil)-1-metilindol-3-il]pirrol-2,5-diona
CID 6539574	N-[5-bromo-6-(4-oxociclohexa-2,5-dien-1-ilidena)-1,2-diidropirazol[3,4-b]piridina-3-il]ciclopropanecarboxamida
CID 16760286	3-(9-nitro-6-oxo-7,12-diidro-5H-indol[3,2-d][1]benzazepina-2-il)propanenitrila

CID 57399952	(3S)-8-amino-9-fluoro-3-metil-7-oxo-10-[[3-(1H-pirazol-1-il)propil]amino]-2,3-diidro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinolina-6-carbonitrila
CID 44582684	3-(6-cloro-5-fluoro-1-metilindol-3-il)-4-[6-(hidroximetil)-1-benzofurano-3-il]pirrol-2,5-diona
CID 9869237	2-(4-fluorofenil)-7-hidroxi-N-[2-[4-(methanesulfonamido)fenil]etil]-1H-benzimidazole-4-carboxamide
CID 12018144	3-[3-(3-hidroxiopropilamino)fenil]-4-(1-metilindol-3-il)pirrol-2,5-diona
CID 57403370	(3S)-8-amino-9-fluoro-10-[[3-(1H-imidazol-1-yl)propyl]amino]-3-metil-7-oxo-2,3-diidro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinolina-6-carbonitrila
CID 6539584	N-[5-bromo-6-(4-oxociclohexa-2,5-dien-1-ilidena)-1,2-diidropirazol[3,4-b]piridin-3-il]-1-metilpiperidine-4-carboxamide
CID 6539575	N-[5-cloro-6-(4-oxociclohexa-2,5-dien-1-ilidene)-1,2-diidropirazol[3,4-b]piridin-3-il]ciclopropanecarboxamide
CID 57766857	N-[2-[4-(etilsulfonilamino)fenil]etil]-2-(furan-3-il)-1H-imidazo[4,5-b]piridine-7-carboxamide
CID 44582857	3-[3-[4-(1-benzofuran-3-il)-2,5-dioxopirrol-3-yl]-1-metilindol-7-il]propanoico acido
CID 11248978	3-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-4-(2-(morfolina-4-carbonil)-1,2,3,4-tetraidro-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-7-il)-1H-pirrol-2,5-dione
CID 11328863	7-(4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-2,5-diidro-1H-pirrol-3-il)-3,4-diidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indole-2-carboxylic acid isopropyl ester
CID 57391251	(3S)-8-amino-9-fluoro-3-methyl-7-oxo-10-[(3-phenylpropyl)amino]-2,3-dihydro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinoline-6-carbonitrile
CID 71452173	2-(5-metoxi-2-quinolin-3-ilpirimidin-4-il)-1,5,6,7-tetraidropirrol[3,2-c]piridin-4-ona
CID 44456876	6-(3,5-dimetil-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-ilidene)-4-[6-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-1H-benzimidazol-2-il]-1,2-diidropiridazin-3-ona
CID 11316975	7-(4-(H-imidazo[1,2-a]piridin-3-yl)-2,5-dioxo-2,5-diidro-1H-pirrol-3-il)-N,N-dimetil-3,4-diidro-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-2(1H)-carboxamide; 7-(4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-2,5-diidro-1H-

	pirrol-3-il)-3,4-diidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indole-2-carboxílico ácido dimetilamida
CID 11294864	3-Imidazo[1,2-a]piridin-3-il-4-[2-(piperidine-1-carbonil)-1,2,3,4-tetraidro-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-7-il]-pirrol-2,5-diona
CID 46880335	3-[3-(2,3-diidroxipropil)fenil]-4-(5-fluoro-1-metilindol-3-il)pirrol-2,5-diona
CID 5327711	3-(3-aminofenil)-4-(1-metilindol-3-il)pirrol-2,5-diona
CID 45272193	2-(2-cloro-4-fluorofenil)-N-[2-[4-(etilsulfonilamino)fenil]etil]-7-hidroxil-1H-benzimidazol-4-carboxamida
CID 57766728	2-(4-metoxifenil)-N-(4-metilpiridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-b]piridine-7-carboxamida
CID 70686290	2-(3-clorofenil)-N-(4-metoxipiridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-b]piridine-7-carboxamida
CID 70690442	N-(4-metoxipiridina-3-il)-2-piridin-4-il-1H-imidazo[4,5-b]piridine-7-carboxamida
CID 23647657	4-[5-[(Z)-(2-amino-4-oxo-1,3-tiazol-5-ilidene)metil]furan-2-il]-2-(trifluorometil)benzenesulfonamida
CID 24783299	2-(2,4-difluorofenil)-N-[2-[4-(etilsulfonilamino)fenil]etil]-1H-imidazo[4,5-b]piridine-7-carboxamida
CID 10215271	N-(3-nitrofenil)-4-pirazolo[1,5-b]piridazina-3-ilpirimidina-2-amina
CID 42629114	3-[[5-[3-(4-metoxifenil)benzimidazol-5-il]-1,3,4-oxadiazol-2-il]sulfanilmetil]benzonitrila

## 5.2 MODELAGEM MOLECULAR DOS INIBIDORES ESTUDADOS E CÁLCULOS DE DESCRITORES

### 5.2.1 Análise estatística dos descritores químico-quânticos e descritores de relação estrutura atividade quantitativa

A Tabela 2 mostra os resultados dos descritores moleculares (químico-quânticos) de 32 inibidores em que os cálculos computacionais foram possíveis, e a matriz de correlação de Pearson para os descritores que apresentaram valor maior que 0.4 (ponto de corte). A correlação entre os pares de descritores/propriedades

físico-químicos é inferior a 0.240433, enquanto que a correlação entre os descritores/propriedades físico-químicos e o valor de atividade biológica ( $Cl_{50}$ ) é inferior a 0.424807.

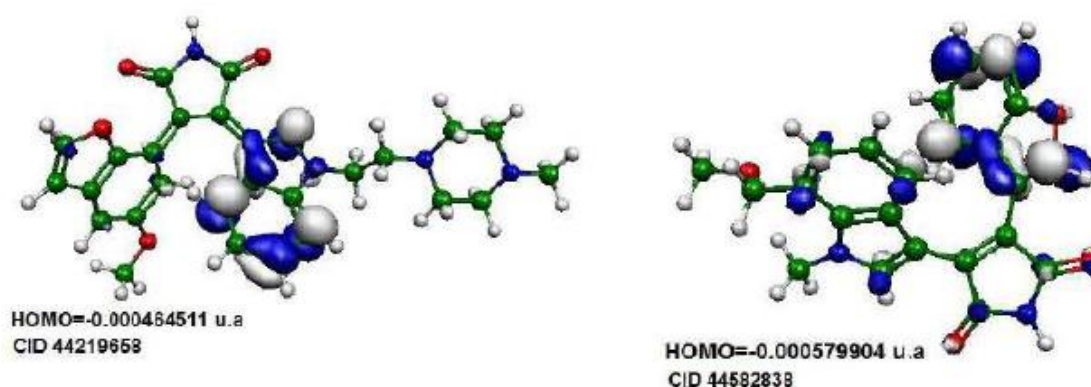
**Tabela 2** – Descritores moleculares para os 32 inibidores e a respectiva correlação de Pearson.

<b>INIBIDORES</b>	<b>Lumo+1</b>	<b>Moleza Molecular</b>	<b>LogP</b>	<b><math>Cl_{50}</math> (nM)</b>
CID 44219658	0.00096063	1.606.814.054	-3.65	0.14
CID 44582838	0.00077431	1.924.426.874	-3.01	0.23
CID 44582642	0.00089558	1.829.337.546	-3.89	0.35
CID 12018155	0.00037301	4.417.434.416	-3.13	0.40
CID 9957049	0.00064863	2.879.512.804	-2.06	0.56
CID 56950795	0.00057035	2.259.144.541	-3.85	0.57
CID 11560568	0.00099701	3.865.255.114	-3.51	0.60
CID 10029385	0.00096173	3.453.222.843	-3.51	0.70
CID 44582855	0.00079562	1.965.431.275	-3.86	0.73
CID 16760286	0.00068464	1.939.515.039	-4.32	0.80
CID 57399952	0.00081988	95.595.981	-4.85	0.86
CID 44582684	0.00057219	1.881.188.801	-4.11	0.95
CID 9869237	0.00167467	3.504.365.229	-2.6	1.00
CID 12018144	0.00086912	3.018.457.682	-2.48	1.00
CID 57403370	0.00109954	957.305.048	-5.03	1.00
CID 6539575	0.00071624	1.831.184.118	-0.32	1.00
CID 44582857	0.00069346	336.774.703	-2.73	1.20
CID 11248978	0.00070485	4.298.798.736	-3.97	1.30
CID 11328863	0.00113666	2.506.807.554	-2.47	1.30
CID 57391251	0.00155891	2.146.009.148	-2.52	1.40
CID 71452173	0.0009338	3.792.529.059	-2.62	1.49
CID 44456876	0.00051449	231.882.369	-1.06	1.50
CID 11316975	0.00106353	4.413.851.744	-3.63	1.60
CID 11294864	0.00107675	4.322.699.921	-2.9	1.60
CID 46880335	0.00112931	2.871.915.145	-2.35	1.80

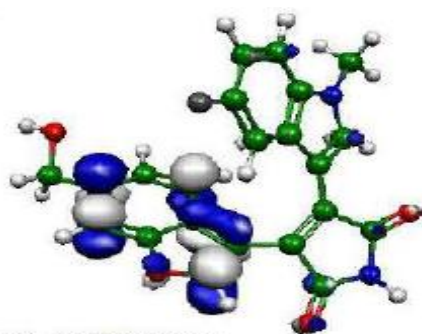
CID 5327711	0.00057035	2.998.500.937	-2.5	1.80
CID 57766728	0.0016449	513.422.566	-2.20	2.00
CID 70686290	0.00106206	427.180.471	-2.58	2.00
CID 70690442	0.00158132	4.623.856.585	-3.83	2.00
CID 23647657	0.00158279	1.677.127.643	-1.47	2.00
CID 24783299	0.00177573	2.422.020.116	-1.74	2.00
CID 10215271	0.00047554	9.895.053.091	-1.9	2.00
Lumo+1	1.000000	-0.065467	0.113477	0.432572
Moleza Molecular		1.000000	0.240433	0.444951
LogP			1.000000	0.424807
Cl <sub>50</sub> (nM)				1.000000

Foram gerados os sítios de *HOMO* (*highest occupied molecular orbital*) em português, orbital molecular mais alto ocupado, e *LUMO* (*lowest unoccupied molecular orbital*) em português, orbital molecular não ocupado mais baixo, como mostrados nas figuras 2 e 3, respectivamente, para os 32 inibidores.

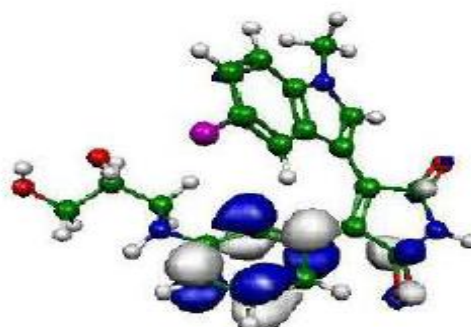
**Figura 2** - Representação dos orbitais *HOMO* nos 32 inibidores da GSK-3 $\beta$



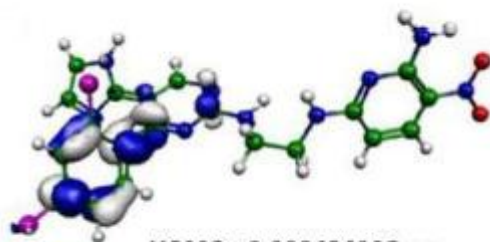
Cont. Fig. 2



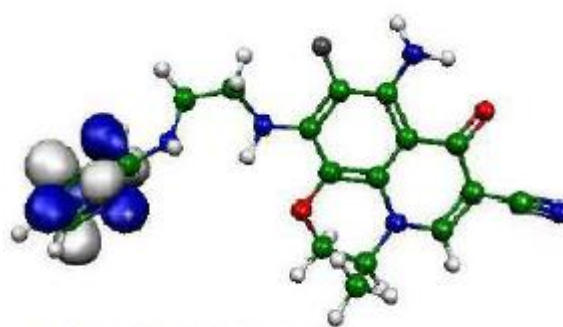
HOMO=-0.0006523 a.u  
CID 44592642



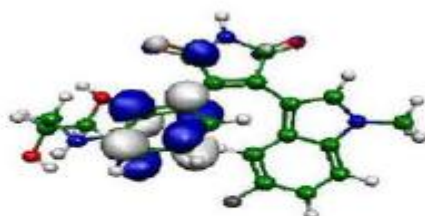
HOMO=-0.000364186 u.a  
CID 12018166



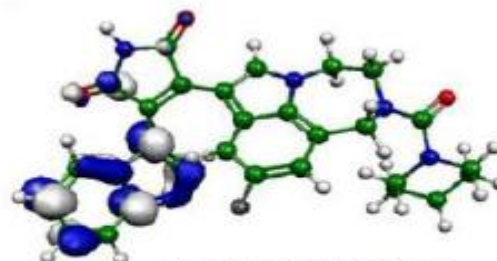
HOMO=-0.000434009 u.a  
CID 9957049



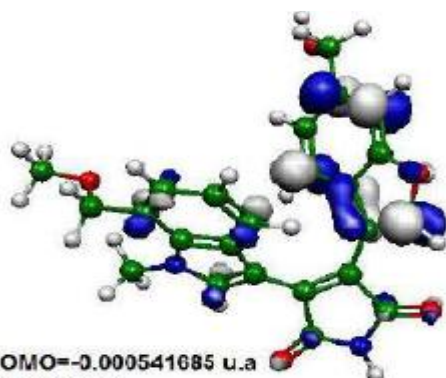
HOMO=-0.000847439 u.a  
CID 56950795



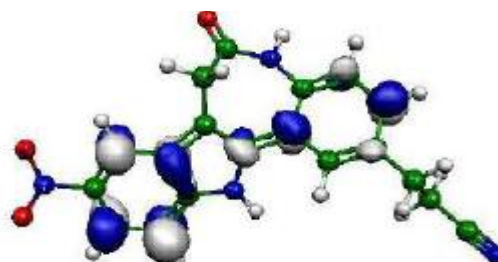
HOMO=-0.000023887 u.a  
CID 11560568



HOMO=-0.000115025 u.a  
CID 10029385

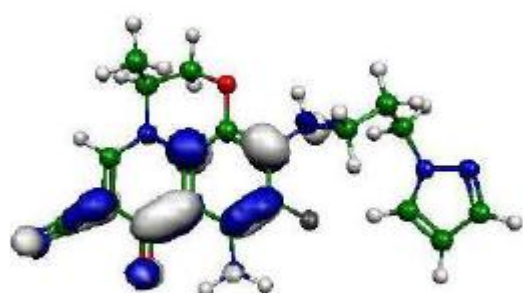


HOMO=-0.000541685 u.a  
CID 44582855

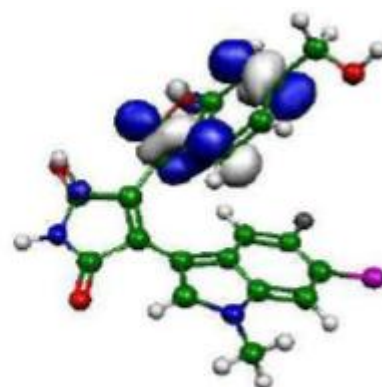


HOMO=-0.000597544 u.a  
CID 16760286

Cont. Fig. 2



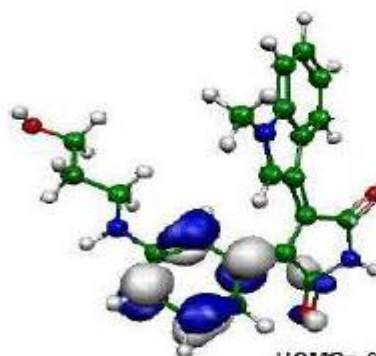
HOMO=0.014394704 u.a  
CID 57399952



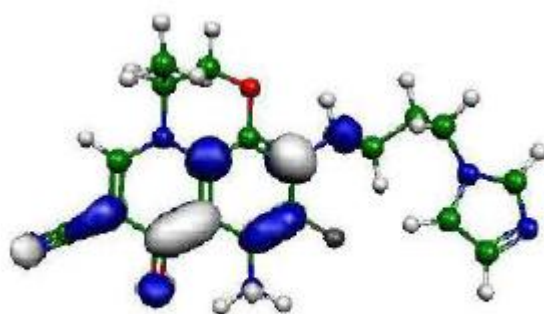
HOMO=-0.000791213 u.a  
CID 44582684



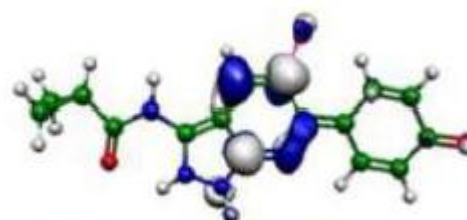
HOMO=-0.00034912 u.a  
CID 9869237



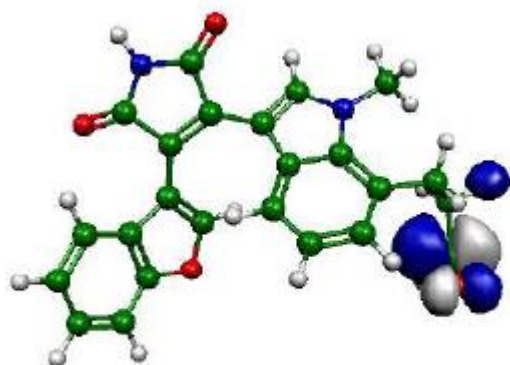
HOMO=-0.000107308 u.a  
CID 12018144



HOMO=-0.001487245 u.a  
CID 67403370



HOMO=-0.000850747 u.a  
CID 6539575



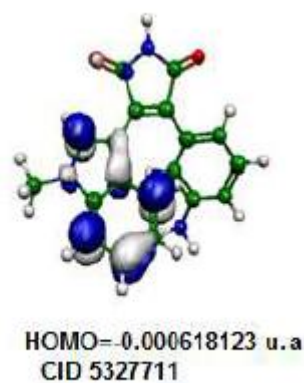
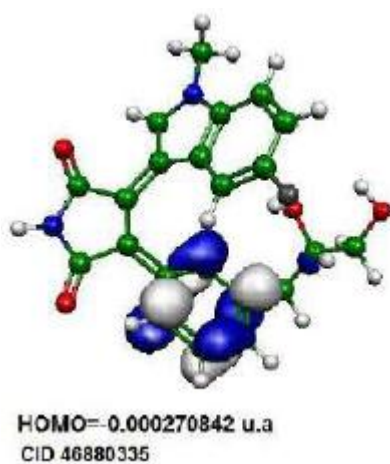
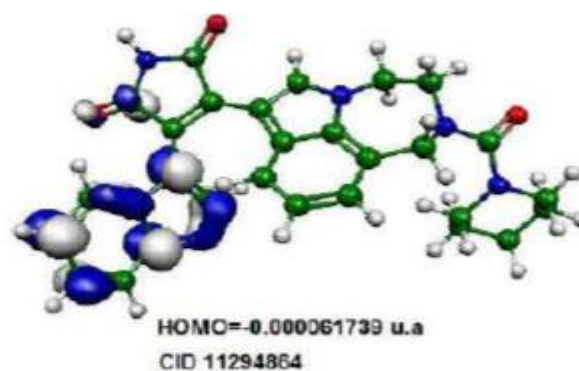
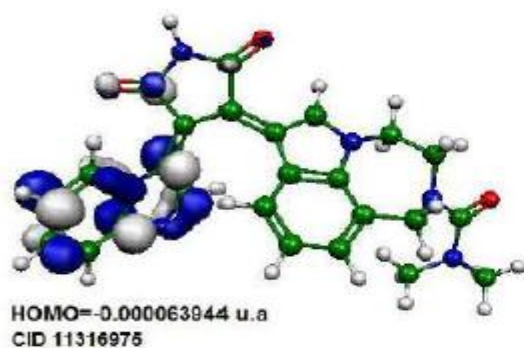
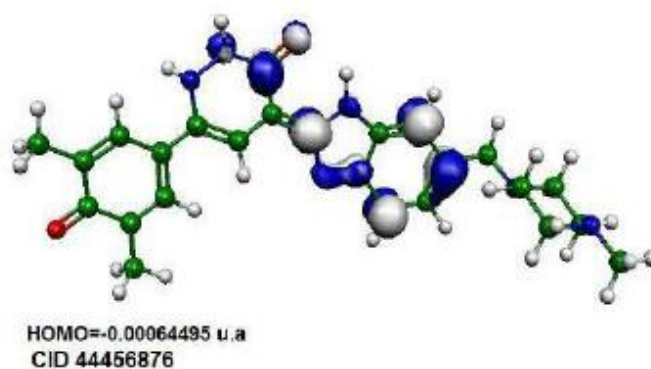
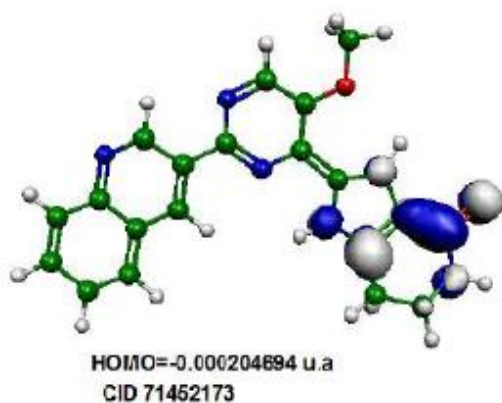
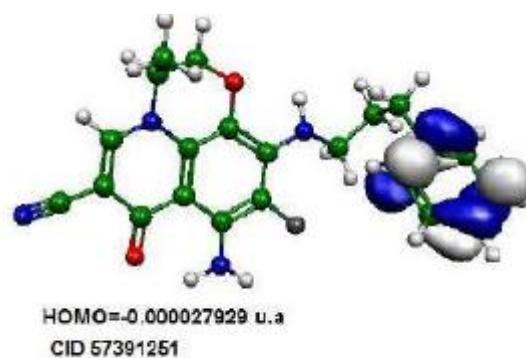
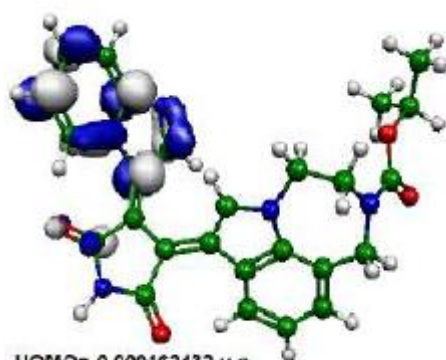
HOMO=-0.000030134 u.a  
CID 44582857



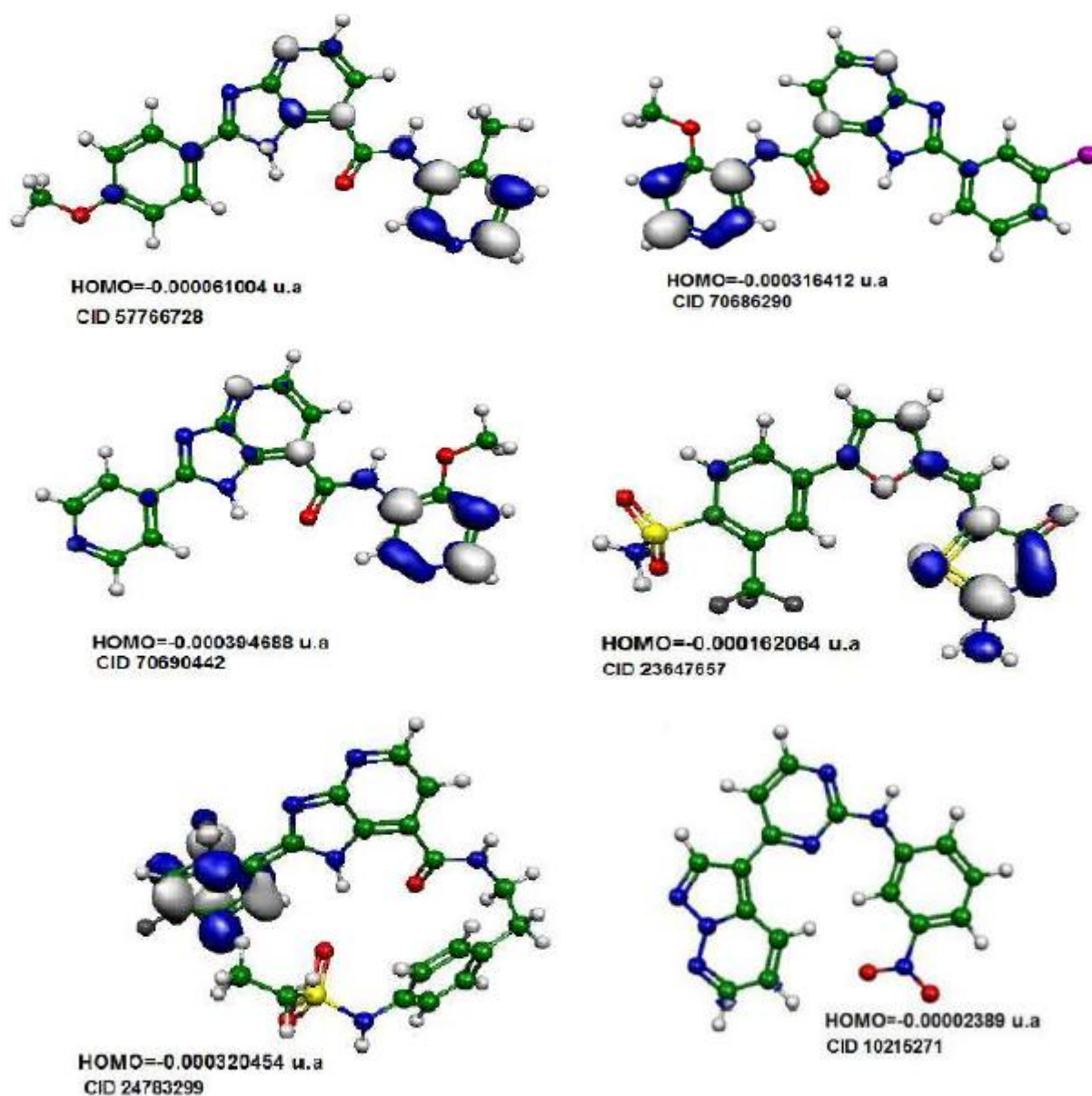
HOMO=-0.000013597 u.a  
CID 11248978



Cont. Fig. 2



Cont. Fig. 2



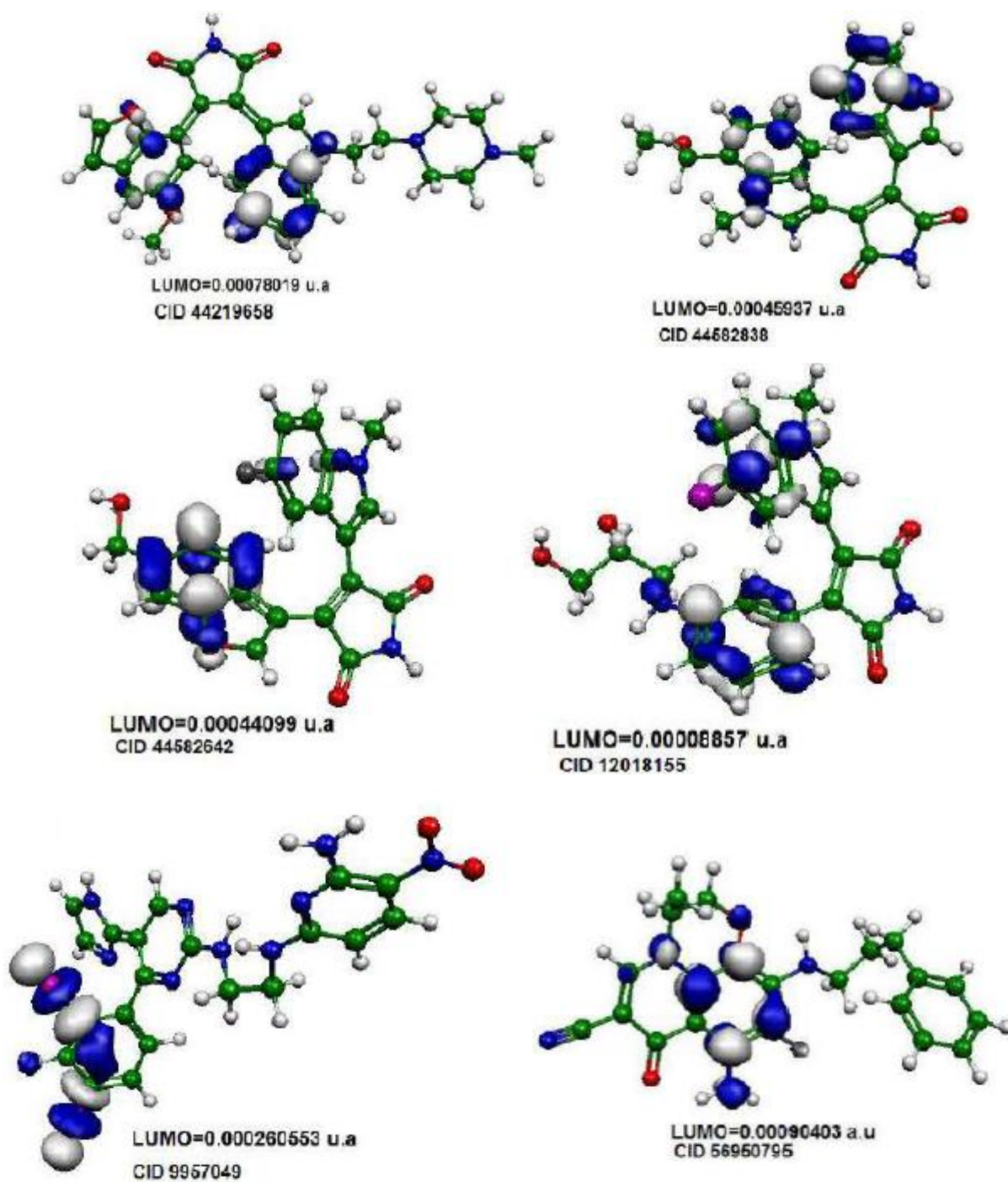
O *HOMO* está relacionado com a capacidade doadora de elétrons, caracterizando a molécula como nucleofílica. Altos valores de *HOMO* indicam maior nucleofilicidade. Enquanto que o *LUMO* está relacionado com a capacidade aceptora de elétrons, caracterizando a molécula como eletrófilo. Baixos valores de *LUMO* indicam maior eletrofilicidade. Estes parâmetros estão relacionados com as regiões em que a estrutura química do fármaco pode ser atraída por pontos específicos do receptor biológico como regiões ricas ou deficientes em elétrons. É um importante parâmetro que contribui para uma maior compreensão da reatividade química de um candidato a ligante em um conjunto de moléculas em estudo

(KUBINYI, 2002). Além do mais, fornecem informações relacionadas ao caráter doador de elétrons e elétron-receptor da molécula e portanto, a formação de um complexo de transferência de carga (CTC) (CLARE, 1995).

Ao analisar o *HOMO* dos inibidores verificou-se que os glóbulos estão distribuídos da seguinte maneira: No inibidor CID5327711, estão distribuídos na região do anel indólico, o do inibidor CID6539575 encontra-se no anel piridina e parte do anel pirazol, no inibidor CID9869237 está na parte etilalanina, no CID 9957049 está ao redor do anel benzênico substituído com o cloro, no CID10029385 está concentrado no anéis imidazol e piridina, no CID10215271 está fracamente nos carbonos do anel piridazina no carbono com dupla ligação com o nitrogênio e no seu adjacente também, no CID11248978 está no anel imidazol piridina e parte do pirrol e pontualmente nos átomos da ligação C=O da mesma forma os inibidores CID11294864, CID11316975, CID11328863, CID11560568, CID12018144, CID12018155, pois apresentam estrutura molecular parecida, nos inibidores CID16760286 e CID24783299 os glóbulos estão localizados predominantemente no anel indólico e no CID44219658 está no anel imidazol piridina e parte do pirrol, no CID44456876 está na ligação C=O do anel dihidropiridazina e principalmente no anel benzimidazol; nos inibidores CID44582642 CID44582684 CID44582838 CID44582855, os glóbulos se concentram no anel benzofurano; no CID44582857, se distribui na parte do acetato; Nos inibidores CID46880335, CID57391251, CID57399952, se concentra no anel benzeno que está isolado; nos inibidores CID57403370 e CID57766728, os glóbulos estão distribuídos homogeneamente nas ligações C-C próximo da ligação tripla carbono-nitrogênio, além da ligação C=C próximo da amina e na ligação C-C próximo da cetona; nos inibidores CID70686290, CID70690442, CID71452173 os glóbulos estão distribuídos no anel piridina; no CID56950795 está localizado na ligação C-C do anel dihidropiridina próximo do nitrogênio, além do oxigênio da ligação C=O. Ou seja, todas essas regiões desses inibidores são bons nucleófilos e podem ser, de acordo com maiores valores elevados, cada vez mais melhores nucleófilos, as quais possuem grande tendência de interação com as regiões eletrofílicas do respectivo receptor biológico. Os valores de *HOMO* máximo e mínimo como sendo de -0,000013597 u.a e -0,014394704 u.a que correspondem ao CID 11248978 e CID 57399952, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a *HOMO* com o  $Cl_{50}$  foi de 0.1443. Já, os valores de

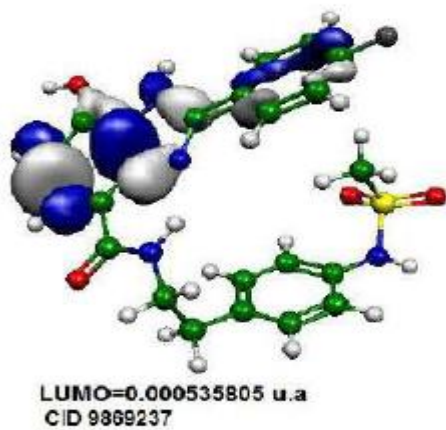
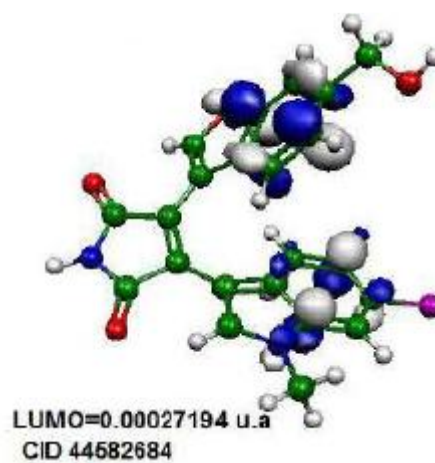
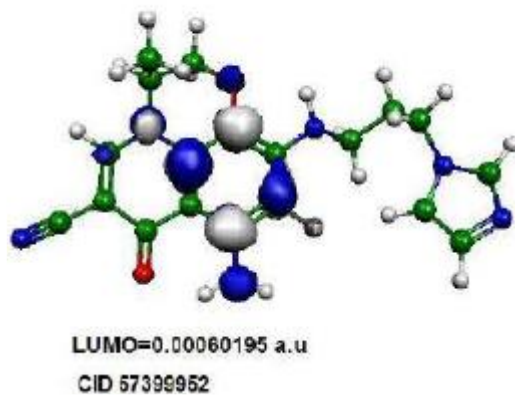
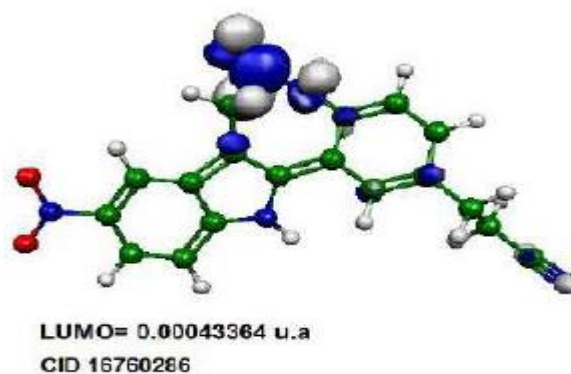
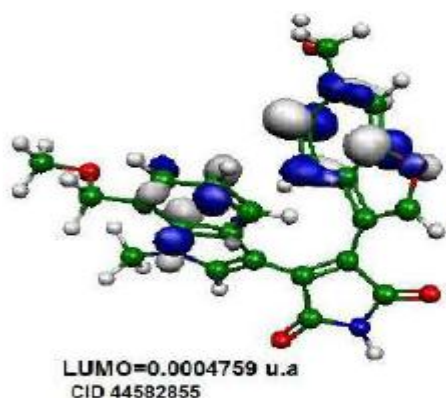
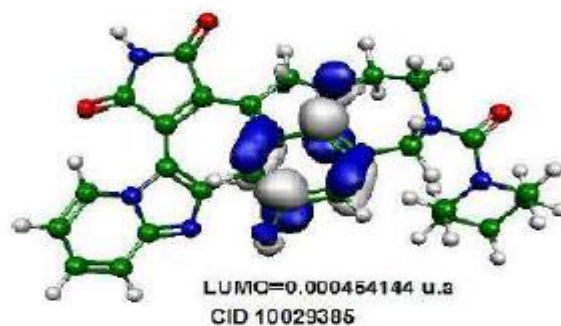
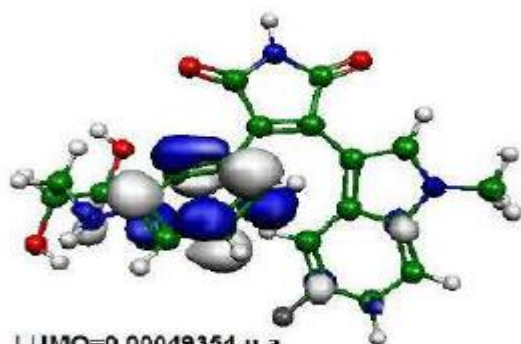
*HOMO*-1 máximo e mínimo como sendo de -0,000080848 u.a e -0,001956533 u.a que correspondem ao CID 57391251 e CID 57403370, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a *HOMO*-1 com o  $Cl_{50}$  foi de 0.1292.

**Figura 3** - Representação do *LUMO* nos 32 inibidores da GSK-3 $\beta$

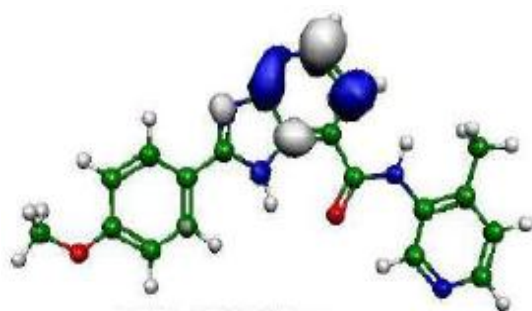




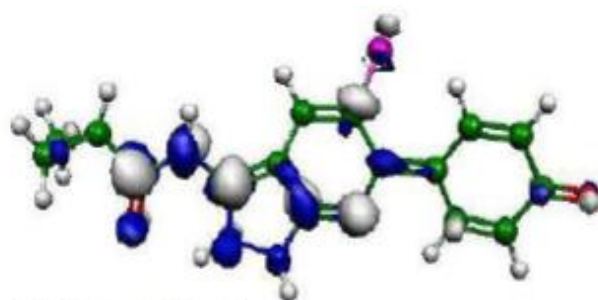
Cont. Fig. 3



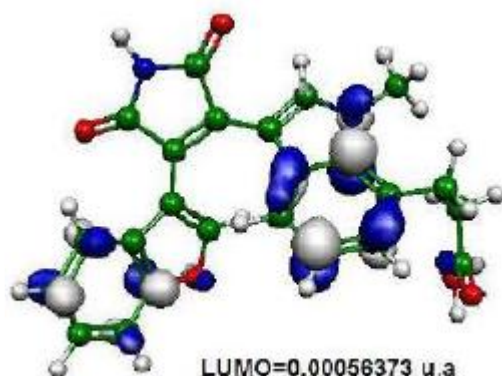
Cont. Fig. 3



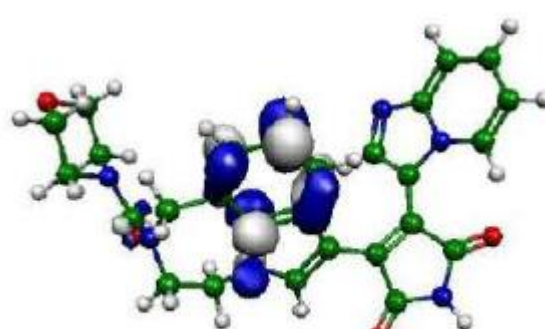
LUMO=0.00032854 a.u  
CID 57403370



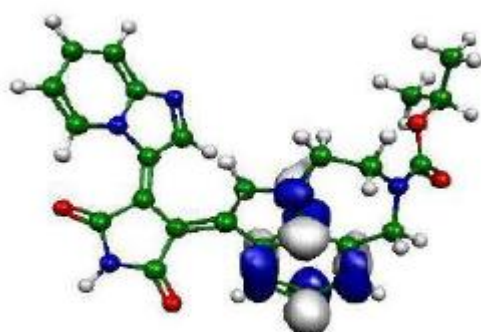
LUMO=0.000241443 u.a  
CID 8539575



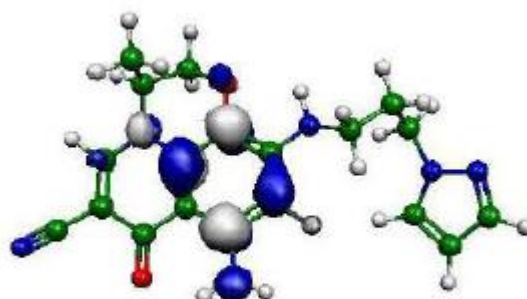
LUMO=0.00056373 u.a  
CID 44582867



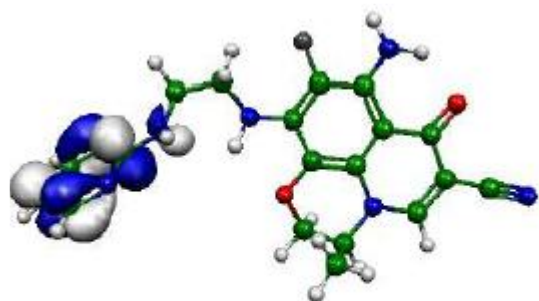
LUMO=0.00045165 u.a  
CID 11249978



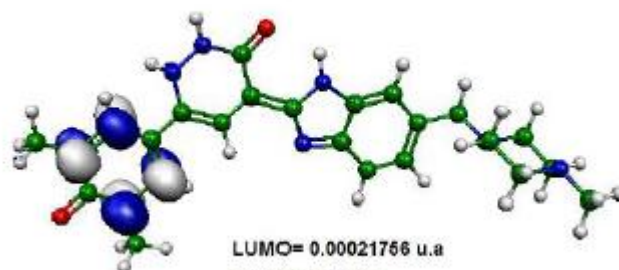
LUMO=0.0006354 u.a  
CID 11328863



LUMO=0.00652668 a.u  
CID 57391251

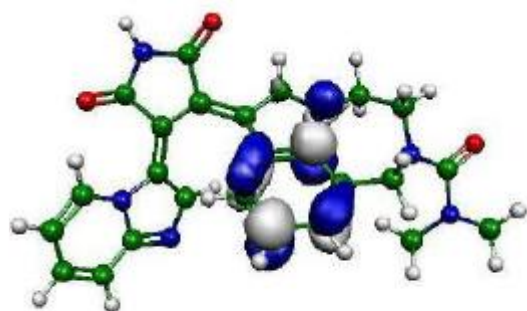


LUMO=0.00003785 a.u  
CID 71462173

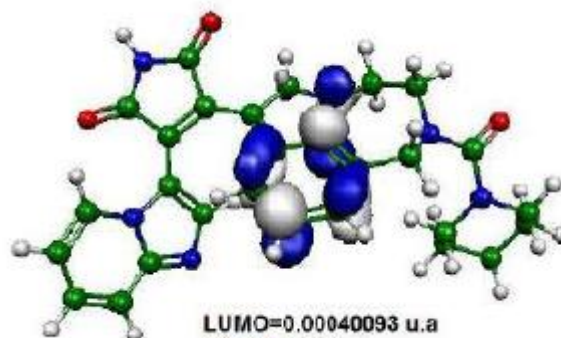


LUMO= 0.00021766 u.a  
CID 44456876

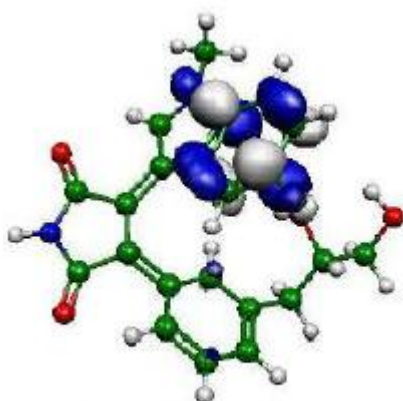
Cont. Fig. 3



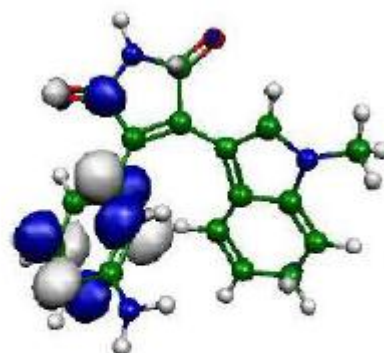
LUMO=0.00038918 u.a  
CID 11316975



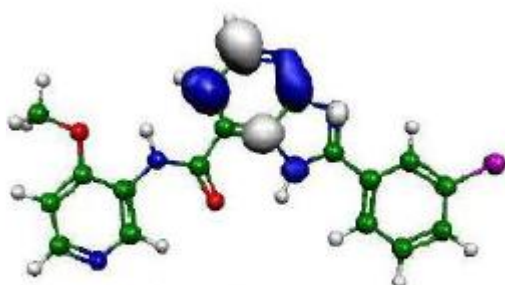
LUMO=0.00040093 u.a  
CID 11294864



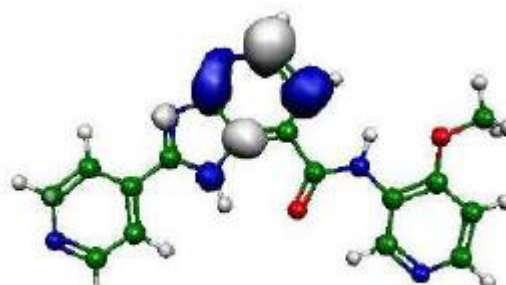
LUMO=0.00042556 u.a  
CID 46880336



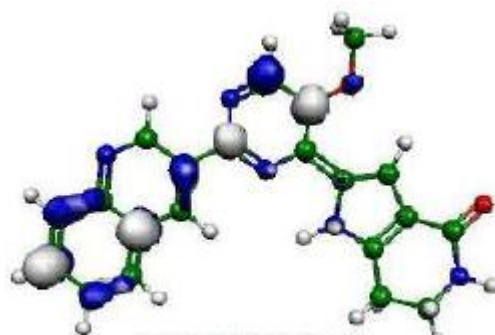
LUMO=0.00004888 u.a  
CID 5327711



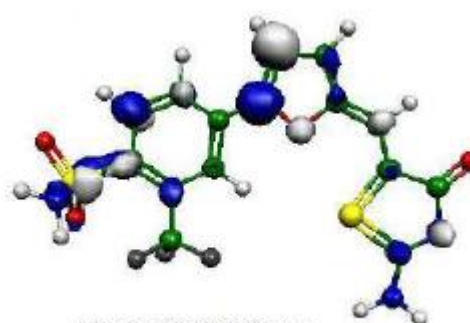
LUMO=0.00015177 a.u  
CID 57766728



LUMO=0.00003785 a.u  
CID 70686290



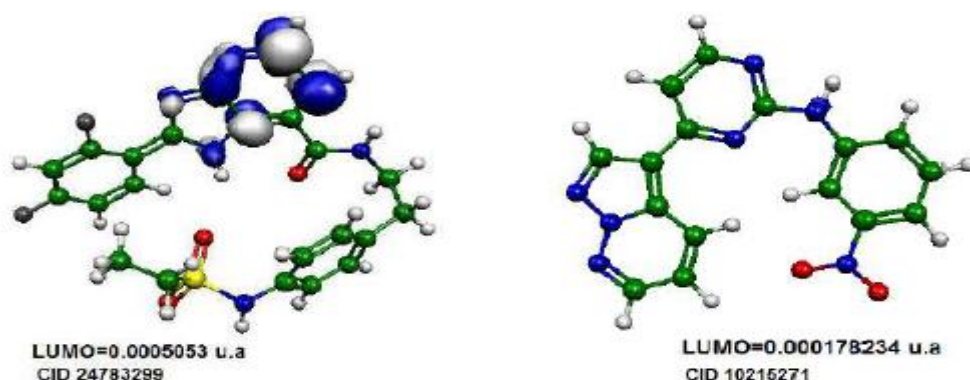
LUMO=0.00032266 a.u  
CID 70690442



LUMO=0.00103045 a.u  
CID 23847867



Cont. Fig. 3



Na figura 3 acima, a qual mostra os *LUMOs*, os glóbulos estão distribuídos da seguinte maneira: No inibidor CID532771, está ao redor do anel benzeno que está substituído pela amina em posição *para*; no inibidor CID 6539575 está distribuído no anel pirazol e na ligação C=O e N-H do grupo acetamida; no inibidor CID9869237 está distribuído ao redor da ligação C=C do anel fluorofenil e ao redor do grupo benzimidazol; No inibidor CID9957049 estão predominantemente nas ligações C-Cl em substituição *meta*; No inibidor CID10029385, estão nas ligações C-C do anel benzenofluoro substituído na posição *para*; Nos inibidores CID11248978, CID11294864, CID11316975 e CID1328863 estão no anel benzeno de seis carbonos do grupo indol; Nos inibidores CID11560568 e CID12018144 estão no anel benzeno de seis carbonos que está substituído pelo grupo amino propano; No inibidor CID12018155 estão no anel benzeno próximo do grupo pirrol 2,5 diona e também no anel benzeno ligado ao cloro; No inibidor CID16760286 estão na ligação C=O e N-H; No inibidor CID23647657 estão em parte na ligação C-S e na ligação C-H do carbono insaturado do anel furano; No inibidor CID24783299 estão na ligação C-N e C-H do anel piridina; No inibidor CID44219658 estão na ligação C-C do anel aromático de seis carbonos; Nos inibidores CID44456876, CID44582642, CID44582684 e CID44582838 estão em ligação C-C e C-H do anel aromático ligado ao grupo furano; No inibidor CID44582855 e CID44582857 estão em parte no anel benzeno de seis carbonos do grupo furano e do anel piridina; No inibidor CID46880335 estão ao redor do anel piridina; No inibidor CID57391251 estão nas ligações C-C próximo ao flúor, além do nitrogênio do radical amina e na ligação C-N do duplo anel aromático; No inibidor CID57399952 estão localizados nas ligações C-C em um dos dois anéis aromáticos conjugados; Dos inibidores CID57403370,



CID57766728, CID70686290, CID70690442, CID71452173 e CID56950795, estão localizados em ligações C-N, C-H em um dos anéis aromáticos de seis carbonos, ou seja, todas essas regiões desses inibidores são ótimos eletrófilos e o são cada vez mais que o valor aumentar, além de possuírem grande tendência a interagir com regiões nucleófilas do respectivo receptor biológico. No entanto, pelo que está mostrado na tabela 2, a correlação foi favorável ao *LUMO*+1, isso quer dizer que o orbital abaixo possui grande relevância no que se refere ao  $Cl_{50}$ . Os valores de *LUMO* máximo e mínimo como sendo de 0,00003785 u.a e 0,00652668 u.a que correspondem ao CID 70690442 e CID 57399952, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a *LUMO* com o  $Cl_{50}$  foi de -0.1173. Já os valores de *LUMO*+1 máximo e mínimo como sendo de 0,00037301 u.a e 0,00177573 u.a que correspondem ao CID 12018155 e CID 24783299, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a *LUMO*+1 com o  $Cl_{50}$  foi de 0.4326.

A diferença de energias entre a energia do *LUMO* ( $E_{LUMO}$ ) e do *HOMO* ( $E_{HOMO}$ ) é chamado o gap (ou seja,  $E_{LUMO} - E_{HOMO}$ ). Quanto menor o intervalo de banda de uma molécula, o mais provável é ser um composto reativo (FORD, 2013). Ademais, é um importante indicador de estabilidade molecular e reatividade química. Moléculas que têm valores mais baixos de hiato são altamente reativos, enquanto que as moléculas que têm alto valor lacuna indicam alta estabilidade molecular, no sentido de baixa reatividade nas reações químicas (FORD, 2013). Os valores de GAP máximo e mínimo como sendo de 0,020921382 u.a e 0,000202121 u.a que correspondem ao CID 57399952 e CID 10215271, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a *GAP* com o  $Cl_{50}$  foi de 0.1371.

Nota-se que o inibidor CID 57399952 apresentou o maior valor de diferença, isso indica que o inibidor tem uma alta estabilidade molecular e baixa reatividade química, de forma diferente do inibidor CID10215271 mostrou que possui uma reduzida estabilidade alta reatividade química.

O paradigma atual da teoria de ação de fármacos baseia-se no princípio de ajuste entre a estrutura molecular da droga e do seu receptor em nível eletrônico e tem, entre outras propriedades, a suavidade molecular de biomacromoléculas envolvida. Assim, a estereoquímica de compostos bioativos governa os princípios de reconhecimento molecular e discriminação, sendo a estereosseletividade um aspecto importante desta abordagem (DIETRICH, 1995). Os valores de Moleza

molecular ( $1/\eta$ ) máximo e mínimo como sendo de 9895,053091 u.a e 95,595981 u.a que correspondem ao CID10215271 e CID57399952, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a Moleza molecular ( $1/\eta$ ) com o  $Cl_{50}$  foi de 0.4449.

LogP (logaritmo do coeficiente de partição octanol-água) pode ser definido como o coeficiente de partição de uma determinada espécie química é definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado à mudança de energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema. Sendo um dos parâmetros físico-químicos mais amplamente utilizado em estudos de QSAR (FOYE; LEMKE; WILLIANS, 1995).

Os fármacos que são altamente lipofílicos, como muitos hormônios esteroides, são capazes de atravessar o ambiente lipídico hidrofóbico da membrana plasmática sem canais ou transportadores especiais, tendo conseqüentemente acesso a alvos intracelulares possuem específicos valores de LogP, além de se caracterizar como um fator determinante na absorção e distribuição de fármacos (FOYE; LEMKE; WILLIANS, 1995). Os valores de Log P máximo e mínimo foram de -0,32 e -5,03 que correspondem ao CID6539575 e CID57403370, respectivamente. O valor da correlação de Pearson para a Log P com o  $Cl_{50}$  foi de 0.4248.

### 5. 3 MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO MOLECULAR (MEPs)

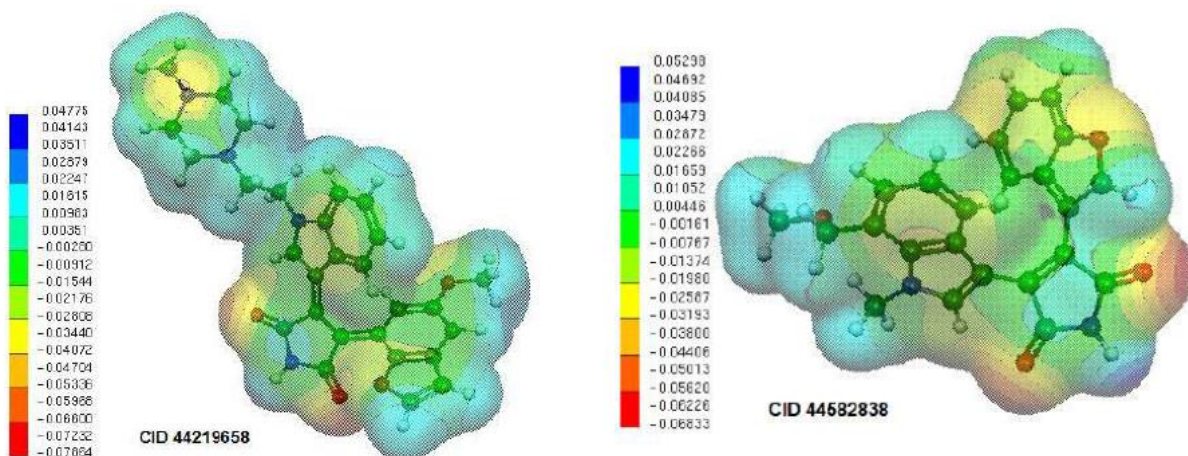
Potencial eletrostático de Superfície (ESP) é uma propriedade físico-química útil de uma molécula que fornece informações sobre as associações inter e intramoleculares, bem como a previsão dos locais prováveis de ataque metabólico eletrofílico e nucleofílico, desempenhando um papel crucial na interação de moléculas, e pode ser simplesmente definido como a diferença de carga eléctrica entre quaisquer dois pontos (LECKBAND; SIVASANKAR; SUBRAMANIAM, 1998). Assim sendo, O mapa de potencial eletrostático molecular (MEP) é uma abordagem interessante, pois permite compreender de forma mais ampla, as contribuições eletrostáticas para o processo de interação ligante-receptor (HENRE, 2003).

O potencial eletrostático pode então ser mapeado para a densidade de elétrons usando a cor para representar o valor de potencial. O modelo resultante

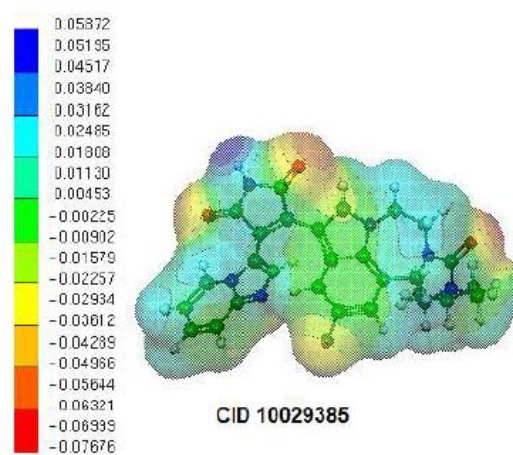
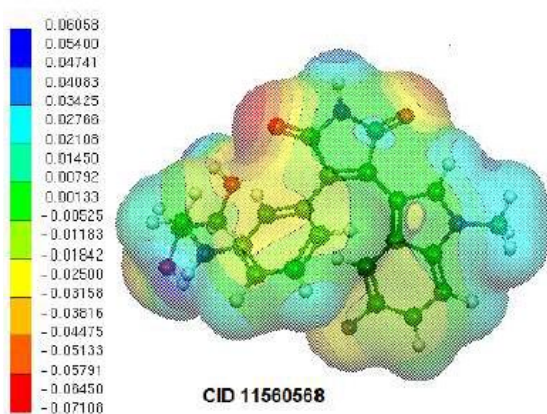
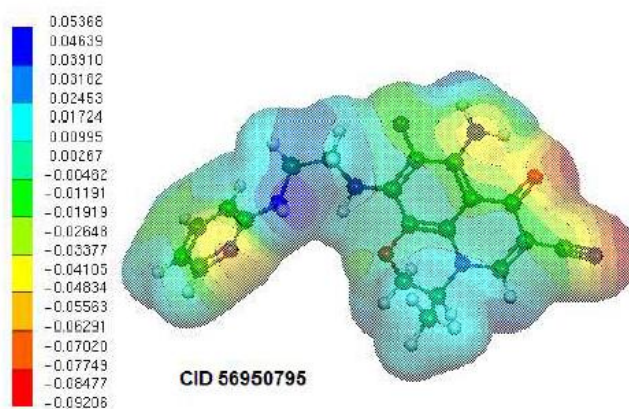
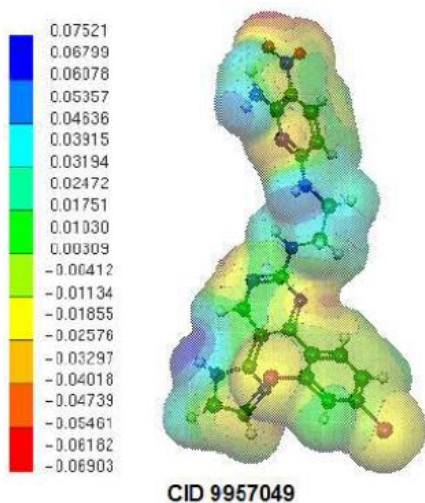
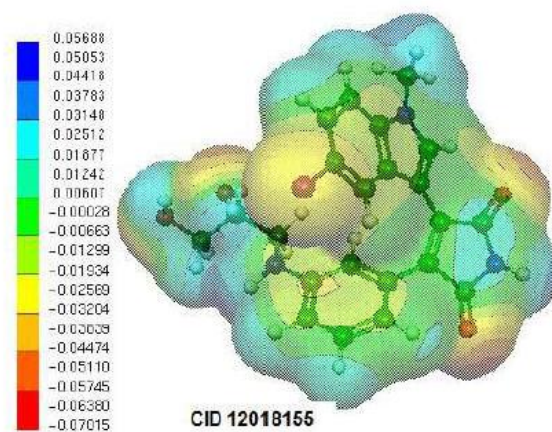
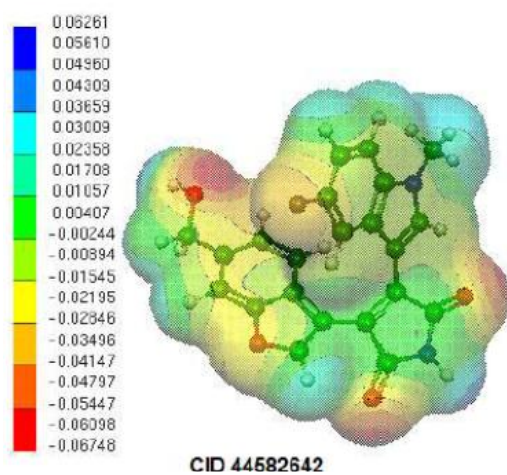
exibe simultaneamente tamanho molecular e forma e valor potencial eletrostática. Assim, o mapa de potencial eletrostático de cor vermelha indica alta densidade eletrônica (potencial negativo) com maior probabilidade de fazer ataque eletrofílico e a cor azul indica baixa densidade eletrônica (potencial positivo) com maior probabilidade da molécula sofrer ataque eletrofílico, colorações laranja, amarelo e verde representam valores intermediários de potencial (HENRE, 2003).

De acordo com a figura 4, verifica-se que as regiões mais negativas (vermelhas) estão presentes em regiões onde há ligações do tipo C=O, -NOO, -N=C, O=S=O e O-H (densidade eletrônica concentrada no átomo de oxigênio), enquanto que as regiões mais positivas (azuis) estão presentes onde há ligações do tipo -N-H e O-H. Tal configuração justifica-se pela diferença de eletronegatividade dos átomos envolvidos nessas ligações. Os valores máximo positivo e negativo de MEPs variaram de 0.101155 (CID6639576 – inibidor 2) à -0.09879 (CID44219658 - inibidor 17).

**Figura 4** - Representação dos Mapas de Potencial Eletrostático Molecular dos 32 inibidores de GSK -3 $\beta$

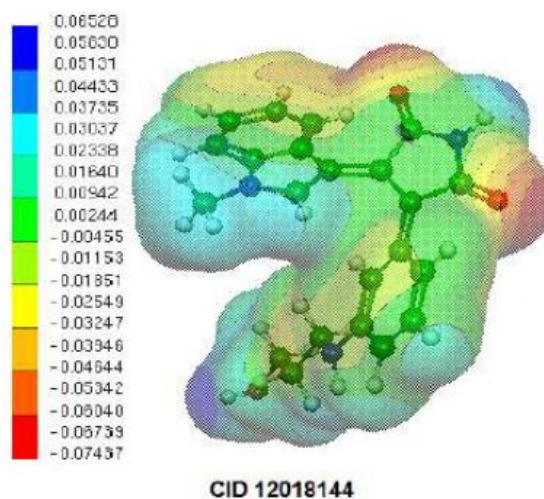
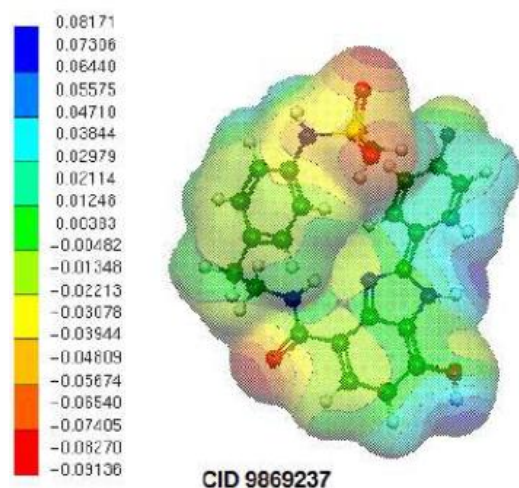
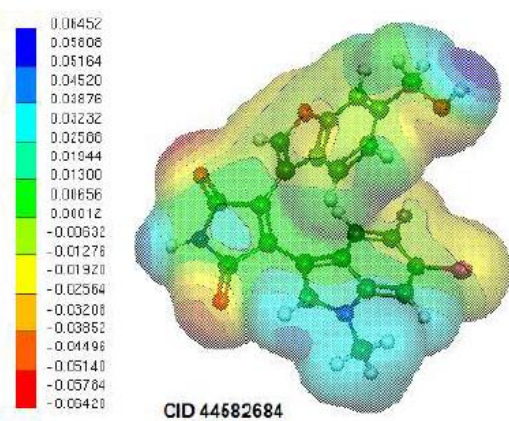
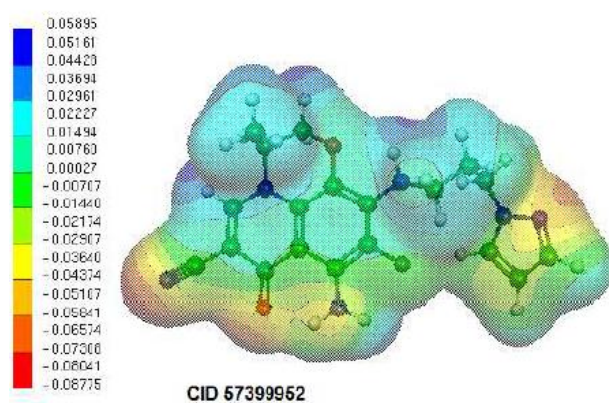
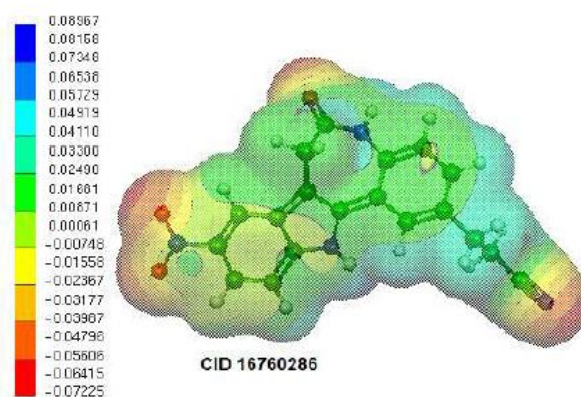
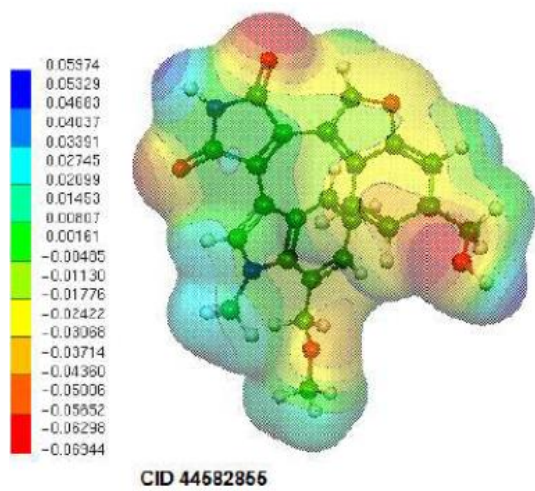


Cont. Fig. 4



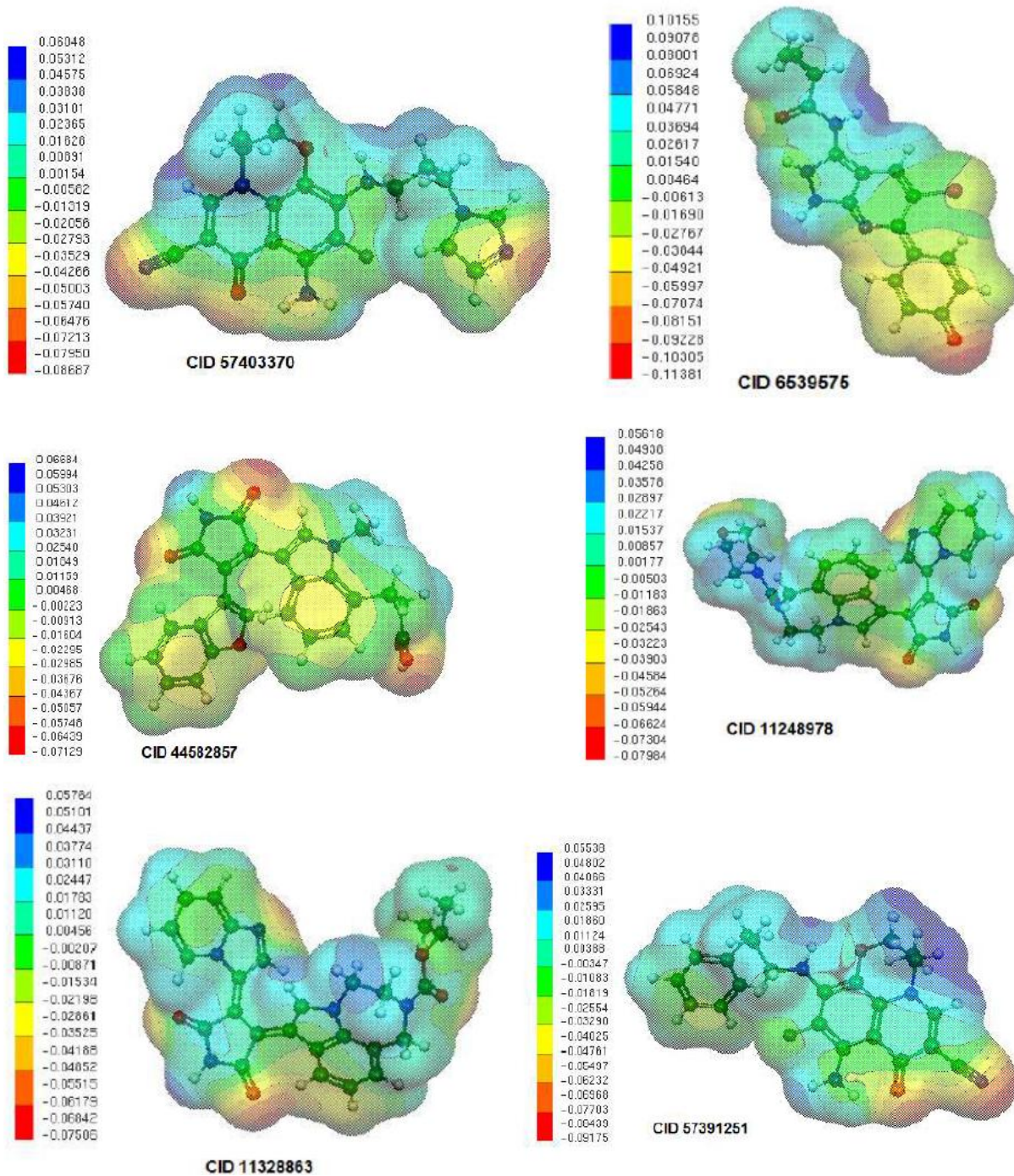


Cont. Fig. 4



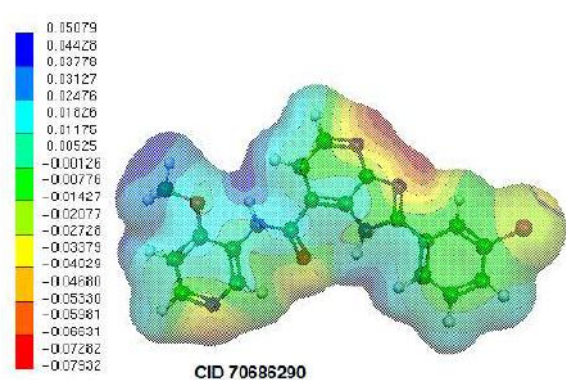
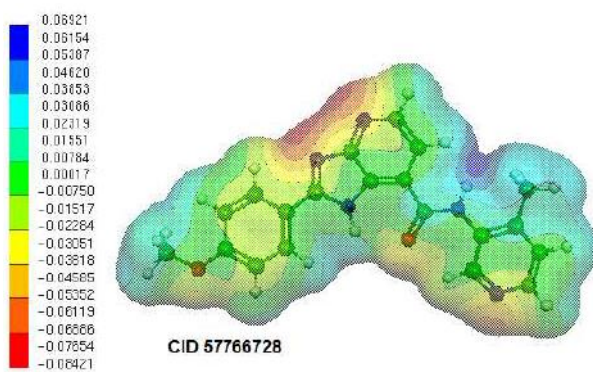
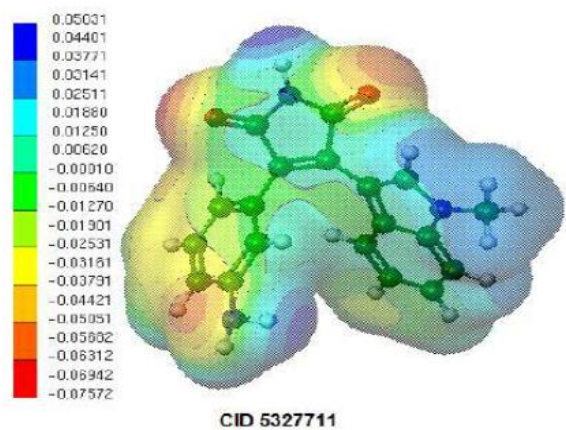
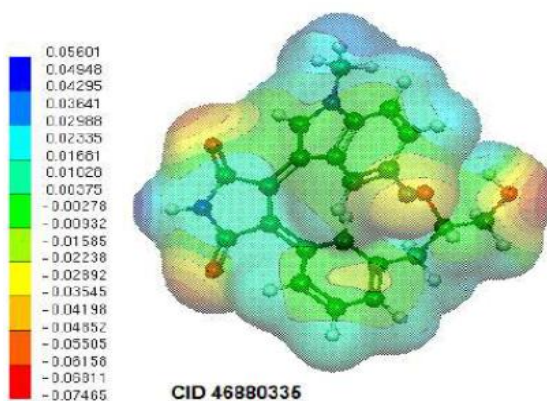
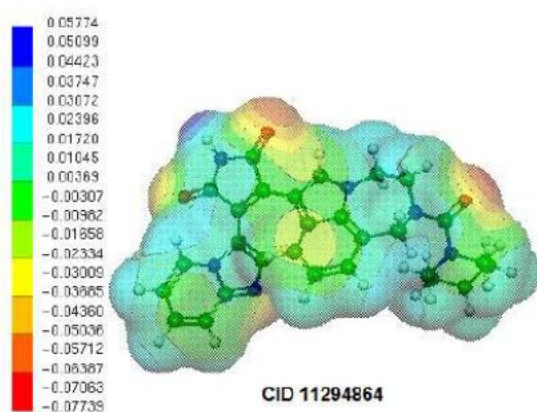
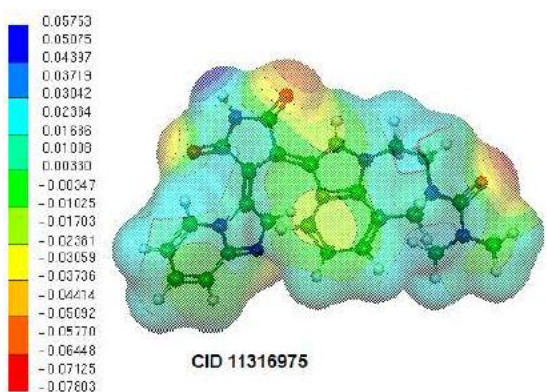
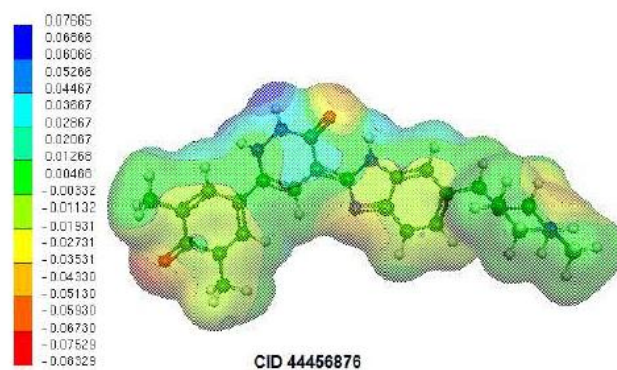
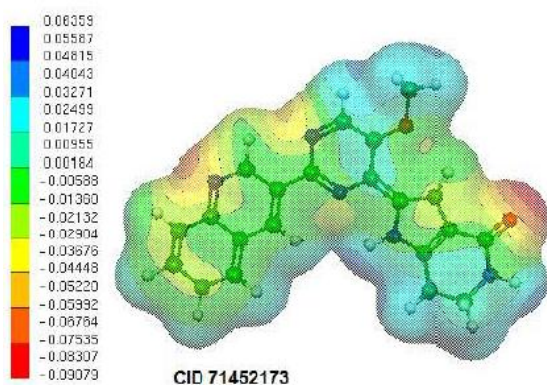


Cont. Fig. 4

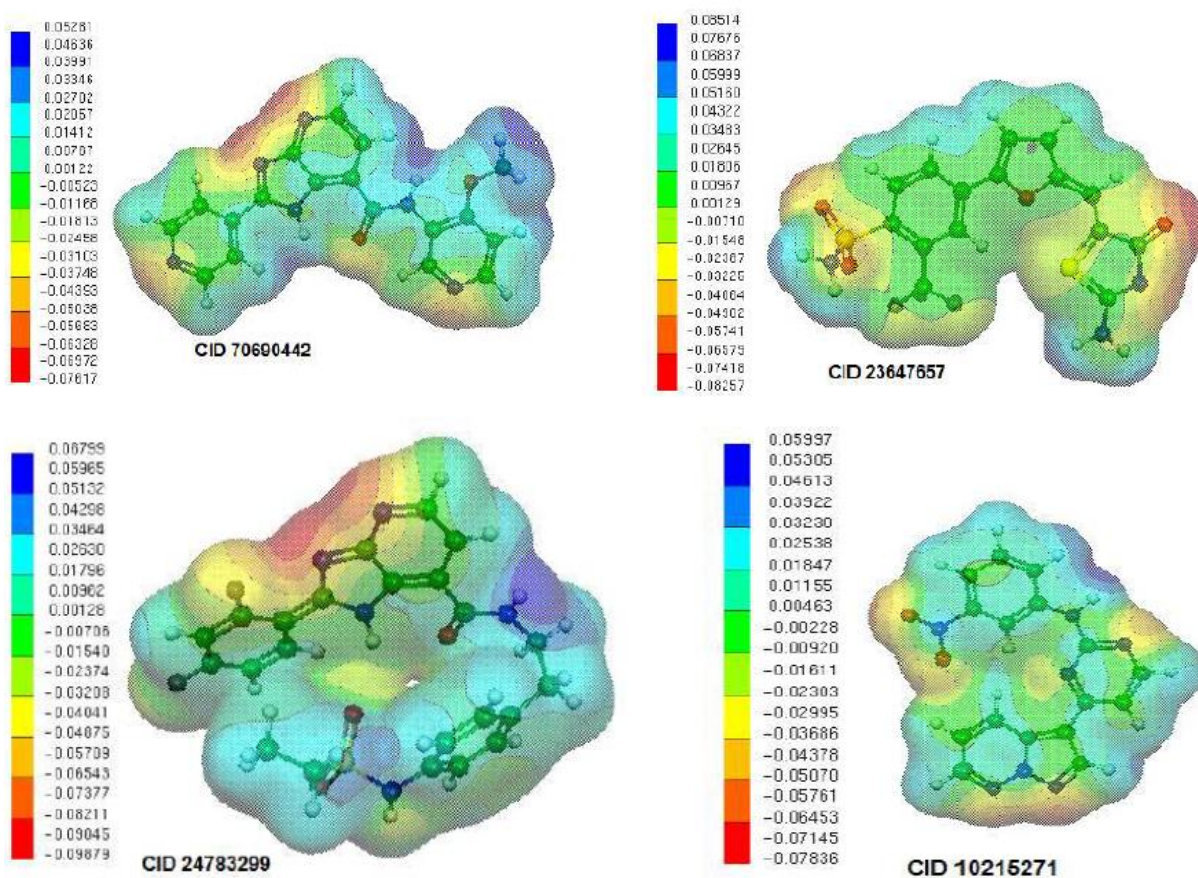




Cont. Fig. 4



Cont. Fig. 4

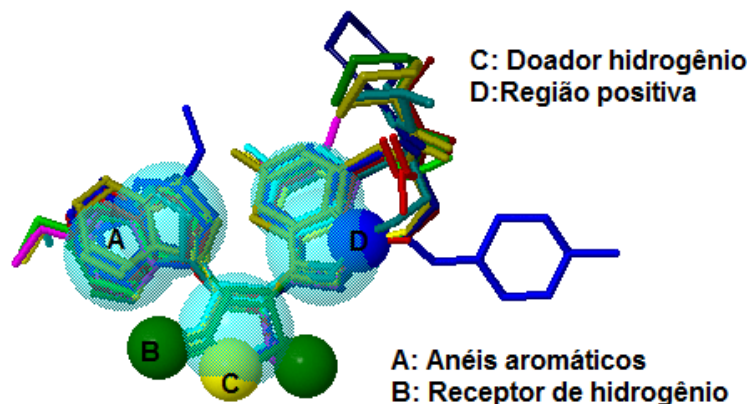


#### 5.4 DERIVAÇÃO DO FARMACÓFORO

De acordo com 32 moléculas com maior atividade inibitória para GSK-3 $\beta$  foram analisados no webserver PharmaGist para a derivação de um padrão farmacofórico comum. A figura 5 mostra o resultado com a pontuação mais alta (79), respectivo a um conjunto de 11 moléculas alinhadas com quatro grupos comuns farmacofóricos: 5 anéis aromáticos (dos grupos indol, benzofurano e anel 1-pirrol-2,5-diona), dois aceptores de ligação de hidrogênio (dois oxigênios da carbonila do grupo 1-pirrol-2,5-diona), 1 doador de ligação de hidrogênio (amina do anel 1-pirrol-2,5-diona) e uma região positiva.



**Figura 5** - Melhor modelo farmacofórico alinhado com 32 inibidores de GSK-3 $\beta$  usando o Webservidor PharmaGist.



Cálculo do farmacóforo é essencial na proposição de novas moléculas, para que não se perca as características farmacológicas necessárias para o efeito biológico, além de um modelo básico fundamental para estudos ADME/Tox. Estas características são centros hidrofóbicos, anéis aromáticos, receptores de ligação de hidrogênio, doadores de ligação de hidrogênio, grupos ionizáveis positivos e negativos (AGRAWAL et al., 2013).

Braga et al. (2015) encontraram como resultado usando o webservidor PharmaGist, um padrão farmacofórico de 30 inibidores de GSK- contendo quatro grupos farmacofóricos comuns: dois anéis aromáticos e dois aceptores de ligações de hidrogênio (grupo pirimidina).

## 5.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS – PARÂMETROS DE LIPINSKI

Os 40 inibidores mais ativos de acordo com o  $Cl_{50}$  no **BindingDB** foram organizados em ordem crescente de  $Cl_{50}$  para avaliação dos parâmetros físico-químicos relacionados à regra dos 5 de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997) (Tabela 2).

De acordo com Lipinski et al. (1997), para uma droga apresentar uma boa biodisponibilidade oral, deve satisfazer pelo menos três dos seguintes parâmetros: peso molecular inferior ou igual a 500 Daltons (Da), elevada lipofilicidade (LogP inferior a 5), número de doadores de hidrogênio menores 5, o número de aceptores de hidrogênio inferior a 10. No entanto, para atingir o tecido cerebral, é necessário critérios mais rigorosos.

Adaptando a regra dos cinco de Lipinski, para uma boa penetração no SNC, é provável se a molécula satisfazer pelos menos três dos parâmetros: Peso Molecular  $\leq 400$ ;  $\log P \leq 5$ ; doador de ligação de hidrogênio  $\leq 3$ ; aceitor de ligação de hidrogênio  $\leq 7$  (LENZ; PAJOUHESH, 2005; RANKOVIC, 2015). Os inibidores que violaram somente um parâmetro foram os de número 1, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, e 40 da tabela 3 abaixo.

**Tabela 3** - Parâmetros físico-químicos relacionados com RO5 para seleção de inibidores da GSK-3 $\beta$  ranqueados de forma crescente de Cl<sub>50</sub>.

	INIBIDORES	Cl <sub>50</sub> nM	PESO MOLECULAR	logP	DOADOR	ACEPTOR	VIOLAÇÕES
1	CID 44219658	0,14	484,54632 g / mol	-3.65	1	6	1
2	CID 44582838	0,23	386,40002 g / mol	-3.01	1	4	0
3	CID 44582642	0.35	390.36390 g / mol	-3.89	2	5	0
4	CID 12018155	0.4	425.86490 g / mol	-3.13	4	5	2
5	CID 44582745	0.51	451.26950 g / mol	-3.24	2	4	1
6	CID 9957049	0.56	486,31408 g / mol	-2.06	4	9	3
7	CID 56950795	0.57	394.40226 g / mol	-3.85	3	9	1
8	CID 11560568	0.6	409.41030 g / mol	-3.51	4	6	2
9	CID 56945119	0.6	393.41420 g / mol	-4.05	2	8	1
10	CID 44456875	0.7	425,28188 g / mol	2.74	2	6	1
11	CID 10029385	0.7	512.53490 g / mol	-3.51	1	5	1
12	CID 44582855	0.73	416,42610 g / mol	-3.86	2	5	1
13	CID 6539574	0.8	373,20402 g / mol	0.60	3	4	0
14	CID 16760286	0.8	346,33946 g / mol	-4.32	2	4	0
15	CID 57399952	0.86	382.39156 g / mol	-4.85	2	8	1
16	CID 44582684	0.95	424.80896 g / mol	-4.11	2	5	1
17	CID 9869237	1	468.50064 g / mol	-2.6	4	7	2
18	CID 12018144	1	375,42044 g / mol	-2.48	3	4	0
19	CID 57403370	1	382.39156 g / mol	-5.0	2	8	1
20	CID 6539584	1	430.29840 g / mol	0.29	3	5	1
21	CID 6539575	1	328,75302 g / mol	-0.32	3	4	0
22	CID 57766857	1	439,48754 g / mol	-2.36	3	7	1
23	CID 44582857	1.2	414,41012 g / mol	-2.73	2	5	1

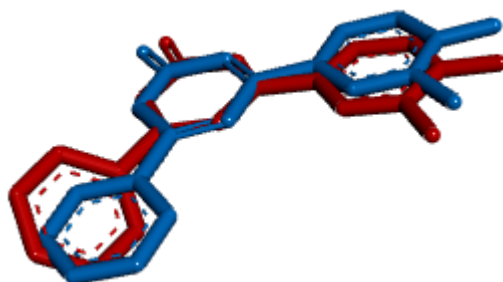
24	CID 11248978	1.3	496,51726 g / mol	-3.97	1	5	1
25	CID 11328863	1.3	469,49192 g / mol	-2.47	1	5	1
26	CID 57391251	1.4	392.42614 g / mol	-2.52	2	7	0
27	CID 71452173	1.49	371,39198 g / mol	-2.62	2	5	0
28	CID 44456876	1.5	444,52882 g / mol	-1.06	3	6	1
29	CID 11316975	1.6	454.48058 g / mol	-3.63	1	4	1
30	CID 11294864	1.6	494,54444 g / mol	-2.9	1	4	1
31	CID 46880335	1.8	394.39566 g / mol	-2.35	3	5	0
32	CID 5327711	1.8	317.34130 g / mol	-2.5	2	3	0
33	CID 45272193	2	516.97228 g / mol	-2.48	4	7	2
34	CID 57766728	2	359.38128 g / mol	-2.20	2	5	0
35	CID 70686290	2	379.79976 g / mol	-2.58	2	5	0
36	CID 70690442	2	346.34276 g / mol	-3.83	2	6	0
37	CID 23647657	2	417.38281 g / mol	-1.47	2	9	2
38	CID 24783299	2	485.50634 g / mol	-1.74	3	8	2
39	CID 10215271	2	333.30424 g / mol	-1.9	1	7	0
40	CID 42629114	2.3	439.48908 g / mol	0.87	0	7	1

---

## 5.6 DOCKING MOLECULAR

A fim de realizar cálculos de ancoragem com o software AutoDock Vina 1.5.6 (PYTHON, 1999), foi selecionada a estrutura de GSK-3 $\beta$  depositada no Protein Data Bank (PDB) sob o código PDB ID: 3Q3B. Após a simulação de acoplamento, a validação do resultado foi feita através do cálculo do RMSD (Raiz-Meio-Quadrado, de 0,8812 Å) entre o resultado cristalográfico experimental representado (resolução de 2.7 Å) e a solução de encaixe melhor classificada obtida para o mesmo inibidor com auxílio do programa Discovery Studio Visualizer 4.0 (DIETRICH, 1995) (Figura 6).

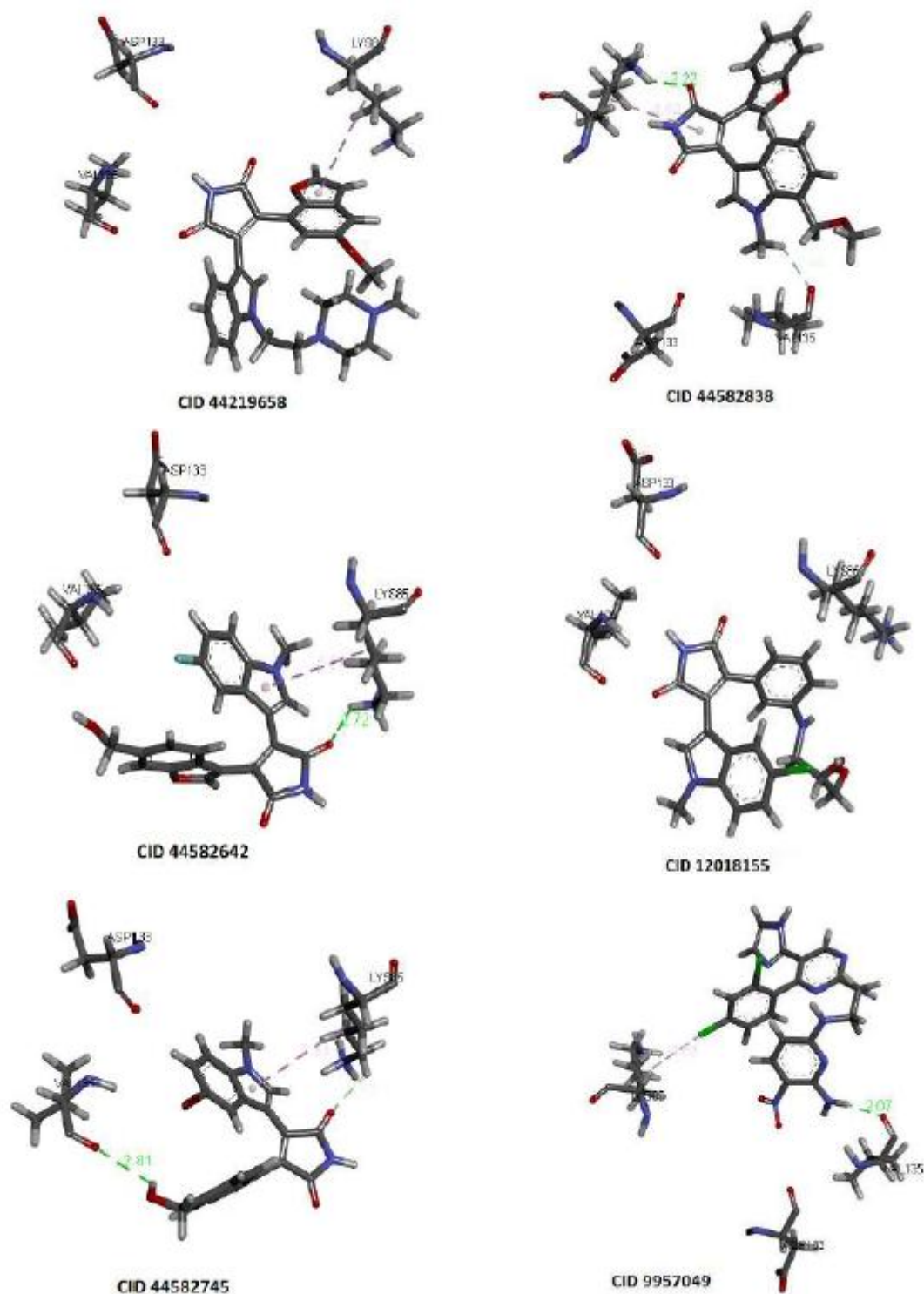
**Figura 6** - Reprodução de pose cristalográfica do inibidor 4-(4-hidroxi-3-metilfenil) -6-fenilpirimidina-2 (5H) -ona (Vermelho) e a solução de encaixe melhor classificado (azul). Simulação foi realizada utilizando o software AutoDock Vina 1.5.6.



De acordo com Cole et al. (2005), o modo de predição de ligação utilizando “docking”, com RMSD menos de 2 Å sobre a pose cristalográfica do ligando é considerado bem sucedida.

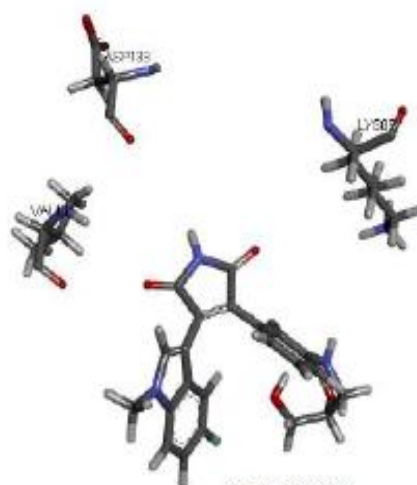
Simulações de “docking” foram realizadas para todos os 40 inibidores e as análises mostraram a presença de ligações de hidrogênio convencionais e não convencionais e interações hidrofóbicas entre os resíduos Lys85, Asp133 e Val135 da enzima e a maioria dos inibidores (Figura 7).

**Figura 7** - Soluções de encaixe para os inibidores e suas interações com o sítio ativo de GSK-3 $\beta$ : ligações de hidrogênio convencionais (verde), ligações de hidrogênio não-convencionais (azul) e interações hidrofóbicas (rosa). As simulações foram realizadas utilizando o software AutoDock Vina 1.5.6.

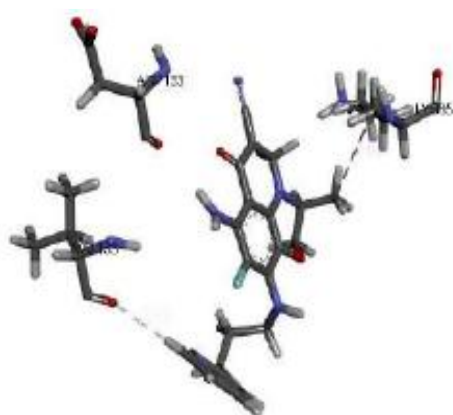




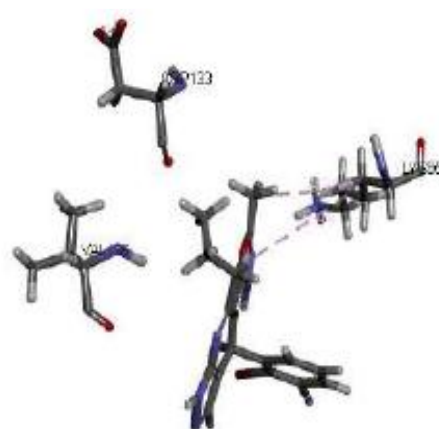
CID 56950795



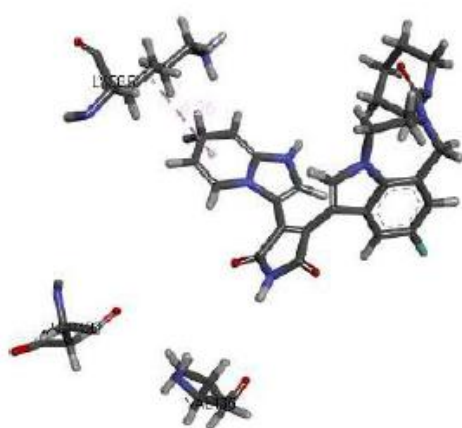
CID 11560568



CID 56945119



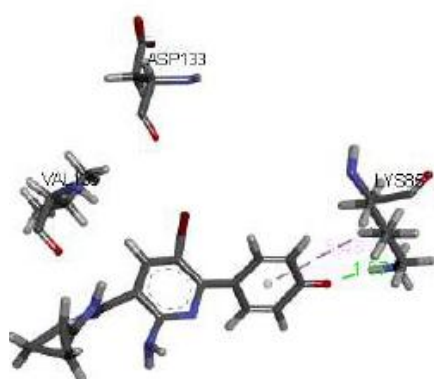
CID 44456875



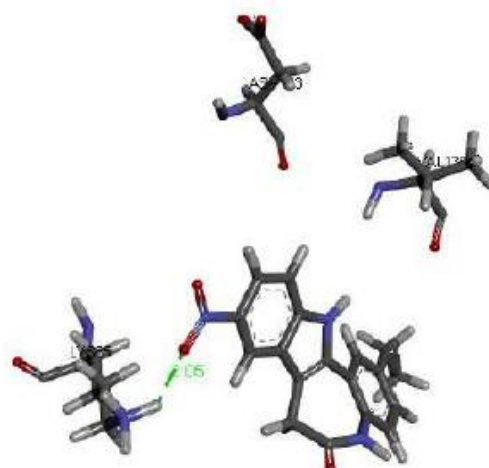
CID 10029385



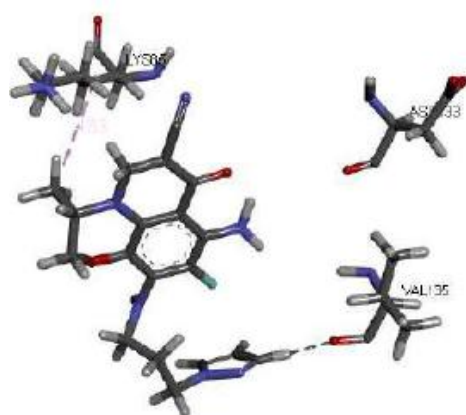
CID 44582855



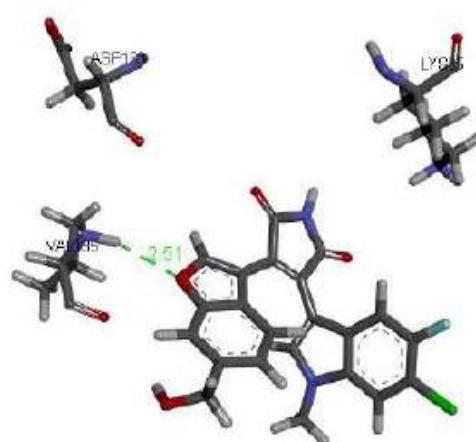
CID6539574



CID 16760286



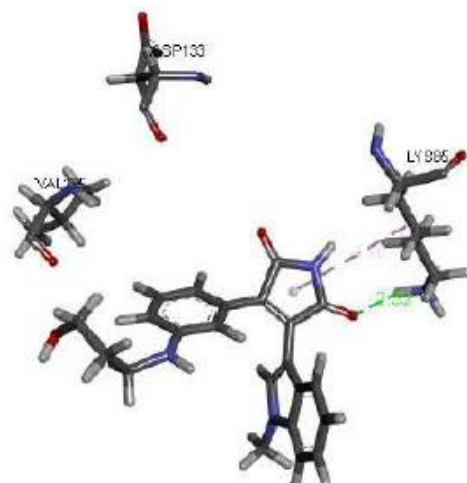
CID 57399952



CID 44582684

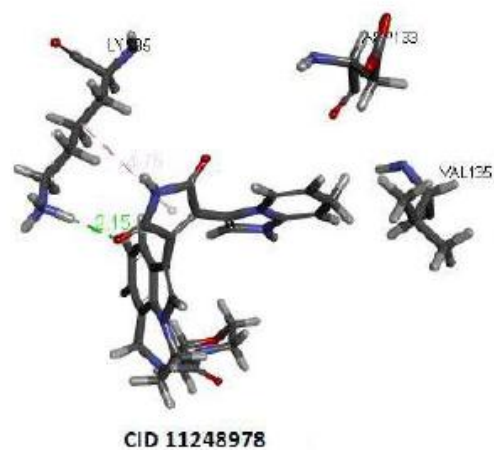
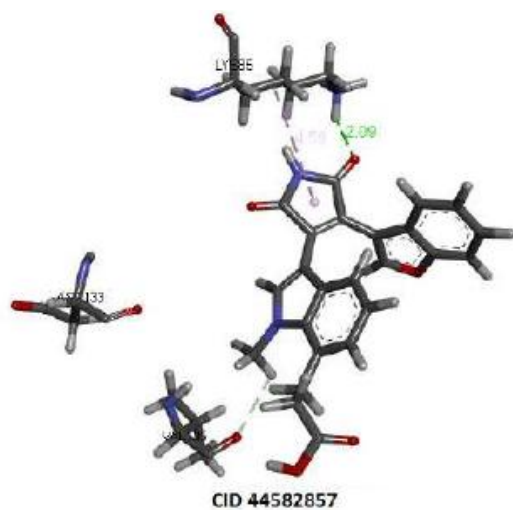
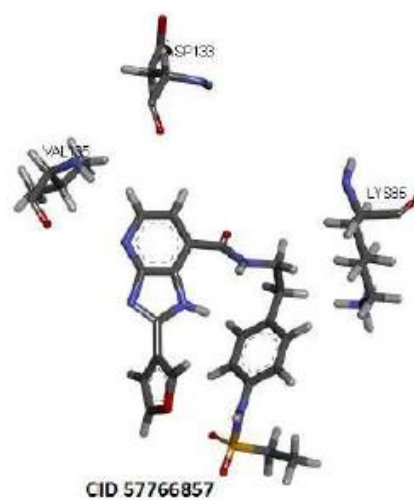
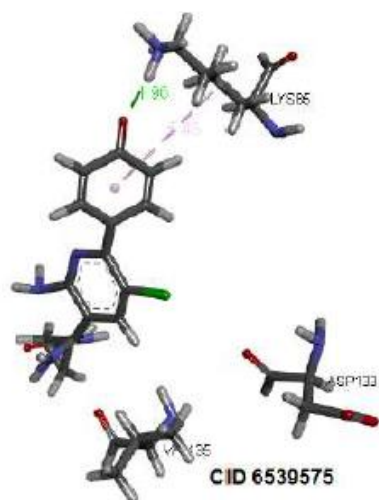
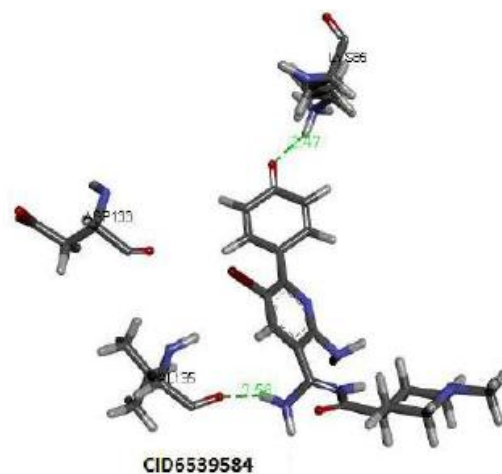
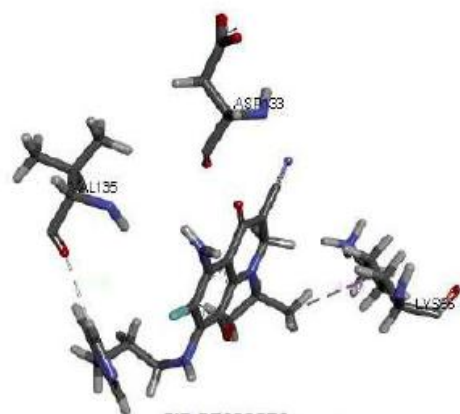


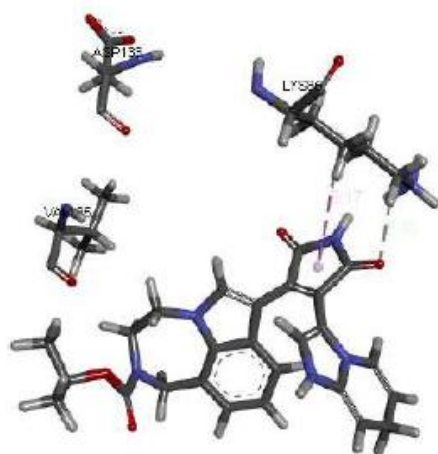
CID 9869237



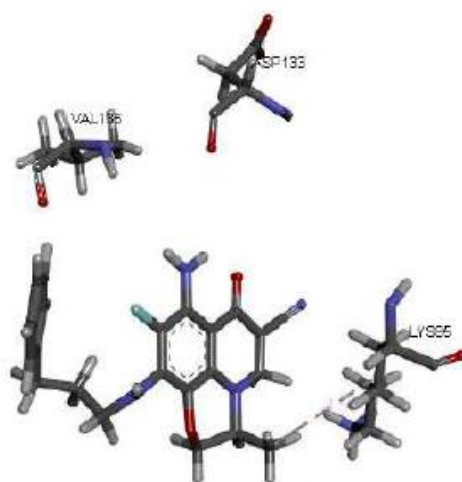
CID 12018144



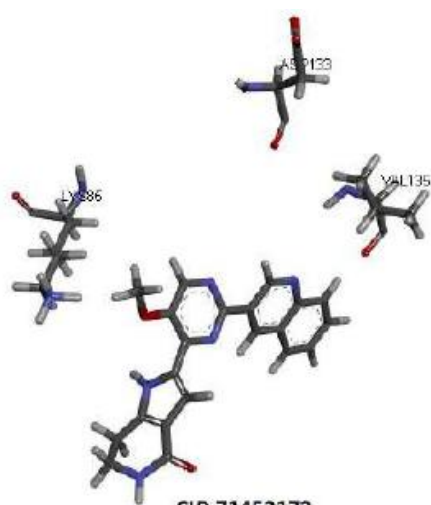




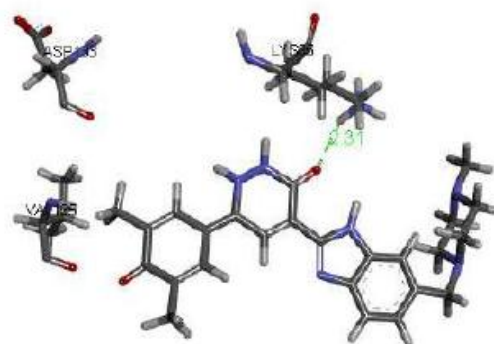
CID 11328863



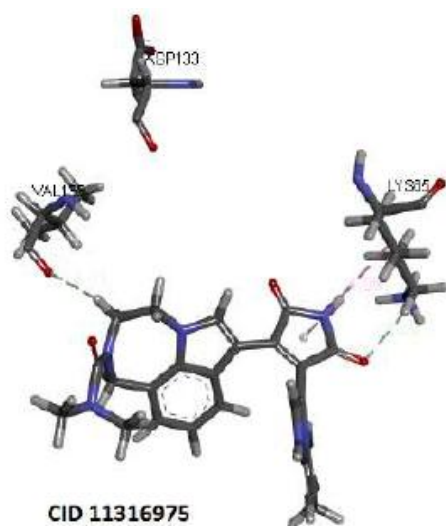
CID 57391251



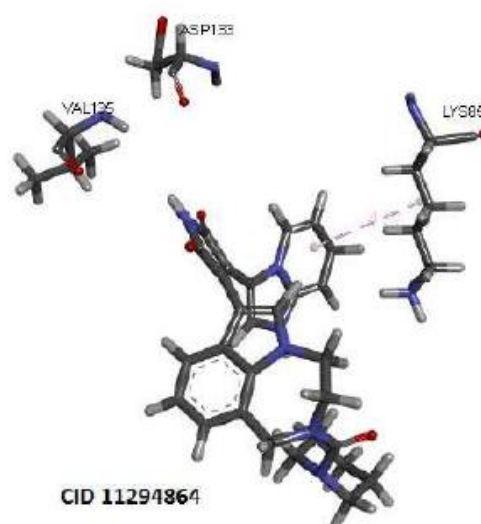
CID 71452173



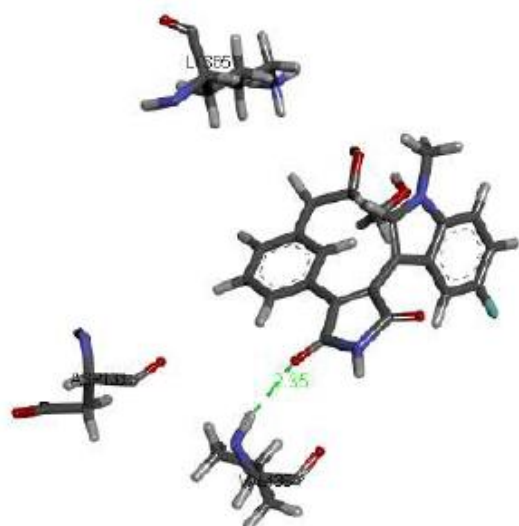
CID 44456876



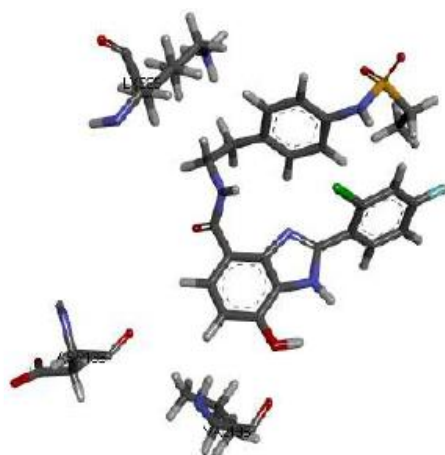
CID 11316975



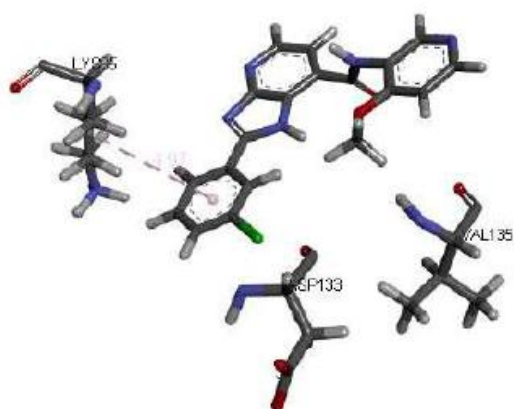
CID 11294864



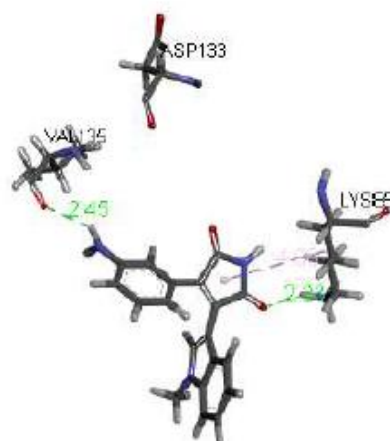
CID 46880335



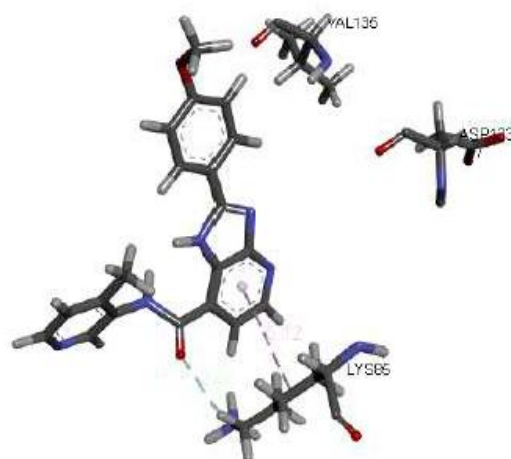
CID 45272193



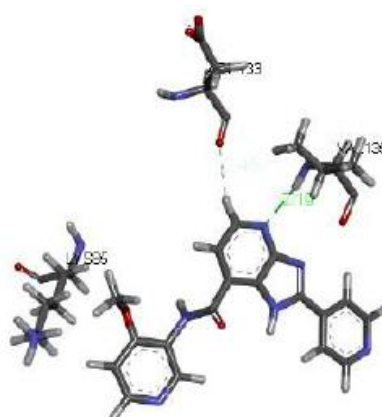
CID 70686290



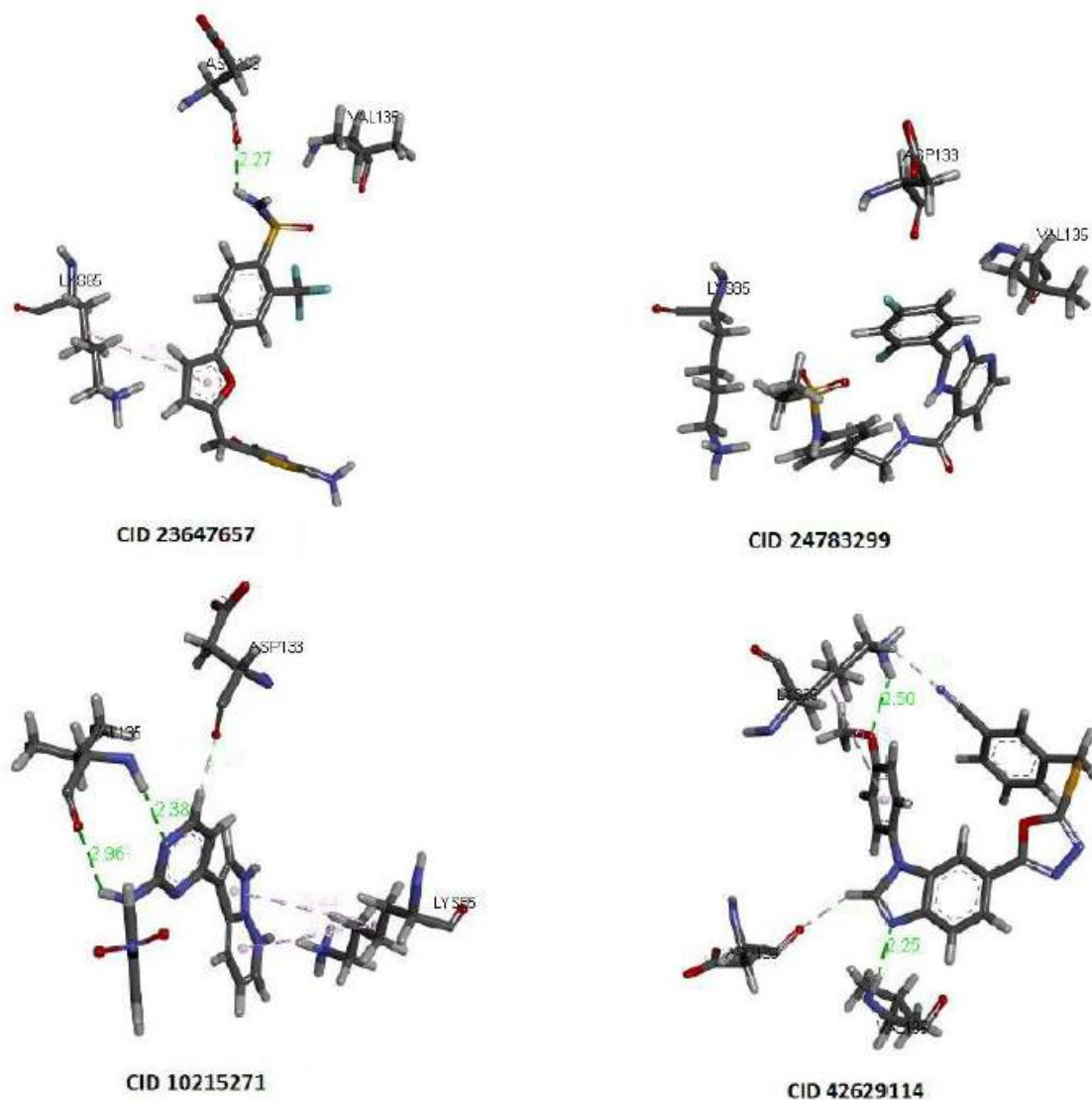
CID 5327711



CID 57766728



CID 70690442



A Tabela 4 mostra as distâncias (em Ångstroms) entre os aminoácidos do sítio ativo de GSK-3 $\beta$  e os inibidores.

**Tabela 4** - Análise do resultado do Docking Molecular gerado pelo AutoDock Vina

INIBIDOR	Aminoácidos do Sítio Ativo GSK3Beta	Átomos Envolvidos	Tipos de Interação	Distância (Å)	Affinity (Kcal/mol)
CID44219658	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	5,14	-8.9
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID44582838	Lys85	Ligante – Lys85 HZ3 – O4	Hidrofóbica Lig. de H Convencional	4,62 2,22	-8.7
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H10 – O	Lig. de H Carbônica	2,44	
CID44582642	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	5,27	-10.1

		HZ3 – O3	Lig. de H Convencional	2,72	
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID16760286	Lys85	HZ3 – O3	Lig. de H Convencional	2,05	-9.3
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID44582745	Lys85	Ligante – Lys85 HE2 – O3	Hidrofóbica Lig. de H Carbônica	5,33 2,43	-10.3
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H44 – O	Lig. de H Convencional	2,81	
CID10029385	Lys85	Lys85 - Ligante	Hidrofóbica	4,26	-10
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID56950795	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	4,59	-8.5
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H17 – O	Lig. de H Carbônica	2,62	
CID12018144	Lys85	Ligante – Lys85 HZ3 – O1	Hidrofóbica Lig. de H Convencional	4,9 2,32	-8.1
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID56945119	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	4,62	-8.7
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H18 – O	Lig. de H Carbônica	2,58	
CID44456875	Lys85	C26 – Lys85 Ligante – Lys85	Hidrofóbica Hidrofóbica	4,34 5,44	-8.1
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID10215271	Lys85	Ligante – Lys85 Ligante – Lys85	Hidrofóbica Hidrofóbica	5,04 5,44	-8.6
	Asp133	H7 - O	Lig. de H Carbônica	2,2	
	Val135	H29 – O	Lig. de H Convencional	2,96	
		HN – N8	Lig. de H Convencional	2,38	
CID44582855	Lys85	Ligante – Lys85 HZ3 – O4	Hidrofóbica Lig. de H Convencional	4,61 2,1	-8.3
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H8 – O	Lig. de H Carbônica	2,36	
CID6539574	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	5,48	-7.9

		NZ – O3	Lig. de H Convencional	1,97	
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID23647657	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	5,26	-7.7
	Asp133	H35 – O	Lig. de H Convencional	2,27	
	Val135	-	-	-	
CID57399952	Lys85	C16 – Lys85	Hidrofóbica	4,63	-8.4
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H20 – O	Lig. de H Carbônica	2,72	
CID44582684	Lys85	-	-	-	-9.3
	Asp133	-	-	-	
	Val135	HN – O3	Lig. de H Convencional	2,51	
CID9957049	Lys85	Cl – Lys85	Hidrofóbica	4,53	-8.1
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H50 – O	Lig. de H Convencional	2,07	
CID12018155	Lys85	-	-	-	-9.3
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID57403370	Lys85	C16 – Lys85	Hidrofóbica	4,49	-8.0
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H19 – O	Lig. de H Carbônica	2,78	
CID9869237	Lys85	-	-	-	-8.7
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H49 – O	Lig. de H Convencional	2,27	
CID6539584	Lys85	HZ3 – O3	Lig. de H Convencional	2,47	-8.1
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H41 - O	Lig. de H Convencional	2,58	
CID57766857	Lys85	-	-	-	-7.8
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID44582857	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	4,59	-8.8
		HZ3 – O3	Lig. de H Convencional	2,09	
	Asp133	-	-	-	
CID11294864	Val135	H13 – O	Lig. de H Carbônica	2,67	-9.5
	Lys85	Lys85 - Ligante	Hidrofóbica	4,37	
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	

CID11560568	Lys85	-	-	-	-8.0
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID57391251	Lys85	C14 – Lys85	Hidrofóbica	4,56	-8.9
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID71452173	Lys85	-	-	-	-8.2
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID44456876	Lys85	HZ3 – O1	Lig. de H Convencional	2,31	-9.6
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID11328863	Lys85	Ligante – Lys85 HE2 – O4	Hidrofóbica Lig. de H Carbônica	5,17 2,38	-8.6
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID11316975	Lys85	Ligante – Lys85 HE2 – O3	Hidrofóbica Lig. de H Carbônica	4,99 2,49	-8.9
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H5 – O	Lig. de H Carbônica	3,01	
CID46880335	Lys85	-	-	-	-8.6
	Asp133	-	-	-	
	Val135	HN – O4	Lig. de H Convencional	2,35	
CID5327711	Lys85	Ligante – Lys85 HZ3 – O1	Hidrofóbica Lig. de H Convencional	4,98 2,23	-8.4
	Asp133	-	-	-	
	Val135	H38 – O	Lig. de H Convencional	2,45	
CID45272193	Lys85	-	-	-	-8.8
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID57766728	Lys85	Ligante – Lys85 HE2 – O1	Hidrofóbica Lig. de H Carbônica	5,12 2,6	-9.2
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID70686290	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	4,97	-8.3
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID70690442	Lys85	-	-	-	-8.2
	Asp133	H4 – O	Lig. de H Carbônica	2,46	

	Val135	HN – N5	Lig. de H Convencional	2,19	
CID24783299	Lys85	-	-	-	-9.0
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID6539575	Lys85	HZ3 – O3	Lig. de H Convencional	1,96	-7.9
		Ligante – Lys85	Hidrofóbica	5,46	
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID11248978	Lys85	NZ3 – O3	Lig. de H Convencional	2,15	-10.1
		Ligante – Lys85	Hidrofóbica	4,75	
	Asp133	-	-	-	
	Val135	-	-	-	
CID42629114	Lys85	Ligante – Lys85	Hidrofóbica	5,43	-9.2
		HZ3 – O3	Lig. de H Convencional	2,5	
		HE2 – N8	Lig. de H Carbônica	2,39	
	Asp133	H9 – O	Lig. de H Carbônica	2,53	
	Val135	HN – N5	Lig. de H Convencional	2,25	

As ligações de hidrogênio convencionais são caracterizadas quando uma molécula aceptora de prótons interage com uma molécula doadora de prótons devido à diferença de eletronegatividade. Este tipo de acoplamento ocorre entre átomos eletronegativos, tais como flúor, oxigênio e nitrogênio. Por outro lado, as ligações de hidrogênio não convencionais ocorrer entre átomos com eletronegatividade elevada (doador ou aceptor) e carbonos (por meio de  $\pi$  elétrons). Ligação de hidrogênio convencional foi de grande importância nas ligações, juntamente com as interações hidrofóbicas principalmente em Lys85, cujo aminoácido, foi quem mais fez interações com quase todos inibidores e em seguida o aminoácido Val135, indicando que ambos são os mais participativos do que Asp 133, o qual fez menos interações. No entanto, os inibidores CID11560568, CID12018155, CID24783299, CID45272193, CID57766857, CID71452173 não apresentaram nenhum tipo de ligação ou interação com os aminoácidos do sítio catalítico.



## 5.7 ADME/Tox SCREENING

O sucesso no desenvolvimento de uma nova droga depende de uma série de critérios que têm de ser atendidas. O mais importante, é claro, é que ela exiba substancial atividade benéfica no tratamento de uma doença particular. Isto implica que, para além da atividade intrínseca, a droga é capaz de atingir o seu alvo e não produzir efeitos tóxicos drásticos. Muitas drogas ativas falham na fase II ou III do processo de desenvolvimento, porque eles não chegam ao seu destino pretendido. Diante disso, o desenvolvimento de ferramentas capazes de prever os fatores relacionados com a disponibilidade de drogas no local alvo, ou biodisponibilidade oral, seria, por conseguinte, aumentar grandemente a capacidade para desenvolver drogas viáveis (ARTURSSON et al., 1998).

Na tabela 4, encontram-se as predições farmacocinéticas relacionadas à absorção dos 40 inibidores selecionados. A via oral de administração de medicamentos é preferida, em virtude da sua conveniência, baixo custo e elevada adesão do paciente em comparação com outras vias. No entanto, substâncias destinadas a administração por via oral devem ter solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal adequada para atingir concentrações terapêuticas (ARMSTRONG et al., 2009). O intestino humano é um local de absorção por excelência sendo o principal órgão para tal finalidade. Desta maneira é imperioso planejar moléculas bioativas que tenham um bom perfil de absorção intestinal. A tabela 4 mostra que todos os inibidores apresentam um ótimo perfil de absorção intestinal, acima de 80%, ou seja, na análise de HIA, observa-se que os valores variaram de 84.741068%(CID 9957049), inibidor 6, a 99.331147% (CID 42629114), inibidor 19.

Células Caco-2 tem sido o modelo de célula mais extensivamente caracterizada e útil no campo da permeabilidade e absorção de drogas. Estas células são derivadas de adenocarcinoma do cólon humano, após sofrerem diferenciação em enterócitos em cultura e são polarizados com junções apertadas bem estabelecidos (KLOPMAN; SAIKHOV; STEFAN, 2002). Uma vez que as características de permeação de fármacos através das monocamadas de células Caco-2 correlacionam-se com as características de permeação da mucosa intestinal humana, têm sido sugerido que as células

Caco-2 podem ser utilizadas para prever a absorção oral de fármacos em seres humanos (LI, 2001).

No entanto, modelos de células Caco-2, apresentam diversas deficiências, como o raio de poros paracelular, que é estimada em  $\sim 3.7 \pm 0,1 \text{ \AA}$ , enquanto dos poros no intestino delgado humano são estimados em  $9,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$ , o valor de resistência eléctrica trans-epitelial (TEER) é de  $234 \text{ } \Omega \text{ cm}^2$  em células Caco-2 (o TEER intestinal é estimada como sendo na faixa de  $25\text{-}40 \text{ } \Omega \text{ cm}^2$ ). (ARTURSSON et al., 2003). Diferenças significativas foram observadas em níveis de transportadores e enzimas metabolizadoras expressos em duodeno humano e células Caco-2. Estas diferenças podem explicar a falta de correlação da *in vitro* de Caco-2 a permeabilidade celular com absorção *in vivo* para vários compostos bem absorvidos, por exemplo, antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, glucose e inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ACE), que são conhecidos por serem absorvidos através de processos mediados por transportadores (ARTURSSON et al., 2003). Embora transportadores farmacologicamente importantes (por exemplo, transportadores de peptídeos, cation transportador orgânico e etc.) são expressos em células Caco-2, eles são quantitativamente inferiores quando comparado com os níveis de produção *in vivo*, além de não expressarem quantidades apreciáveis de CYP3A4, o principal CYP presente em células epiteliais humanas (BALIMANE; CHONG, 2005).

Permeabilidade em células Caco-2 ( $P_{\text{Caco2}}$ ) mostrado na tabela 4, como proposto por Glynn et al. (1998), indica que a maioria dos inibidores apresentou um intervalo entre, média ( $4 \leq x \leq 70$ ), cujos valores mínimo e máximo correspondem, respectivamente, aos inibidores 8 (CID 10215271=  $6.07977 \text{ nm/s}$ ) e 20 (CID 4421968=  $46.7097 \text{ nm/s}$ ), nenhum apresentou alta permeabilidade ( $\geq 70$ ). Os inibidores 17, 18, 22, 29 e 37, apresentaram valores inferiores a 4.

Células Madin-Darby de rim canino (MDCK) diferenciam-se em células epiteliais colunares e formam junções apertadas (como células Caco-2) quando cultivadas em membranas semipermeáveis (UNGELL, 2004).

Para fins de comparação, a permeabilidade obtida com células MDCK correlacionada igualmente bem (como com a permeabilidade determinada em células Caco-2) para a absorção humana (UNGELL, 2004). Porém, dado o fato

de células Caco-2 são derivadas de células de carcinoma do cólon humano enquanto que as células MDCK são derivadas de células de rim de cão, é muito provável que o nível de expressão de vários transportadores podem ser grosseiramente diferentes nestas duas linhas celulares. (CHEONG et al., 1999).

Uma das principais vantagens de células MDCK em relação as células Caco-2 é o mais curto período de cultura (três dias contra três semanas). Um menor tempo de cultura de células torna-se uma vantagem significativa considerando o trabalho reduzido e tempo de inatividade em caso de contaminação de células (CHEONG et al., 1999).

Na tabela 5, observa-se que apenas o CID 5327711 apresentou alta permeabilidade em células MDCK (>25), enquanto que todos os outros apresentaram baixa permeabilidade (menor que 25).

**Tabela 5** - Propriedades de absorção dos 40 inibidores de GSK-3 $\beta$ .

INIBIDORES	Absorção		
	P <sub>CACO2</sub> (nm/s) <sup>[a]</sup>	P <sub>MDCK</sub> (nm/s) <sup>[b]</sup>	HIA (%) <sup>[c]</sup>
1 CID 44219658	46,7097	0,17038	97,10993
2 CID 44582838	24,9173	12,92486	96,81666
3 CID 44582642	21,1283	2,30772	95,66665
4 CID 12018155	20,7527	0,78883	92,5051
5 CID 44582745	21,355	0,0413	96,57435
6 CID 9957049	15,4493	0,06114	84,74106
7 CID 56950795	18,3415	0,76938	92,48715
8 CID 11560568	20,6249	1,66387	90,94047
9 CID 56945119	20,4748	0,34846	95,73804
10 CID 44456875	16,8688	1,05062	91,75553
11 CID 10029385	24,561	0,64889	97,03157
12 CID 44582855	21,3627	2,86851	95,74185
13 CID 6539574	20,0959	0,41045	92,0675
14 CID 16760286	21,0576	5,20615	89,07232
15 CID 57399952	18,6159	4,96201	94,82901

16	CID44582684	21,4079	0,12416	96,21366
17	CID 9869237	7,61607	0,06793	88,28192
18	CID 12018144	20,941	9,02824	93,81382
19	CID 57403370	14,1135	6,0187	94,81631
20	CID 6539584	20,8131	0,34963	92,99135
21	CID 6539575	19,2183	1,77362	90,95909
22	CID 57766857	0,75831	5,21189	88,52159
23	CID 44582857	20,6087	0,17382	98,16562
24	CID 11248978	23,2305	2,04712	97,32339
25	CID 11328863	22,5659	1,34391	97,30951
26	CID 57391251	18,1806	0,10763	95,27269
27	CID 71452173	17,6017	0,78616	92,02138
28	CID 44456876	3,7557	0,50507	90,94865
29	CID 11316975	22,094	7,42748	97,06603
30	CID 11294864	22,9902	2,29844	97,03031
31	CID 46880335	21,0201	0,78471	93,40597
32	CID 5327711	21,0165	50,07631	95,39147
33	CID 45272193	0,78365	0,05808	90,52799
34	CID 57766728	23,0394	12,16548	91,77242
35	CID 70686290	17,0492	9,74311	92,80917
36	CID 70690442	11,0043	1,81138	90,43212
37	CID 23647657	0,37332	0,05593	89,08359
38	CID 24783299	1,2851	0,29478	91,13809
39	CID 10215271	6,07977	6,46226	94,9151
40	CID 42629114	37,9756	0,11989	99,33114

Notas: [a]: percentagem de absorção intestinal humana; [b]: Permeabilidade de células caco-2 em nm/sec); [c]: Permeabilidade de células de Maden Darby Canine Kidney em nm/sec;

A quantidade de uma substância que se liga à proteína depende de três fatores: a concentração da substância livre; sua afinidade pelos sítios de ligação; e a concentração de proteína. Em concentrações terapêuticas no plasma, muitos fármacos encontram-se principalmente na forma ligada. A fração da substância que permanece livre em solução aquosa pode ser apenas de 1%, estando o restante associado às proteínas plasmáticas. Desta maneira, a ligação a proteínas plasmáticas influencia sobremaneira na meia-vida

biológica de um fármaco, haja vista, que a substância não ligada constitui a forma farmacologicamente ativa (BRUNTON; HILAL-DANDAN, 2008).

A porcentagem de *plasma protein binding* (PPB %), na tabela 5, mostra que os inibidores CID5327711, CID6539575, CID6539584, CID11248978, CID11560568, CID12018144, CID12018155, CID44219658, CID44456875, CID44456876, CID44582684, CID46880335, CID56945119, CID56950795, CID57391251, CID57399952, CID57403370, CID57766728, CID70690442 e CID71452173 apresentam ligação fraca as proteínas plasmáticas (menor que 90%), enquanto que o restante apresenta forte ligação às proteínas plasmáticas (maior que 90%).

O sistema nervoso central (SNC) representa um desafio especial para a terapia farmacológica. Ao contrário da maioria das outras regiões anatômicas, o SNC está particularmente bem isolado de substâncias estranhas. A barreira hematoencefálica utiliza junções firmes especializadas para impedir a difusão passiva da maioria dos fármacos da circulação sistêmica para a circulação cerebral. Por conseguinte, os fármacos destinados a atuar no SNC devem ser pequenos o suficiente e hidrofóbicos para atravessar facilmente as membranas biológicas, ou devem utilizar as proteínas de transporte existentes na barreira hematoencefálica para penetrar nas estruturas centrais (ARMSTRONG et al., 2009).

Chen et al. (2005) estabelecem que substâncias com valores de  $C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}} > 1$  são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e substâncias com valores menor que 1 não ultrapassam a barreira hematoencefálica. Analisando a Tabela 6, observa-se que todos inibidores não apresentam absorção cerebral, já que possuem valores menores que 1.

**Tabela 6** - Propriedades de distribuição em percentagem de PPB e penetração na barreira hematoencefálica dos inibidores de GSK-3 $\beta$ .

INIBIDORES	Distribuição	
	$C_{\text{Brain}}/C_{\text{Blood}}$ <sup>[a]</sup>	PPB(%) <sup>[b]</sup>
1 CID 44219658	0,23248	80,75784
2 CID 44582838	0,23546	94,70659
3 CID 44582642	0,01352	90,10478
4 CID 12018155	0,10145	86,05378
5 CID 44582745	0,01557	91,17869
6 CID 9957049	0,08201	95,15506
7 CID 56950795	0,02116	71,01388
8 CID 11560568	0,07179	82,63323
9 CID 56945119	0,01234	78,1038
10 CID 44456875	0,31733	85,3057
11 CID 10029385	0,13085	91,10926
12 CID 44582855	0,01872	91,3878
13 CID 6539574	0,10147	94,29095
14 CID 16760286	0,31352	96,97548
15 CID 57399952	0,01182	57,75192
16 CID 44582684	0,01747	89,89295
17 CID 9869237	0,1554	96,90317
18 CID 12018144	0,05743	87,98283
19 CID 57403370	0,01342	45,70886
20 CID 6539584	0,06683	49,25603
21 CID 6539575	0,09504	84,89036
22 CID 57766857	0,05349	99,25271
23 CID 44582857	0,17628	96,55531
24 CID 11248978	0,07665	85,95911
25 CID11328863	0,11393	98,62115
26 CID 57391251	0,04381	85,61217
27 CID 71452173	0,19458	81,00398
28 CID 44456876	0,30771	49,69165
29 CID 11316975	0,08759	90,11478

30	CID 11294864	0,11999	96,73281
31	CID 46880335	0,03584	87,23633
32	CID 5327711	0,67086	88,57784
33	CID 45272193	0,32804	93,38404
34	CID 57766728	0,30712	91,24556
35	CID 70686290	0,38071	91,65134
36	CID 70690442	0,08889	73,17129
37	CID 23647657	0,04718	96,67548
38	CID 24783299	0,13871	100
39	CID 10215271	0,02436	90,34815
40	CID 42629114	0,50188	100

---

Notas: [a]: penetração na barreira hematoencefálica; [b]: percentagem de ligação as proteínas plasmáticas.

Em se tratando de aspectos toxicológicos, a toxicologia *in silico*, uma das fronteiras da Toxicologia, traz um novo paradigma de avaliação da toxicidade de substâncias, no qual são feitas predições da toxicidade através de ferramentas computacionais, baseadas em modelos QSAR (*Quantitative Structure-activity Relationship*), modelos SAR (*Structure-activity Relationship*), modelos estatísticos, entre outros (HELMA, 2004; DASTON; RUSYN, 2010).

Nas predições toxicológicas feitas pelo PreADMET (<http://preadmet.bmdrc.org/>) foram selecionados, o Ames teste, o teste hERG, o teste de carcinogenicidade em camundongo e em ratos (Tabela 7).

Os testes bacterianos são particularmente indicados para a triagem, detecção e identificação de agentes genotóxicos. Uma bateria de testes com diferentes linhagens pode fornecer informações sobre a natureza dos danos causados por agentes mutagênicos. O teste bacteriano mais utilizado e reconhecido mundialmente é o teste Salmonella/Microsoma, devido a sua simplicidade, baixo custo e rapidez de execução (HOFNUNG; QUILLARDET, 1988).

Este é conhecido como teste Ames, o qual identifica substâncias que causam danos genéticos e que possam evoluir a mutações que ocorrem por deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base, cujo princípio do método, baseia-se na contagem de colônias revertentes realizado

na presença e na ausência de enzimas de metabolização (S9), de modo que, os resultados podem ser interpretados da seguinte maneira: Resultados Positivos; aumento da concentração ao longo do ensaio e/ou aumento no número de colônias com mutação reversa por placa em pelo menos uma cepa, com ou sem ativação metabólica. Os resultados positivos indicam que a substância induz mutações pontuais por substituição de bases ou deslocamento no quadro de leitura do genoma de *Salmonella typhimurium* e/ou *Escherichia coli*. Os resultados negativos sugerem que, sob as condições do ensaio, a substância teste não é mutagênica para as espécies testadas (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975; AMES; MARON, 1983). De acordo com a tabela 6, apenas os inibidores CID9869237, CID12018155, CID45272193 e CID57766857 deram resultados não mutagênicos.

Estudos toxicológicos para a verificação da toxicidade aguda de diversas substâncias, principalmente quando visam à produção de novos medicamentos, são realizados através de bioensaios em roedores. Eles permitem o monitoramento da bioatividade dessas substâncias no que diz respeito a sua possível potencialidade tóxica (BRASIL, 2013). Assim sendo, na previsão de carcinogenicidade em camudongo, os inibidores CID5327711, CID6539575, CID9869237, CID10029385, CID10215271, CID11248978, CID11294864, CID11316975, CID11328863, CID11560568, CID12018144, CID12018155, CID16760286, CID42629114, CID44456875, CID44582642, CID44582684, CID44582745, CID44582838, CID44582855, CID44582857, CID45272193, CID46880335, CID57766728, CID57766857, CID70690442 e CID71452173, tiveram predição negativa, ou seja, evidência de atividade carcinogênica, enquanto que, os inibidores de número CID6539574, CID6539584, CID9957049, CID23647657, CID24783299, CID44456876, CID56945119, CID56950795, CID57391251, CID57399952, CID57403370 e CID70686290, tiveram predição positiva, ou seja, nenhuma evidência de atividade carcinogênica (Tabela 6).

Na previsão de carcinogenicidade em ratos, os inibidores de número CID5327711, CID6539575, CID11248978, CID11294864, CID11316975, CID11328863, CID11560568, CID12018144, CID12018155, CID23647657, CID44456876, CID56945119, CID56950795, CID57391251, CID57766728 e CID71452173 tiveram predição negativa (evidência de carcinogenicidade), já



os inibidores de número CID6539574, CID6539584, CID9869237, CID9957049, CID10029385, CID10215271, CID16760286, CID24783299, CID42629114, CID44219658, CID44456875, CID44582642, CID44582684, CID44582745, CID44582838, CID44582855, CID44582857, CID45272193, CID46880335, CID57399952, CID57403370, CID57766857, CID70686290 e CID70690442 tiveram predição positiva (nenhuma evidência de carcinogenicidade).

Outra consequência toxicológica, do uso de medicamentos, importante é a síndrome do QT longo (LQTS), a qual caracteriza-se por prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma e predisposição às arritmias ventriculares malignas, sendo a taquicardia ventricular polimórfica, conhecida como *torsades de pointes*, sua arritmia característica (CAMANHO et al., 2007).

A síndrome do QT longo classificada como adquirida é causada por drogas que prolongam o intervalo QT e o fazem através do bloqueio dos canais de potássio do tipo hERG (CAMANHO; FERREIRA; MENDONÇA FILHO; PRATA; SAAD; VERONESE, 2007).

O gene humano relacionado ao *ether-a-go-go* da proteína (hERG) é um canal de potássio dependente da voltagem expresso no coração e no sistema nervoso, sendo importante para a repolarização durante o potencial da ação cardíaco. As alterações na condutância deste canal, especialmente bloqueio do canal, pode levar a um período refratário alterado e duração do potencial de ação (EDWARD et al., 2014).

Devido à sua importância na regulação adequada do potencial de ação cardíaco, interações com hERG tem causado a retirada de várias drogas do mercado, já que este fato é uma causa de arritmias e morte súbita (EDWARD et al., 2014), o que é considerado um desfecho clínico de extrema relevância (EVIDENCE-BASED MEDICINE WORKING GROUP, 1992).

**Tabela 7** - Propriedades toxicológicas de mutagenicidade (Ames teste) e carcinogenicidade (camundongo e rato) e bloqueadoras dos canais tipo hERG dos 40 inibidores de GSK-3 $\beta$ .

INIBIDORES		Mutagenicidade	Carcinogenicidade		hERG
		Ames test	Camundongo	Rato	Inibição
1	CID 44219658	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
2	CID 44582838	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
3	CID 44582642	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
4	CID 12018155	Não-mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
5	CID 44582745	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
6	CID 9957049	Mutagênico	Positivo	Positivo	Alto_risco
7	CID 56950795	Mutagênico	Positivo	Negativo	Médio_risco
8	CID11560568	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
9	CID 56945119	Mutagênico	Positivo	Negativo	Médio_risco
10	CID 44456875	Mutagênico	Negativo	Positivo	Alto_risco
11	CID 10029385	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
12	CID 44582855	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
13	CID 6539574	Mutagênico	Positivo	Positivo	Médio_risco
14	CID 16760286	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
15	CID 57399952	Mutagênico	Positivo	Positivo	Médio_risco
16	CID 44582684	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
17	CID 9869237	Não-mutagênico	Negativo	Positivo	Alto_risco
18	CID 12018144	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
19	CID 57403370	Mutagênico	Positivo	Positivo	Médio_risco
20	CID 6539584	Mutagênico	Positivo	Positivo	Médio_risco
21	CID 6539575	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
22	CID 57766857	Não-mutagênico	Negativo	Positivo	Alto_risco
23	CID 44582857	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
24	CID 11248978	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
25	CID 11328863	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
26	CID 57391251	Mutagênico	Positivo	Negativo	Alto_risco
27	CID 71452173	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco

28	CID 44456876	Mutagênico	Positivo	Negativo	Médio_risco
29	CID 11316975	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
30	CID 11294864	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
31	CID 46880335	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
32	CID 5327711	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
33	CID 45272193	Não-mutagênico	Negativo	Positivo	Alto_risco
34	CID 57766728	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
35	CID 70686290	Mutagênico	Positivo	Positivo	Médio_risco
36	CID 70690442	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
37	CID 23647657	Mutagênico	Positivo	Negativo	Médio_risco
38	CID 24783299	Mutagênico	Positivo	Positivo	Alto_risco
39	CID 10215271	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
40	CID 42629114	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco

Levando em consideração que a população usuária de medicamentos para demência são pessoas com idade avançada, em se tratando da Doença de Alzheimer tardia, a consideração deste teste é de importância bastante relevante, já que, sabe-se que é nesta população que patologias cardiovasculares são mais comuns. A tabela 6, mostra que os inibidores de número CID9869237, CID9957049, CID24783299, CID44456875, CID45272193, CID57391251 e CID57766857, possuem elevadas chances de serem um forte bloqueadores do canal de potássio hERG, enquanto que os demais apresentam risco médio para causar bloqueio do canal.

## 5.8 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS, PREDIÇÃO DE ATIVIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA

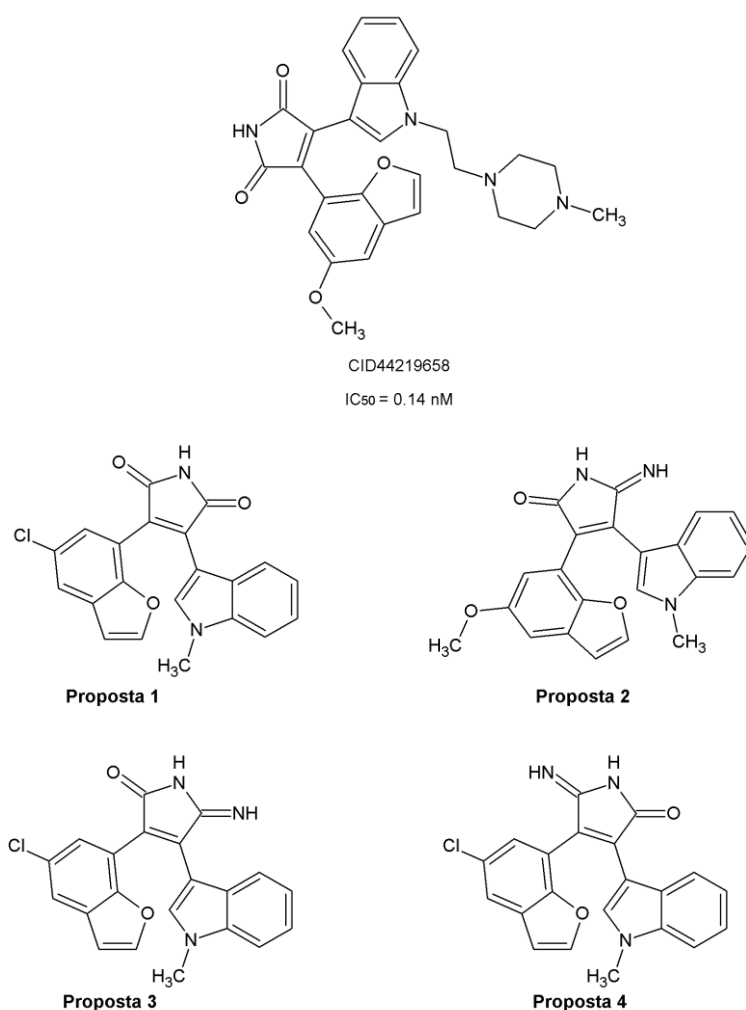
Afim de obter novas propostas de potenciais inibidores, foi escolhido como protótipo, o inibidor número 1 (CID44219658) da tabela 1 (Figura 8), pois é o que apresenta menor valor de  $CI_{50}$ , além de ter tido resultados satisfatórios na predição de propriedades farmacocinéticas. As modificações foram as seguintes: Retirada do radical 1,4 dimetil-piperazina e inserção de um átomo de cloro no lugar do radical metoxila, a fim de diminuir o peso molecular e incrementar a lipofilicidade, tornando – o mais absorvido (proposta 1); retirada

do 1,4 dimetil-piperazina (diminuir o peso molecular) e substituição do átomo de oxigênio pelo nitrogênio no lado direito do grupo pirrol, a fim de criar mais um doador de hidrogênio (proposta 2); retirada do radical 1,4 dimetil- piperazina (diminuir peso molecular), inserção do átomo de cloro no anel benzofurano no lugar do radical metoxila e substituição do átomo de oxigênio pelo átomo de nitrogênio do lado direito do anel pirrol para aumentar absorção (proposta 3); na proposta 4, as mesmas mudanças da proposta 3, com exceção da substituição do oxigênio pelo nitrogênio do lado direito pelo lado esquerdo do anel pirrol (Figura 8).

A substituição do átomo de oxigênio pelo átomo de nitrogênio no anel pirrol foi com finalidade de criar doadores de hidrogênio para favorecer possíveis ligações de hidrogênio. Embora esta substituição tenha sido em um grupamento determinante por se tratar de um grupamento farmacofórico, tal substituição foi baseada no princípio de bioisosterismo, o qual trata-se de um fenômeno observado entre substâncias estruturalmente relacionadas que apresentam propriedades biológicas similares ou antagônicas, além de ser uma ferramenta utilizada para a modificação racional de um composto protótipo (BARREIRO; LIMA, 2005).

A predição *in silico* de espectros de atividade das substâncias (PASS), prevê se um candidato de droga é ativa contra um alvo biológico, baseado em métodos físico-químicos, usando diferentes algoritmos e comparações (FILIMONOV; POROIKOV, 1996).

No resultado da predição de atividade biológica, as atividades com o valor de  $P_a > P_i$  foram considerados, onde  $P_a$  = probabilidade de ser atividade e  $P_i$  = probabilidade de ser inativo, e os valores variam de 0 a 1. A tabela 8 mostra os valores obtidos para as 4 propostas de candidatos inibidores de GSK-3 $\beta$ . As quatro propostas tiveram valores de  $P_a > P_i$  (Proposta 1:  $P_a = 0,363$ ; Proposta 2:  $0,172$ ; Proposta 3:  $0,180$  e proposta 4:  $P_a = 0,180$ ), indicando assim a atividade biológica para a GSK 3 $\beta$ . No entanto, de acordo com Filiminov et al. (2000), quando o valor de  $P_a$  é inferior a 0,5 torna-se pouco provável que a substância exiba uma atividade experimental. Por outro lado, a proposta 1 apresentou predição maior de atividade em relação ao seu protótipo ativo. Sendo a atividade confirmada em experiências, a substância pode ser, em seguida, considerada como uma nova entidade química.

**Figura 8** – Protótipo e Propostas de candidatos a inibidores de GSK -3 $\beta$ **Tabela 8** - Predição de atividade biológica para candidatos a inibidores de GSK-3 $\beta$ .

<b>Propostas</b>	<b>Pa</b>	<b>Pi</b>
Protótipo	0,230	0,006
Proposta 1	0,363	0,004
Proposta 2	0,172	0,012
Proposta 3	0,180	0,010
Proposta 4	0,180	0,010

Após a previsão da atividade biológica, foi calculada a acessibilidade sintética para todas as propostas, utilizando o programa SYLVIA, o qual identifica os níveis de viabilidade de síntese, pontuando de 1 a 3 para os compostos que são fáceis de sintetizar, 3 a 6 para os de média facilidade e de

6 a 10, para as substâncias que são difíceis de sintetizar (BODA; GASTEIGER; SEIDEL, 2007). Todas as propostas indicam estruturas de acessibilidade sintéticas médias, semelhante ao protótipo (5.36), de acordo com as regras/parâmetros de tal algoritmo (Proposta 1 = 4.95; Proposta 2 = 4.97; Proposta 3 = 4.93 e Proposta 4 = 4.93). Observa-se que os valores de todas as propostas foram menores que o protótipo.

## 5.9 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADME/TOX PARA AS PROPOSTAS

Na tabela 9, observa-se todas as propostas obtiverem um valor correspondente ao nível médio ( $4 \leq x \leq 70$ ) de absorção segundo Glynn et al. (1998). Todos os inibidores apresentam um ótimo perfil de absorção intestinal, acima de 80%, além de que, todas as propostas apresentaram alta permeabilidade em células MDCK (>25).

**Tabela 9** - Propriedades de absorção das propostas de inibidores de GSK-3 $\beta$ .

INIBIDORES	Absorção		
	P <sub>CACO2</sub> (nm/s) <sup>[a]</sup>	P <sub>MDCK</sub> (nm/s) <sup>[b]</sup>	HIA (%) <sup>[c]</sup>
Protótipo	46,70970	0,17038	97,10993
Proposta 1	24,11350	36.91440	97,12720
Proposta 2	10,14130	50,50090	91,70732
Proposta 3	16,53780	39,32860	92,84868
Proposta 4	16,91450	39,32860	92,84868

Notas: [a]: percentagem de absorção intestinal humana; [b]: Permeabilidade de células caco-2 em nm/sec); [c]: Permeabilidade de células de Maden Darby Canine Kidney em nm/sec;

Em relação a ligação às proteínas plasmáticas, a tabela 9 mostra que as propostas 1, 3 e 4 apresentam forte ligação às proteínas plasmáticas (maior que 90%). Enquanto que a proposta 2 apresenta fraca ligação as proteínas plasmáticas (menor que 90%).

Ainda de acordo com a tabela 10, todas propostas apresentaram valores significativos de permeabilidade da barreira hematoencefálica, isto significa que

as mudanças estruturais surgiram efeitos satisfatórios indicando um bom candidato a síntese.

**Tabela 10** - Propriedades de distribuição em percentagem de PPB e penetração na barreira hematoencefálica das propostas de inibidores de GSK-3 $\beta$

INIBIDORES	Distribuição	
	$C_{\text{Brain}}/C_{\text{Blood}}$ [a]	PPB(%) [b]
Protótipo	0,23248	80,75784
Proposta 1	2,52921	95,66168
Proposta 2	1,46692	89,02851
Proposta 3	3,56186	93,16173
Proposta 4	3,56186	94,22505

Notas: [a]: penetração na barreira hematoencefálica; [b]: percentagem de ligação as proteínas plasmáticas.

Na tabela 11, observa-se que todas as propostas apresentaram potencial mutagênico na predição *in silico* do teste Ames e evidência de potencial de carcinogenicidade em camundongos enquanto que as propostas 1, 2 e 4 não apresentam evidência de carcinogenicidade em ratos e médio risco de inibição do canal hERG, resultados semelhantes ao protótipo, mostrando que as alterações feita no protótipo não foram suficientes para mudar o perfil toxicológico.

**Tabela 11** - Propriedades toxicológicas de mutagenicidade (Ames teste) e carcinogenicidade (camundongo e rato) e bloqueadoras dos canais tipo hERG das propostas de inibidores de GSK-3 $\beta$ .

<b>INIBIDORES</b>	<b>Mutagenicidade</b>	<b>Carcinogenicidade</b>		<b>hERG</b>
	<b>Ames teste</b>	<b>Camundongo</b>	<b>Rato</b>	<b>Inibição</b>
Protótipo	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
Proposta 1	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
Proposta 2	Mutagênico	Negativo	Negativo	Médio_risco
Proposta 3	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco
Proposta 4	Mutagênico	Negativo	Positivo	Médio_risco



## 6 CONCLUSÃO

Tecnologias *in silico* vem demonstrando cada vez mais ser uma ferramenta importante no planejamento de fármacos, que em um futuro próximo, sua importância será cada vez mais significativa. Esta ferramenta ajudou a elaborar propostas de moléculas interessantes do ponto de vista sintético e farmacológico. No entanto, independentemente da síntese dessas moléculas, os estudos de descritores, mapas de potenciais eletrostáticos, *docking*, ADME/Tox geraram resultados interessantes que podem servir de auxílio a futuras pesquisas.

Os resultados significativos de descritores tais como LUMO +1, LogP, moleza molecular e... pode nortear e facilitar melhor compreensão de quais características um inibidor deverá ter para ter ação na GSK-3 beta, assim como também resultados de *docking*, já que, o mesmo nos oportunizou verificar e analisar a maneira de como um complexo inibidor – enzima GSK – 3 beta realizam interações e ligações, as quais revelaram a participação significativa de Lys85 e Val135 em ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Na perspectiva do *screening* ADME/Tox, as propostas elaboradas obtiveram melhor perfil do que os 40 inibidores pesquisados no BindingDB, implicando que estratégias bem elaboradas de modificações moleculares feitas neste trabalho foram essenciais para esse fim.

Efim, a execução deste trabalho proporcionou, através da aplicação de conhecimentos de química teórica e ferramentas de modelagem computacional, contribuir sobremaneira para a elucidação cada vez maior no que diz respeito as características dos inibidores estudados e da enzima GSK – 3 beta, assim como suas interações, condicionando mais estudos e pesquisas sobre o tema.

## REFERÊNCIAS

ABAD, C.; CASTILLO-GARIT, J. A.; CAÑIZARES-CARMENATE, Y.; MARRERO-PONCE, T. F. Prediction of ADME properties, Part 1: Classification models to predict Caco-2 cell permeability using atom-based bilinear indices. **Afinidad**. 71(566):129-138, 2014.

ABRAHAM, D. J.; ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.9, n.9, p.771-90, 2009.

ABREU, B.C.; HEYN, P.; OTTENBACHER, K.J. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. **Arch Phys Med Rehabil**, v.85, n.10, p.1694-1704, 2004.

ACD/Chemsketch Freeware, version 12.00. Advanced Chemistry Development, Inc, Toronto. 2010.

ADLARD, P. A.; AYTON, S.; BUSH, A. I.; LEI, P. "GSK-3 in Neurodegenerative Diseases," **International Journal of Alzheimer's disease**, vol. 2011.

AGRAWAL, R.; BAHARE, R. S.; DIKSHIT, S. N.; GANGULY, S.; JAIN, P. Ligand-based pharmacophore detection, screening of potential pharmacophore and docking studies, to get effective glycogen synthase kinase inhibitors. **Med Chem Res**. 22:5504-5535, 2013.

ALBUQUERQUE M.G.; ALENCASTRO, R.B.; BARREIRO, E. J; RODRIGUES, C.R.; SANT'ANNA, C.M.R. Modelagem molecular: Uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Quím. Nova**, v. 20 n. 3, p. 300-310, 1997.

ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide-Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev**. 2013.

ALLARD, S.; BRUNO, M. A.; CUELLO, A. C.; LEON, W. C.; PAKAVATHKUMAR, P.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype. **J. Neurosci**. v. 32, p. 2002-2012, 2012.

ANGELO, M.; GIESE, K. P.; PLATTNER, F. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. **J. Biol. Chem**. 281, 25457–25465, 2005.

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

**Medicinal Research Reviews** Volume 26, Issue 5, pages 531–568, September 2006.

ALVAREZ, A.M.M.A.; ANDRADE, F.C.; AVILA, R.; BOTTINO, C. M. C.; BUSTAMANTE, S.E.Z.; CAMARGO, C.H.P.; CARVALHO, I.A.M.; HOTOTIAN, S.R.; SAFFI, F.; ZUKAUSKAS, P.R. Reabilitação cognitiva em pacientes com doença de **Azheimer**. **Arq Neuropsiquiatr**, v.60, n.1, p.70-78, 2002.

ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allg Z Psychiatr**. 64:146-148, 1907.

American Psychiatry Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 4th Ed, Washington, D.C.: American Psychiatry Association, 1994.

AMBROZ, P.; BAR, M.; JANOUT, V.; PAVUKOVA, V.; POVOVA, J.; SERY, O.; TOMASKOVA, H. Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**. Jun; 156(2):108-14, 2012.

AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. **Mutation Res.**,31,347-364, 1975.

AMES, B. N.; MARON, D. M. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. **Mutation Res.**113, 173-21, 1983.

ANDRIOCOPULO, A. D.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr. Med. Chem.**, v.15, n.1, p.37-46, 2008.

ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B. Fragment-based QSAR: perspectives in drug design. **Mol. Divers.**, v.13, n.3, p.277-85, 2009.

ANGHINAH, R.; BOTTINO, C. M. C.; BRUCKI, S. M. D.; CARAMELLI, P.; DAMASCENO, B. P.; NITRINI, R. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. **Arq Neuropsiquiatr**. 63(3-A):713-727, 2005.

ANGOSTO, M. C.; GONZÁLEZ, P. G. Factores implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. **Estrés oxidativo**. 2009. 417-466. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, 2009.

APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S.; Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. **Rev Bras Clin Med**. 7:27-35, 2009.

AREOSA SASTRE, A.; SHERRIFF, F.; MCSHANE, R. Memantine for dementia (Cochrane Review). **The Cochrane Library**. v. 2. Oxford: Update Software, 2005.

ARMSTRONG, A. W.; ARMSTRONG, E. J.; GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H. J. **Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

ARONSON, J. K.; GRAHAME – SMITH, D. G. **Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Nova Guanabara, 83p, 2004.

ARROIO, A.; DA SILVA, A. B. F.; HONÓRIO, K. M. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 694-699, 2010.

ARTURSSON, P.; ELLENS, H.; ELLIOTT, J. D.; LAGO, A.; LEE, C. P.; LUTHMAN, K.; SMITH, P. L.; STENBERG, P. Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity. **Pharmaceutical Research**, 16, pp. 1520–1526, 1999.

ARTURSSON, P.; CHONG, S.; MORRISON, R.; SÖDERBERG, L.; TAIPALENSUU, J.; TAVELIN, S. Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine like 2/4/A1 cell monolayers. **Pharm. Res.** 20, 397–405, 2003.

ARTURSSON, P.; BEIGI, F.; LUNDAHL, P.; LUTHMAN, K.; PALM, K.; STRANDLUND, G.; UNGELL, A. L. Evaluation of dynamic polar molecular surface area as predictor of drug absorption: comparison with other computational and experimental predictors. **Journal of Medicinal Chemistry**, 41 pp. 5382–5392, 1998.

AULD, D.S.; BASTIANETTO, S.; KORNECOOK, T.J.; QUIRION, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition and treatment strategies. **Prog Neurobiol.** 2002;68(3):209-45.

BACSKAI, B. J.; HOU, S.; JIANG, J.; KELLY, J.; SEKUTOWICZ, M.; XIE, H. Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 7, p. 7904-7909, 2013.

BAIRD, A. L.; LOVESTONE, S.; WESTWOOD, S. Blood-Based Proteomic Biomarkers of Alzheimer's Disease Pathology. **Frontiers in Neurology**, 6, 236, 2015.

BLENNOW, K.; SCHÖLL, M.; HANSSON, O.; MATTSSON, N.; ZETTERBERG, H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease, **Trends in Pharmacological Sciences**, Volume 36, Issue 5, May, Pages 297-309, 2015.

BALAKRISHNAN, N.; RAJ, J. S.; KANDAKATLA, N. 2D/3D-QSAR, Docking And Optimization Of 5-Substituted-1h-Indazole as Inhibitors of GSK-3β. **Int J Pharm Sci.** 6(10):413-420, 2014.

BALIMANE, P. V.; CHONG S. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. **Drug Discovery Today.** Volume 10, Issue 5, 1, Pages 335–343, 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. Volume 44, Issue 1, July–August, Pages 301–312, 2000.

BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, 12, 23-49, 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases moleculares da ação dos fármacos**, 2ª edição, Editora Art Med Ltda, Porto Alegre, R.S., 2008.

BARTON, P.; WENLOCK, M. C. *In Silico* Physicochemical Parameter Predictions. **Mol. Pharmaceutics**, 10 (4), pp 1224–1235. Publication Date (Web): January 10, 2013.

BARTUS, R.T.; EMERICH, D.F. Cholinergic markers in Alzheimer disease. **JAMA**. 282 (23):2208-9, 1999.

BELL, C. C.; BOWEN, P. E.; BURKE, J. R.; CONNOLLY JR, E. S.; DAVIGLUS, M. L.; DUNBAR-JACOB, J. M.; GRANIERI, E. C.; MCGARRY, K.; PATEL, D.; PLASSMAN, B. L.; PIRZADA, A.; TREVISAN, M.; WILLIAMS JR, J. W. Factors and Preventive Interventions for Alzheimer Disease: State of the Science. **Arch. Neurol.** v. 68, p. 1185-1190, 2011.

BERMAN, H. M.; BHAT, T. N.; BOURNE, P. E.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; SHINDYALOV, I. N.; WESTBROOK, J.; WEISSIG, H. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BIRKS J, EVANS G. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. **Cochrane Database Syst Rev**; (1):CD003120, 2009.

BODA, K.; GASTEIGER J.; SEIDEL, T. Structure and reaction based evaluation of synthetic accessibility. **J Comput Aided Mol Des**. 21(6):311-325, 2007.

BONUCCELLI, U.; CIPRIANI, G.; DOLCIOTTI, C.; PICCHI, L. Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurol Sci**. Apr; 32(2):275-9 2011.

BORN, H. A. Seizures in Alzheimer's disease. **Neuroscience**. Volume 286, 12, Pages 251–263, February 2015.

BOWEN, J. et al.: Progression to dementia in patients with isolated memory loss. **Lancet**. 349:763-769, 1998.

BRAGA, F. S.; CARVALHO, J. C. T.; COSTA, J. S.; CUNHA, E. L.; DA SILVA, C. H. T. P.; FAVACHO, H. A. S.; HAGE-MELIM, L. I. S.; SANTOS, C. B. R.; SANTOS, C. F.; SILVA, R. C. Computational Investigation of Antifungal Compounds Using Molecular Modeling and Prediction of Pharmacokinetic and Toxicological Properties. **J. Comput. Theor. Nanosci**. Vol. 12, No. 10, 2015

BRAGA, F. S.; CASTRO, L. L.; DA SILVA, C. H. T. P.; DA SILVA, K. R.; DE SOUZA, L. R. HAGE-MELIM, L. I. S.; PICANÇO, L. C. S.; PINHEIRO, A. A.; SANTOS, C. B. R. Study of Molecular Docking, Physicochemical and Pharmacokinetic Properties of GSK-3 $\beta$  Inhibitors. **BJPR**, 7(3): 152-175, 2015.

BRANDT, R.; HUNDELT, M.; SHAHANI, N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. **Biochim Biophys Acta**. 2005;3;1739(2-3):331-54.

BRASIL. **Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia E Segurança Farmacológica Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2.

BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis **J. Comput. Chem** Volume 11, Issue 3, 1990.

BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; ENGELHARDT, E.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Tratamento da doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. São Paulo. v. 63, n. 4, Dec. 2005.

BRUNTON, L.; HILAL-DANDAN, R. **Goodman and Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutics**, 2nd ed., McGraw-Hill Edicion, New York, 2008.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 12ª ed. São Paulo: McGraw-Hill; 2012.

BUTTERFIELD, D. A.; PERLUIGI, M.; SULTANA, R. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. **Antioxid. Redox Signal**, v. 8, p. 2021-2037, 2006.

BUXBAUM, J. D.; DAVIES, P.; DAVIS, K.L.; GREENGARD, P.; HAROUTUNIAN, V.; MOHS, R.; NASLUND, J. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. **JAMA**, v. 283, p. 1571-1577, 2000.

CALEB. E. F.; KIRSTEN, L. V.; KLEIN, W. L.; KRAFFT, G. A.; LEI, C.; MARY, P. L.; PASCALE, N. L.; YUESONG, G. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A $\beta$  ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proc Natl Acad Sci. U S A**. Sep 2: 100(18): 10417–10422, 2003.

CAMANHO, L. E. M.; FERREIRA, F. A. C.; MENDONÇA FILHO, P. J. S.; PRATA, I.; SAAD, E. B.; VERONESE, F. O. Electrocardiographic predictors of syncope and sudden death in patients with congenital long QT syndrome. **Rev SOCERJ**. 20: 91-6, 2007.

CARVALHO, J.C.T.; LOBATO, C.C.; MACÊDO, W.J.C.; SANTOS, C.B.R.; SOUSA, M.A.C. Molecular Modeling: Origin, Fundamental Concepts and Applications Using Structure-Activity Relationship and Quantitative Structure-Activity Relationship. **Reviews in Theoretical Science**, 2, 91-115, 2014.

CHATTARAJ, P. K.; GIRI, S. Stability, reactivity, and aromaticity of compounds of a multivalent superatom. **J. Phys. Chem. A**, v. 111, n. 43, p. 11116–11121, 2007.

CHATTARAJ, P. K.; PADMANABHAN, J.; PARTHASARATHI, R.; SUBRAMANIAN, V.; Electrophilicity-based charge transfer descriptor. **J. Phys. Chem. A**, v. 111, n. 7, p. 1358–1361, 2007.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, p.

CHEMPLUS: Modular Extensions for HyperChem Release 6.02, Molecular Modeling for Windows, HyperClub, Inc., Gainesville, 2000.

CHEN, C.; MA, X.; YANG, J. Predictive Model of Blood-Brain Barrier Penetration of Organic Compounds. **Acta Pharmacol. Sin.** 26:500-512, 2005.

CHEONG, J.; GROVE, J. R.; IRVINE, J.D.; LOCKHART, K.; SELICK, H. E.; TAKAHASHI, L.; TOLAN, J. W. MDCK (Madin–Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **J. Pharm. Sci.** 88, 28–33, 1999.

CHU, L. W. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. **Hong Kong Med J**. Jun;18(3):228-37, 2012.

CLARE, B.W. The Relationship of Charge Transfer Complexes to Frontier Orbital Energies in QSAR. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, 331, 63-78, 1995.

CLEGG, A.; GREEN, C.; KIRBY, J.; LOVEMAN, E.; PAYNE, E.; PICOT, J.; TAKEDA, A. The clinical and costeffectiveness of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for Alzheimer's disease. **Health Technol Assess.** 10(1), 2006.

COELHO, F. G. de M.; GOBBI, S.; SANTOS-GALDUROZ, R. F.; STELLA, F. Atividade física sistematizada e desempenho cognitivo em idosos com demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, vol. 31, n.2, p. 163-170, 2009.

COFFMAN, V. C.; PARTHUN, M. R.; WU, P.; WU, J. Q. CENP-A exceeds microtubule attachment sites in centromere clusters of both budding and fission yeast. **J Cell Biol.** 195(4):563-72, 2011.

COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 2, 769–776 2001.

COLE, J. C.; MURRAY, C. W.; NISSINK, J. W. M.; TAYLOR, R. D.; TAYLOR, R. Comparing Protein–Ligand Docking Programs Is Difficult. **Proteins: Struct, Func Bioinf.** 2005; 60:325–332, 2005.

CORCORAN, C.D.; MUNGER, R.G.; NELSON, C.; WENGREEN, H.J. Dietary folate, vitamin B-12, vitamin B-6 and incident Alzheimer's disease: The cache county memory, health and aging study. **J Nutr Health Aging**, v. 13, p. 899-905, 2009.

COSTA, J. L. R.; GOBBI, S.; HERNANDEZ, S. S. S.; STELLA, F.; VITAL, T. M. Atividade física sistematizada e sintomas de depressão na demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, vol.59, n.1, p. 58-64, 2010.

COULSON, E.; GOETZ, J.; TURNBULL, M. Neurotrophin regulation of Alzheimer's disease pathology. **Journal Of Neurochemistry**, Aug, Vol.134 Suppl 1, pp.208-208, 2015.

COX, M. M.; LEHNINGER, A.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo, Artmed, 2011.

DAMASCENO, B. P.; DA SILVA, A. B.; FORLENZA, O.; FROTA, N. A. F.; HERRERA JUNIOR, E.; MAGALDI, R. M.; NITRINI, R.; TOSTA, E. D. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol.** June; 5(Suppl 1):5-10, 2011.

DASTON, G. P.; RUSYN, I. Computational Toxicology: realizing the promise of the toxicity testing in the 21st century. **Environmental Health Perspectives.** 118(8), p1047-1050. Aug, 2010.

DE ALENCASTRO, R. B.; HORTA, B. A. C.; PINTO, A. C.; SILVA, B. V. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quím. Nova**, vol.32, n.2, 2009.

DE MELO, M. A.; DRIUSSO, P. Proposta Fisioterapêutica para os cuidados de Portadores da Doença de Alzheimer. **Revista envelhecimento e saúde**, vol. 12, n.4, p. 10-18, 2006.

DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. GaussView, Version 5, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.



DIAS NETO, E.; FRIDMAN, C.; GREGORIO, S. P.; OJOPI, E. P. B. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Rev. psiquiatr. Clín.**, v.31, n.1, p. 19-25, 2004.

DIETRICH, S. W. in: **Burger's medicinal chemistry and drug discovery: principles and practice**. 5th ed. New York: John Wiley; 1995.

DINIZ, B. S.; FORLENZA, O. V.; GATTAZ, W. F. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. **BMC Med.**8:89, 2010.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-task kinase. **J. Cell Sci.** 116, 1175–1186, 2003.

DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; MCKHANN, G.; PRICE, D.; STADLAN, E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. **Neurology**. 34:939-944, 1984.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C. et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. **Lancet Neurol**. 9:1118-1127, 2010.

DURANY, N.; GELLA, A. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adh. Migr.**, v. 3, p. 88-93, 2009.

EDWARD W.; KOTHIWALE, S.; LOWE, JR.; MEILER, J.; SLIWOSKI, G. Computational methods in drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, January, Vol.66 (1), pp.334-395, 2014.

EKAVALI.; KUMAR, A.; SINGH, A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update, **Pharmacological Reports**, Volume 67, Issue 2, April, Pages 195-203, 2015.

ENGEL, M.; ITTNER, L.; MUNOZ, S. S.; OOI, L. Alzheimer's disease tau pathology found in cholinergic, but not dopaminergic neurons differentiated from patient stem cells **Journal Of Neurochemistry**, Aug, Vol.134 Suppl 1, pp.271-272, 2015.

ESSEX, J. W. J. A.; JEWSBURY, P. J.; TAYLOR, R. D. Review of protein-small molecule docking methods. **Comput. Aided Mol. Des.** 16, 151, 2002.

EVIDENCE-BASED MEDICINE WORKING GROUP. Evidence-based medicine. A new approach to teaching the practice of medicine. **JAMA**; 268:2420-2425, 1992.

FILIMONOV, D.; LAGUNIN, A.; STEPANCHIKOVA, A.; POROIKOV, V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. **Bioinformatics**.16:747-748, 2000.

FILIMONOV, D. A.; POROIKOV, V. V. PASS: Computerized Prediction of Biological Activity Spectra for Chemical Substances Bioactive Compound

Design: Possibilities for Industrial Use, **BIOS Scientific**, Oxford, pp. 47–56, 1996.

FORD, K. A. Role of Electrostatic Potential in the in Silico Prediction of Molecular Bioactivation and Mutagenesis. **Mol. Pharmaceutics**, 10, 1171–1182, 2013.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; **Principles of medicinal chemistry**, 4th ed., Williams & Wilkins: Baltimore, 1995.

FREIRE, R. O.; ROCHA, G. B.; SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. P. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **J. Comput. Chem.**, 27: 1101–1111, 2006.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de psiquiatria clínica**, vol. 32, nº3, p. 138-141, 2005.

FRISCH, M. J. G.; TRUCKS, W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.; VREVEN, JR. T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; M. WONG, W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian 03, Revision A.1; Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, 2003.

GIESE K. P. GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory. **IUBMB Life** 61, Volume 61, Issue 5, pages 516–521, May 2009.

GIORDANO, A.; MARTINELLI, A.; POLI, G.; ROMBOLI, V.; TUCCINARDI, T. Extensive Consensus Docking Evaluation for Ligand Pose Prediction and Virtual Screening Studies. **J. Chem. Inf. Model**, 54 (10), 2980-2986, 2014.

GLYNN, S. L.; HAWI, A.; WRIGHT, J. L.; YAZDANIAN, M. Correlating Partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds. **Pharm. Res.** 15, 1998.

GOEDERT, M. Tau protein and neurodegeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 15:45-9, 2004.

GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. **Proteins**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1990.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Curr The Res**. 64(4):216-35, 2003.

GRUNDKE-IQBAL, I; IQBAL K. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. **J. Cell Mol. Med**. 12, 38–551, 2008.

HANSCH, C.; LEO, A. **Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology**, ACS: Washington, 1995.

HANSCH, C.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**, Pergamon Press: Oxford, 1990, vol. 4.

HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**. 297(5580):353-6, 2002.

HARRINGTON, C.R.; STOREY, J. M. D.; WISCHIK, C. M. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's. **Biochemical Pharmacology**, 88, 529–539, 2014.

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

HELMA, C. *In silico* Predictive Toxicology: The State of the Art and Strategies to Predict Human Health Effects. **Curr Opin Drug Discov Devel.**, Freiburg, v. 8, n. 1, p.27-31, 2004.

HEMNANI, T.; PARIHAR, M. S. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **J Clin Neurosci**. 11(5):456-67, 2004.

H.-J. MÖLLER.; M. B. GRAEBER. The case described by Alois Alzheimer in 1911 **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience** July, Volume 248, cap. 3, pp 111-122, 1998.

HOBLYN, J.; MOHANTY, S.; TRINH, N.H.; YAFFE, K. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatry symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. **JAMA**, v.289, p.210-216, 2003.

HOFNUNG, M.; QUILLARDET, P. The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial tests. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 205, p. 107-118, 1988.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em junho de 2014.

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

JENWITHEESUK, E.; HORST, J. A.; RIVAS, K. L.; VAN VOORHIS, W. C.; SAMUDRALA, R. Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening. **Trends Pharmacol. Sci.** 2008, 29, 62. Volume 29, Issue 2, p62–71, February 2008.

JESSEN F.; WAGNER M. Amyloid Pathology, Cognitive Impairment, and Alzheimer Disease Risk. **JAMA**. 314 (11):1177, 2015.

JICHA, G. A.; SWAMINATHAN, A. Nutrition and prevention of Alzheimer's dementia. **Front Aging Neurosci.** 6: 282, 2014.

JURS, P.; MUSKAL, S.; TOLAN, J.; WESSEL, M. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. **Journal of Chemical Information and Computer Science**. 38, pp. 726–735, 1998.

KLEIN, W. L.; LACOR, P. N.; PITT, J.; WILCOX, K. C. A $\beta$  Oligomer-Induced Synapse Degeneration in Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Volume 31, Issue 6, pp 939-948, August, 2011.

KLOPMAN, G.; SAIKHOV, R. D.; STEFAN, L. R. ADME evaluation: 2. A computer model for the prediction of intestinal absorption in humans. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. Volume 17, Issues 4–5, December, Pages 253–263, 2002.

KNOPMAN, D.S. Mediterranean diet and late-life cognitive impairment: a taste of benefit. **JAMA**, v. 302, p. 686-687, 2009.

KOLLMAN, P. A.; MIYAMOTO, S. Absolute and relative binding free energy calculations of the interaction of biotin and its analogs with streptavidin using molecular dynamics/Free energy perturbation approaches. **Proteins: Structure, function, and Genetics** 16:226 – 245, 1993.

KOLLMAN, P. A.; SINGH, U. S. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **J. Comput. Chem**, Volume 5, Issue 2, 1984.

KRÜGER, L.; MANDELKOW, E. M. Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. **Current Opinion in Neurobiology**, Volume 36, February, Pages 52-58, 2016.

KUBINYI, H. Chemical Similarity and Biological Activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, n.13, p.717-726. 2002.

KUBINYI, H. **QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches**, 1 ed., VHC, Weinheim, Germany, p. 1-75, 1993.

LECKBAND, D.; SIVASANKAR, S.; SUBRAMANIAM, S. Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 95, 12961–12966, 1998.

LENZ, G. R.; PAJOUHESH, H. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. **NeuroRx** The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. Vol. 2, 541–553, October 2005.

LI, A. P. Screenig for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.6, n. 7, p. 357 – 366, 2001.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev.**23:3-25, 1997.

LIU, F.; WANG, J. Z. Microtubule-associated tau protein in development, degeneration and protection of neurons. **Prog Neurobiol.**10:1016-44, 2008.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug Discovery – then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**. London, v.3, n.10, p.853-862, 2004.

LUO, Y. Ginkgo biloba neuroprotection: therapeutic implications in Alzheimer's disease. **J Alzheimer's Dis** 3(4):401-7, 2001.

MAHAN, L. KATHLEEN; ESCOTT- STUMP, SYLVIA. **Alimentos nutrição & dietoterapia**. Ed. Rocca. São Paulo, 2005.

MATHURANATH, P.S.; ROBERT, M. Tau and tauopathies. **Neurol India**. 55(1):11-6, 2007.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb. Perspect. Med**, 2(8), 2012.

MURRAY, J.S.; POLITZER, P. The Electrostatic Potential: An Overview. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Computational Molecular Science**, 1, 153-163, 2011.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press, Oxford.2001.

PEDERSEN, J. T.; SIGURDSSON, E. M. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease, **Trends in Molecular Medicine**, Volume 21, Issue 6, Pages 394-402, June 2015.

PETIT-PAITEL, A. [GSK-3beta: a central kinase for neurodegenerative diseases?]. **Med Sci** (Paris). May; 26(5) 516-521, 2010.

Pirouette 3.01, Infometrix Inc., Seattle, WA, 2001.

POLITZER, P.; MURRAY, J. S.; The fundamental nature and role of the electrostatic potential in atoms and molecules. **Theor. Chem. Acc.** 2002, 108, 134-142.

POLITZER, P.; TRUHLAR, D. G. In **Chemical Applications of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials**; Eds.; Plenum Press: New York, pp 1-6, 1981.

PLUKIGER, P.; LUTTHI, H. P.; PORTMANN, S.; WEBBER, J.; MOLEKEL 4.1, Swiss Center for Scientific Computing, Switzerland, 2001.

PYTHON, S. M. F. A programming language for software integration and development. **J Mol Graph Model.** 17 (1):57-61, 1999.

RANKOVIC, Z. CNS Drug Design: Balancing Physicochemical Properties for Optimal Brain Exposure. Eli Lilly and Company, 893 South Delaware Street, Indianapolis, Indiana 46285, United States, **J. Med. Chem.**, 58, 2584-2608, 2015.

ROZENFELD, S. Prevalência, fatores associados e mau uso de medicamentos entre os idosos: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.3, p.717-724, 2003.

SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de Modelagem Molecular Para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Revista Virtual de Química**, 1, 49-57, 2009.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucl. Acids. Res.**, v. 36, W223-W228, 2008.

SANTOS, C. B. R.; VIEIRA, J. B.; LOBATO, C. C.; HAGE-MELIM, L. I. S.; SOUTO, R. N. P.; LIMA, C. S.; COSTA, E. V. M.; BRASIL, D. S. B.; MACÊDO, W. J. C.; CARVALHO, J. C. T. A SAR and QSAR Study of New Artemisinin Compounds with Antimalarial Activity. **Molec**, v. 19, p. 367-399, 2014.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev.** 2001;81(2):741-66.

STATISTICA (Data Analysis Software System); Version 6.1, StatSoft, Inc., 2004.

UNGELL, ANNA-LENA. B. Caco-2 replace or refine?. **Drug Discovery Today: Technologies**. Vol. 1, No. 4 2004.

VINTERS, H. V. Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. **Annu Rev Pathol.** 10:291-319, 2015.

WANNMACHER, L. Demência: evidências contemporâneas sobre a eficácia dos tratamentos. **Revista Pan-Americana de Saúde Pública**, Vol. 2, nº4, p. 1-3, 2005.

WOO, Y. T. Mechanisms of action of chemical carcinogens, and their role in FE, editors. Epoxy compounds. Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3th ed. New York: John Wiley; 1981.

YAMASHITA, S. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2000.